

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 ” листопада 2024 року

ЗАВДАННЯ

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

ПУСТОВОЙТ Анастасії Михайлівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Біосинтез рифаміцину *Nocardia mediterranea*
керівник роботи УДИМОВИЧ Віктор Миколайович, PhD з біотехнології та біоінженерії, ст. викл.

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від 5 листопада 2024 року №932-к

2. Строк подання здобувачем роботи 31 січня 2025 р.

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Nocardia mediterranea*, цільовий продукт: рифаміцин, об'єм ферментера 0,630 м³, коефіцієнт заповнення 0,65

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

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема виробництва рифаміцину – 1 аркуш формату А1.

Апаратурна схема виробництва рифаміцину – 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 листопада 2024 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Характеристика рифаміцину	01.11.2024- 13.01.2024	
2	Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	01.11.2024- 13.01.2024	
3	Техніко-економічне обґрунтування рифаміцину	14.11.2024- 30.11.2024	
4	Обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва рифаміцину	01.12.2024- 15.12.2024	
5	Специфікація обладнання виробництва рифаміцину	16.12.2024- 30.12.2024	
6	Опис технологічної схеми біосинтезу рифаміцину	09.01.2025- 19.01.2025	
7	Контроль виробництва рифаміцину	20.01.2025- 25.01.2025	
8	Охорона довкілля	26.01.2025- 27.01.2025	
9	Оформлення пояснювальної записки	28.01.2025- 30.01.2025	
10	Виконання графічної частини проекту	20.01.2025- 30.01.2025	

Здобувач

_____ (підпис)

Анастасія ПУСТОВОЙТ

_____ (ім'я та прізвище)

Керівник роботи

_____ (підпис)

Віктор УДИМОВИЧ

_____ (ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена розробленню апаратурної схеми біосинтезу рифаміцину бактерією *Nocardia mediterranea* (також інші назви – *Amycolatopsis rifamycinica*, *Streptomyces mediterranea*, *Amycolatopsis mediterranea*), з використанням штаму *Nocardia mediterranea* NCIM 5008, який синтезує рифаміцин у концентрації 5,32 г/л.

Рифаміцин - це антибіотик, що належить до групи антибіотиків макролідної структури. Розрахована потужність виробництва становить 79,25 кг (20,856 м³ культуральної рідини) рифаміцину за рік.

Технологічна схема біосинтезу рифаміцину включає допоміжні роботи (підготовка аераційного повітря, підготовка титрувальних агентів, приготування розчину мікроелементів, стерилізація поживних середовищ) та технологічний процес (три стадії вирощування посівного матеріалу та біосинтез у ферментері об'ємом 630 л коефіцієнтом заповнення 0,65). Технологія отримання рифаміцину передбачає культивування глибинним періодичним способом.

Кваліфікаційна робота складається зі вступу, дев'яти розділів, списку використаних джерел (56 джерел), апаратурної схеми та технологічної схеми (формат А1,2 аркуші). Загальний обсяг роботи – 90 сторінок, 10 рисунків, 22 таблиці.

Ключові слова: рифаміцин, *Nocardia mediterranea*, біосинтез, антибіотик, технологічна схема, апаратурна схема.

ABSTRACT

The qualification work is devoted to the development of a hardware scheme for the biosynthesis of rifamycin by the bacterium *Nocardia mediterranea* (also other names – *Amycolatopsis rifamycinica*, *Streptomyces mediterranea*, *Amycolatopsis mediterranea*), using the *Nocardia mediterranea* NCIM 5008 strain, which synthesizes rifamycin at a concentration of 5.32 g/l.

Rifamycin is an antibiotic belonging to the group of antibiotics of the macrolide structure. The calculated production capacity is 79.25 kg (20.856 m³ of culture fluid) of rifamycin per year.

The technological scheme of rifamycin biosynthesis includes auxiliary works (preparation of aeration air, preparation of titration agents, preparation of a solution of trace elements, sterilization of nutrient media) and the technological process (three stages of growing seed material and biosynthesis in a fermenter with a volume of 630 l with a filling factor of 0.65). The technology of obtaining rifamycin involves cultivation by a deep periodic method.

The qualification work consists of an introduction, nine sections, a list of used sources (56 sources), an apparatus diagram and a technological scheme (format A1, 2 sheets). The total volume of the work is 90 pages, 10 figures, 22 tables.

Keywords: rifamycin, *Nocardia mediterranea*, biosynthesis, antibiotic, technological scheme, apparatus diagram.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	8
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА РИФАМІЦИНУ	10
РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА.....	13
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування.....	13
2.2. Розрахунок складу поживного середовища	20
2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента	21
2.4. Фізіолого-біохімічні ознаки	24
2.5. Таксономічний статус біологічного агента	24
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ	26
3.1. Потреба у цільовому продукті	26
3.2. Розрахунок потужності виробництва.....	27
3.3 Розрахунок кількості виробничих циклів і геометричного об'єму ферментера для біосинтезу рифаміцину.....	29
3.4 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для біосинтезу рифаміцину	30
РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	32
РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	33
5.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера	33
5.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря	34
5.3 Вибір мийних та дезінфікуючих засобів.....	35
5.4 Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища.....	42
5.4.1 Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках.....	43

5.4.2 Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в посівних апаратах	44
5.4.3. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу.....	46
5.4.4 Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН та піногасника	47
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ	49
РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.	53
РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	64
5.1. Мікробіологічний контроль	64
5.2. Визначення концентрації джерела азоту та вуглецю	65
5.3. Визначення концентрації цільового продукту	69
РОЗДІЛ 9. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ.....	77
9.1. Аналіз технологічної схеми виробництва рифаміцину на місця емісії твердих, рідких та газоподібних відходів.....	77
9.2. Перспективи впровадження системи екологізації виробництва рифаімицину	79
9.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів.	79
9.2.2. Система знешкодження та утилізації твердих відходів	81
9.2.3. Система знешкодження газоповітряних викидів.....	82
Перелік літератури:	84

ВСТУП

Рифаміцини продукуються в основному грампозитивними бактеріями *Amicolatopsis mediterranei*, раніше названими *Streptomyces mediterranei* або *Nocardia mediterranei*. Вперше *Amicolatopsis mediterranei* були виділені з ґрунту у французькому сосновому лісі у 1957. Рифаміцин вперше виділили з ферментаційної культури в лабораторії Лепетіт у Мілані, Італія. Різні штами цього мікроорганізму виробляють різні типи рифаміцинів (А, В, С, D, Е, S, SV тощо) відповідно до умов виробництва. Ці рифаміцини, як правило, взаємоперетворюються хімічними засобами і значно відрізняються за своїм антимікробним спектром і ступенем активності [1]. Похідні сполуки рифаміцину включають рифампіцин, рифабутин, рифапентин, рифалазил і рифаксимін. Рифампіцин входить до вибраної категорії препаратів, активних проти повільно зростаючих або нерозмножуваних *Mycobacterium tuberculosis* [2].

Рифаміцин демонструє широкий спектр антибіотичної активності проти грампозитивних і, меншою мірою, грамнегативних бактерій. Рифаміцин В, продукт промислового бродіння, має дуже помірну активність, але його можна перетворити хімічно, ферментативно, або шляхом біотрансформації в рифаміцин SV, який має набагато потужнішу активність і був першим рифаміцином, застосованим клінічно. Після клінічного впровадження рифаміцину SV широкі програми напівсинтезу, насамперед у групі Lepetit і Ciba-Geigy, призвели до підготовки та оцінки великої кількості аналогів рифаміцину. Серед них рифампіцин був обраний як клінічний кандидат наступного покоління. Рифампіцин демонструє більш виражену активність проти грампозитивних бактерій, зокрема мікобактерій, кращу активність проти

					НУХТ БТЕК 05.01.16 КР ПЗ			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Актуальне</i>
<i>Розроб.</i>		<i>Пустовойт А.М.</i>			ВСТУП		8	90
<i>Консульт.</i>								
<i>Керівник</i>		<i>Удимович В.М.</i>						
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Зав. каф.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						
						Кафедра БТМ		

грамнегативних бактерій і, що важливо, відмінну біодоступність при пероральному прийомі. Він став одним із основних засоби для лікування туберкульозу, прокази та мікобактеріальних інфекцій, пов'язаних зі СНІДом. Оскільки резистентність до рифампіцину розвивається досить швидко, препарат зазвичай використовують у комбінації з іншими антимікобактеріальними засобами, зокрема ізоніазидом. Інші напівсинтетичні похідні рифаміцину, такі як рифабутин і рифапентин, згодом були представлені для клінічного використання. Зокрема, рифабутин активний проти ряду клінічних збудників, стійких до рифампіцину [3].

Отже, розробка нових технологій одержання рифаміцину є **актуальною**, оскільки рифаміцин має велику кількість похідних сполук, які мають високу ступінь активності та антимікробний ефект. Збільшення асортименту та розширення ринку антибіотиків є важливим напрямком у фармації, оскільки антибіотикорезистентність на сьогоднішній день виходить за рамки суто медичної проблеми, має величезне соціально-економічне значення й у розвинених країнах розглядається як загроза національної безпеки. Це спровоковано такими факторами, як: безрецептурно–ліберальний відпуск антибіотиків; надмірне і неналежне їх призначення; необґрунтоване застосування при різних інфекціях одного і того ж популярного “модного” препарату; необґрунтована хірургічна перед- та післяопераційна профілактика; поширення резистентних штамів у лікарні, внаслідок недостатності профілактичних заходів [4].

Новизна наведеної та описаної у роботі технології одержання рифаміцину полягає у використанні штаму *Nocardia mediterranei* NCIM 5008, який культивується на недорогому ростовому субстраті – 6,84 грн за 1 л середовища, та має найбільший вихід рифаміцину із всіх порівняних штамів – 5,32 г/л за 120 годин культивування.

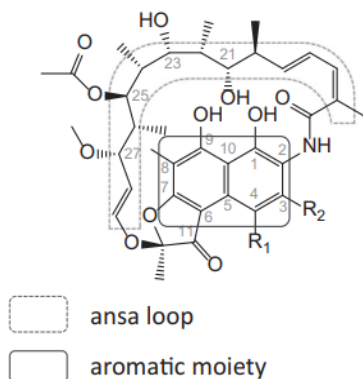
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА РИФАМІЦИНУ

Назва продукту мікробного синтезу. Рифаміцини (rifamycins) — це полікетиди, які містять нафталіноароматичний фрагмент і входять до класу природних продуктів ансаміцину. Вони характеризуються своєю корзинчастою структурою, яка утворюється, коли кінці нафталінового ароматичного фрагмента з'єднані полікетидним ланцюгом, прикрашеним різними хімічними фрагментами, щоб утворити петлю [5].

Хімічна формула [6].

Брутто-формула: $C_{37}H_{47}NO_{12}$;

Молярна маса: 697,778 г/моль;



Compound	R ₁	R ₂
Rifamycin B		H
Rifamycin SV	OH	H
Rifampicin	OH	
Rifapentine	OH	
Rifaximin		
Rifabutin		
Rifalazil		

Рис. 1.1. Структури рифаміцину. Загальна структура представлена ліворуч, а пов'язані відмінності між молекулами – праворуч. Пунктирна рамка

НУХТ БТЕК 05.01.16 КР ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.		Пустовойт А.М.		
Консульт.				
Керівник		Удимович В.М.		
Н. Контр.				
Зав. каф.		Стабніков В.П.		
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА РИФАМІЦИНУ			Лім.	Арк.
				10
			Кафедра БТМ	
			Актуалізовано	90

вказує на петлю анса, а синя суцільна рамка вказує на ароматичну частину [5].

Застосування та механізм дії. Має антибіотичну активність проти грампозитивних і, меншою мірою, грамнегативних бактерій [3]. Використовується у якості лікарського засобу.

Ранні експерименти продемонстрували, що рифаміцини перешкоджали синтезу РНК і включали РНК-полімеразу (RNAP) як первинну мішень рифаміцину. Структурно рифаміцини інгібують РНКП шляхом зв'язування з її β -субодиницею, що підтверджується більшістю резистентних мутантів, чії мутації відповідають β -субодиниці. Дані про кристалічну структуру показали, що рифаміцини можуть блокувати транскрипцію після того, як другий або третій фосфодієфірний зв'язок утворюється в новому транскрипті. Примітно, що рифаміцини блокують шлях подовження транскриптів, коли вони досягають розміру 2–3 нуклеотидів, що пояснює, чому РНКП більше не сприйнятлива до рифаміцинів після початку елонгації [5].

Біосинтез рифаміцинів. Дегідрування та гідроксилування проансаміцину X призводить до проміжного рифаміцину W. Було показано, що фермент RifT важливий для біосинтезу рифаміцину B, є припущення, що RifT є НАДН-залежною дегідрогеназою, і він бере участь у перетворенні проансаміцину X на рифаміцин W. Ферменти Rif5, Rif20 і Rif14 беруть участь у перетворенні рифаміцину W на рифаміцин SV. Rif5 є монооксигеназою, яка при видаленні призводить до накопичення рифаміцину W, який, як припускають, бере участь у формуванні кеталу нижче за рифаміцин W. Rif20 ацетилює гідроксильну групу C25 на проміжному етапі після рифаміцину W та утворення кеталу, тоді як Rif14 метилює гідроксильну групу C27 з утворенням рифаміцину SV. Rif15, транскетолаза з двох субодиниць, і Rif16, фермент цитохрому P450, необхідні для перетворення рифаміцину SV на рифаміцин B, і цікаво, що експерименти *in vitro* виявили біосинтетичну мережу між

рифаміцинами SV, S, L, O , і B, де Rif15 і Rif16 беруть участь у їхніх взаємоперетвореннях [5].

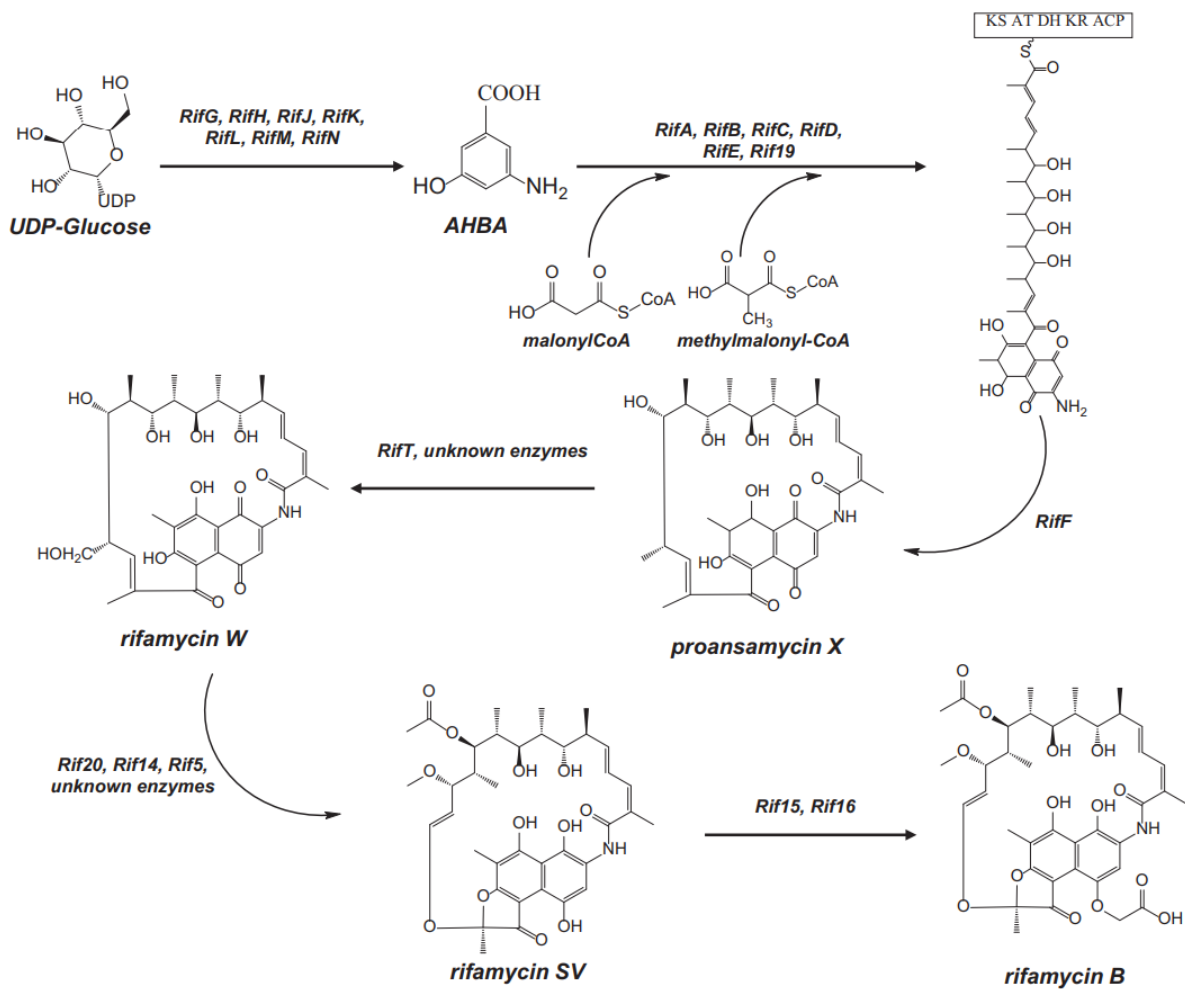


Рис. 1.2. Спрощена схема біосинтезу рифаміцинів [5].

РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

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

Проведемо аналіз різних штамів *Nocardia mediterranei* з метою виявлення біологічного агента, який має найбільшу кількість переваг. До уваги будуть братися наступні фактори – вихід цільового продукту; швидкість росту; вартість поживних середовищ, на яких здійснюється культивування з метою одержання цільового продукту.

***Nocardia mediterranei* VA18.** У цьому дослідженні штам *Nocardia mediterranei* МТСС #14, що продукує рифаміцин В, піддали методам мутації та селекції з використанням фізичних і хімічних мутагенів для отримання високоврожайних штамів. Штам *Nocardia mediterranei* VA18 є мутантним штамом другої генерації та мав найбільший вихід серед досліджуваних штамів – 2,450 г/л рифаміцину [7].

***Nocardia mediterranei* OVA5-E7.** У даному дослідженні розглянуто різні речовини для оптимізації для іммобілізації клітин продуцента. В даний час іммобілізація клітин є корисною технікою для дослідження потенціалу нових біопромислових процесів виробництва. Цей метод використовувався для збільшення виробництва кількох видів антибіотиків і іноді може покращити врожайність. Потенціал іммобілізації полягає в підтримці високої концентрації клітин і забезпеченні необхідних умов для безперервного виробництва антибіотика без необхідності подальшого вирощування клітин. Іммобілізація клітин може забезпечити багато операційних та економічних переваг, таких як подовжена метаболічна активність, повторне використання біокатализатора та

					НУХТ БТЕК 05.01.16 КР ПЗ				
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>					
<i>Розроб.</i>		Пустовойт А.М.			РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА				
<i>Консульт.</i>				<i>Лім.</i>				<i>Адк.</i>	<i>Актуальн.</i>
<i>Керівник</i>		Удимович В.М.						13	90
<i>Н. Контр.</i>				Кафедра БТМ					
<i>Зав. каф.</i>		Стабніков В.П.							

запобігання вимивання клітин при вищих швидкостях потоку бродіння.

Найкращі результати були при використанні в якості матриці к-карагенану. Клітини *Nocardia mediterranei* OVA5-E7 іммобілізували в матриці к-карагенану (4%) і використовували для виробництва рифаміцину SV. Період ферментації для кожної партії був зафіксований на рівні 5 днів. Результати вказують на збільшення вироблення рифаміцину SV від 48 годин до 96 годин (4865 мг/л), а пізніше спостерігалось незначне збільшення виходу рифаміцину. Виявлено, що максимальний вихід рифаміцину SV становить 4865 мг/л через 120 год [8].

***Nocardia mediterranei* NCIM 5008.** Виходячи з потреби, було проведено послідовне покращення мутаційного штаму з використанням УФ-променів та EtBr, що призвело до покращеного штаму, який виробляв рифаміцин SV до 4,32 г/л. Була проведена подальша оптимізація шести важливих факторів бродіння, які включають температуру, перемішування, рівень інокулята, період бродіння, джерело неорганічного азоту та амінокислоти. Таким чином, максимальний вихід становив 5,32 г/л рифаміцину SV [9].

Проведемо порівняння зазначених штамів згідно даних узагальнюючої таблиці 2.1. *Nocardia mediterranei* NCIM 5008 має найменшу вартість 1 л поживного середовища, найменшу умовну вартість 1 г цільового продукту та найбільший вихід цільового продукту – 5,32 г/л. Тому обираємо штам *Nocardia mediterranei* NCIM 5008 для розроблення технології одержання рифаміцину.

Особливості одержання рифаміцину на суміші ростових субстратів

Продуцент	Склад поживного середовища		Тривалість культивування, год	Концентрація продукту	Особливості процесу біосинтезу	Література
	Компонент	Концентрація, г/л				
<i>Nocardia mediterranei</i> VA18	Соєве борошно	20	288	2,450 г/л	28 °С, 200 rpm, pH 7.2	[7]
	Арахісове борошно	20				
	Глюкоза	25				
	(NH ₄) ₂ SO ₄	7				
	KH ₂ PO ₄	3				
	CaCO ₃	6				
	Розчин мікроелементів:					
	MgSO ₄ ×7H ₂ O	1				
	C ₄ H ₃ N ₂ NaO ₃	2				
	(NH ₄) ₂ MoO ₄	0,001				
	MnSO ₄ ×7H ₂ O	0,004				
	ZnSO ₄ ×7 H ₂ O	0,05				
	FeSO ₄ ×7H ₂ O	0,01				
CuSO ₄ ×5H ₂ O	0,0033					
<i>Nocardia mediterranei</i> OVA5-E7	Глюкоза	20	120	4,865 г/л	28 °С, 200 rpm, pH 7.2	[8]
	KH ₂ PO ₄	3				
	K ₂ HPO ₄	1,5				
	Дріжджовий екстракт	5				
	Пептон	5				
	Розчин мікроелементів:					
	MgSO ₄ ×7H ₂ O	1				
	FeSO ₄ ×7H ₂ O	0,016				
ZnC ₄ H ₆ O ₄	0,001					

Закінчення табл. 2.1

<i>Nocardia mediterranei</i> NCIM 5008	Соеве борошно	20	120	5,32 г/л	26 °C, 250 rpm, pH 7.2	[9]
	Арахісове борошно	20				
	Глюкоза	20				
	(NH ₄) ₂ SO ₄	6				
	CaCO ₃	4				
	Розчин мікроелементів:					
	ZnSO ₄ ×7H ₂ O	0,001				
	MnSO ₄ ×7H ₂ O	0,05				
	CoCl ₂ ×6H ₂ O	0,004				
	CuSO ₄ ×5H ₂ O	0,002				
	(NH ₄) ₂ MoO ₄	0,0033				

Таблиця 2.2

Вартість поживних середовищ для культивування різних штамів *Nocardia mediterranei* з метою одержання рифаміцину

Продуцент	Компонент поживного середовища	Концентрація у ПС, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації (1, 2, 3)*	
<i>Nocardia mediterranei</i> VA18	Соеве борошно	20	61,66	1,2	1	
	Арахісове борошно	20	138,38	2,76	1	
	Глюкоза	25	110	2,75	2	
	(NH ₄) ₂ SO ₄	7	47	0,329	3	
	KH ₂ PO ₄	3	4,16	0,012	1	
	CaCO ₃	6	87	0,522	3	
	Розчин мікроелементів:					
	MgSO ₄ ×7H ₂ O	1	110	0,11	2	
	C ₄ H ₃ N ₂ NaO ₃	2	92 760	185,52	4	
	(NH ₄) ₂ MoO ₄	0,001	5 630	0,005	3	
	MnSO ₄ ×7H ₂ O	0,004	150	0,0006	3	
	ZnSO ₄ ×7 H ₂ O	0,05	102	0,0051	3	
	FeSO ₄ ×7H ₂ O	0,01	47	0,00047	3	
	CuSO ₄ ×5H ₂ O	0,0033	1 950	0,006	3	
	Вартість 1 л середовища – 193,22 грн					
<i>Nocardia mediterranei</i> OVA5-E7	Глюкоза	20	110	2,2	2	
	KH ₂ PO ₄	3	4,16	0,012	1	
	K ₂ HPO ₄	1,5	630	0,945	3	
	Дріжджовий екстракт	5	4 508	22,54	4	
	Пептон	5	1 120	5,6	4	
	Розчин мікроелементів:					

Закінчення табл. 2.2

	MgSO ₄ ×7H ₂ O	1	110	0,11	2
	FeSO ₄ ×7H ₂ O	0,016	47	0,0007	3
	ZnC ₄ H ₆ O ₄	0,001	402	0,0004	3
	Вартість 1 л середовища – 31,408 грн				
<i>Nocardia mediterranei</i> NCIM 5008	Соеве борошно	20	61,66	1,23	1
	Арахісове борошно	20	138,38	2,76	1
	Глюкоза	20	110	2,2	2
	(NH ₄) ₂ SO ₄	6	47	0,282	3
	CaCO ₃	4	87	0,348	3
	Розчин мікроелементів:				
	ZnSO ₄ ×7H ₂ O	0,001	102	0,0001	3
	MnSO ₄ ×7H ₂ O	0,05	150	0,0075	3
	CoCl ₂ ×6H ₂ O	0,004	3150	0,0126	5
	CuSO ₄ ×5H ₂ O	0,002	1 950	0,0039	3
	(NH ₄) ₂ MoO ₄	0,0033	5 630	0,018	3
		Вартість 1 л середовища – 6,84 грн			

Примітка. * - Ціни наведено станом на березень 2024 року. 1 - <https://prom.ua/ua/>; 2 - <https://himreagent.com.ua/ua/>; 3 - <https://klebrig.com.ua/ua/>; 4 - <https://shop.hlr.ua/ua/>; 5 - <https://novohim.com.ua>.

Таблиця 2.3

Розрахунок умовної вартості 1 г рифаміцину

Продуцент	Концентрація цільового продукту, г/л	Тривалість культивування, год	Кількість утвореного цільового продукту за годину, г/год	Вартість 1 л середовища, грн/л	Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г
<i>Nocardia mediterranei</i> VA18	2,450	288	0,008	193,22	78,8
<i>Nocardia mediterranei</i> OVA5-E7	4,865	120	0,04	31,408	6,4
<i>Nocardia mediterranei</i> NCIM 5008	5,32	120	0,04	6,84	1,2

2.2. Розрахунок складу поживного середовища

Тривалість культивування 120 год, концентрація рифаміцину в культуральній рідині становить 5,32г/л.

Розрахунок вмісту в середовищі джерела вуглецевого живлення

Потреби для синтезу рифаміцину. Як джерело вуглецю для одержання рифаміцину використовуються глюкоза. Розрахуємо, скільки вуглецю (за елементом С) міститься в 5,32 г рифаміцину. Молекулярна маса рифаміцину становить 697,7. Отже, у 697,7 г рифаміцину ($C_{37}H_{47}NO_{12}$) міститься 444 г Карбону, а в 5,32 г рифаміцину $(5,32 \times 444,0) / 697,7 = 3,4$ г Карбону.

Далі розрахуємо, у скількох грамах глюкози міститься 3,4 г Карбону. Молекулярна маса глюкози ($C_6H_{12}O_6$) – 180. У 180 г глюкози міститься 72 г Карбону, а 3,4 г Карбону міститься у $(3,4 \times 180) / 72 = 8,5$ г глюкози. Враховуючи, що при вирощуванні мікроорганізмів на глюкозі близько 40% субстрату окислюється до CO_2 для одержання енергії, необхідної для конструктивного метаболізму, вміст глюкози у середовищі становитиме $(8,5 \times 0,4) + 8,5 = 11,9$ г/л.

Потреби для синтезу біомаси.

Кількість глюкози необхідної для синтезу біомаси = $20,0 - 11,9 = 8,1$ г. Оскільки під час вирощування продуценту на глюкозі близько 40 % субстрату використовується на «холосте окиснення» для одержання енергії, тому щоб синтезувати необхідну кількість біомаси у середовище необхідно внести x $0,4 + x = 8,1$; $x = 5,7$ г глюкози. У такій кількості глюкози міститься $5,7 \cdot 72 / 180 = 2,3$ г Карбону. У біомасі міститься 50 % Вуглецю, тому 2,3 г такого елемента міститься у $2,3 \cdot 2 = 4,6$ г біомаси.

Розрахунок вмісту в середовищі джерела азотного живлення

Потреби для синтезу біомаси. Припустимо, що у біомасі міститься 10 % Нітрогену. Таким чином, у 4,6 г біомаси вміст азоту (за елементом N) становить 0,46 г.

Продуцент рифаміцину може асимілювати як джерело азотного живлення неорганічний Нітроген. Розрахуємо кількість даної сполуки,

необхідну для одержання 0,46 г/л нітрогену. Молекулярна маса $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ становить 132,14. Отже, у 132,14 г сульфату амонію міститься 28 г Нітрогену (N), тоді 0,46 г Нітрогену буде міститись у $(132,14 \times 0,46) / 28 = 2,17$ г солі. Для одержання 4,6 г/л біомаси вміст $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ у середовищі культивування повинен становити 2,17 г/л.

Інші компоненти середовища

Джерелами таких необхідних для росту елементів, як Сульфур є сіль сульфату цинку ($\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$), сульфату мангану ($\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) і сульфату цинку ($\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$), хлору – хлорат кобальту ($\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$), молібдену – молібдат амонію ($(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$), які не можуть лімітувати ріст продуцента рифаміцину (як і інших мікроорганізмів), оскільки зазвичай вноситься у середовище у надлишку.

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

Морфологічні характеристики зростаючих колоній на чашках з агаром Беннетта показують значні морфологічні варіації, як зазначено в таблиці 2.8 та показано на малюнку 2.1. Крім того, спостерігалися значні варіації у виробленні рифаміцину В різними типами колоній (таблиця 2.8). Найбільший вихід рифаміцину В отримано при використанні колонії типу 1, яка має оранжево-червоний колір, форму розетки, без порожнистого центру і діаметром 2-3 мм [10].

Таблиця 2.4

Морфологічні характеристики різних колоній *Nocardia mediterranei* на агаризованому середовищі Беннетта та відповідне виробництво рифаміцину

Тип колонії	Діаметр, мм	Морфологічна характеристика	Виробництво рифаміцину, г/л
1	2-3	Оранжево-червоний, розетковий, край нерівний	1,03-1,2
2	3-5	Помаранчевий, слизовий, сплюснений, нерівний край	0,95-1

3	7-10	Оранжево-червоний, нерівний край, що загинається до центру	0,76-0,82
4	3-5	Помаранчевий, слизовий, порожнистий центр, нерівний край	0,5-0,6
5	5-7	Червонувато-помаранчевий, слизовий, закруглений, неправильний край	0,7-0,8
6	1-2	Червонувато-коричневий, слизовий, нерівний край	0,62-0,7

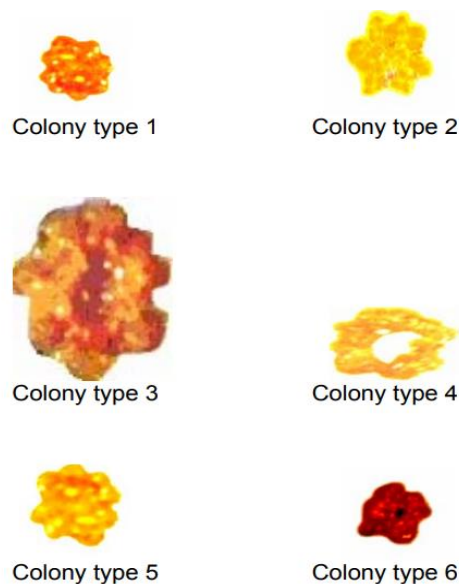


Рис. 2.1. Різні типи колоній *Nocardia mediterranei*, вирощені на пластинах із агаром Беннетта (18х).

Мікроскопічне дослідження культури у вегетативному середовищі (V1) шести типів колоній показало наявність грампозитивних коротких тонких ниток, розташованих радіально навколо порожнистих центрів, і жодних спор виявити не вдалося (рис. 2.2). Мікроскопічне дослідження культури в ферментаційному середовищі (F1) змінювалося з часом, коли міцелій демонстрував часте розгалуження на ранній експоненціальній фазі (день 2–4), після чого посилювалося розгалуження та подальша поступова фрагментація на короткі палички (день 4–6) [10].

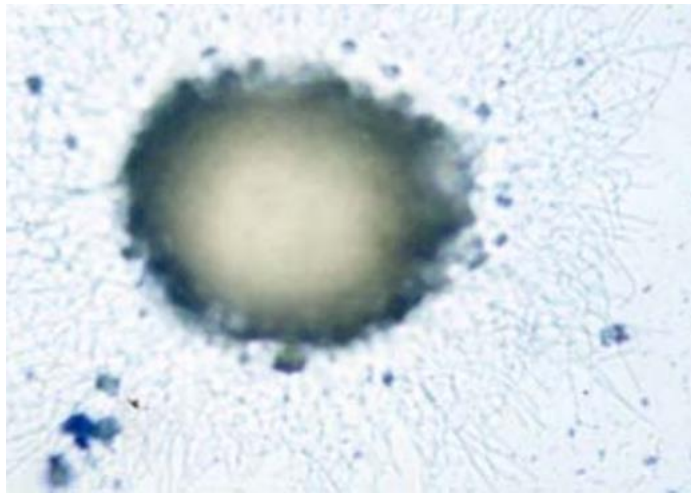


Рис. 2.2. *N. mediterranei*, вирощений на ранній стадії у ферментаційному середовищі (F1), пофарбованим метиленовим синім (1000х).

Культуральні характеристики

- Вівсяний агар: ясний ріст з гладкою поверхнею. Вегетативний міцелій від гіалінового до жовтуватого з рожевим виворотом. Білуватий серійний міцелій з рожевим відтінком. Сліди жовтуватого розчинного пігменту.
- Глюкозний агар з дріжджовим екстрактом. Рясний нарід жовтувато-рожевого кольору з шорсткою поверхнею. Мізерний повітряний міцелій. Відсутність пігментації середовища.
- Глюкозний агар Емерсона. Рясний ріст, жовтувато-рожево-оранжевий з шорсткою поверхнею. Повітряний міцелій стає рожевим. Блідо-бурштиновий розчинний пігмент.
- Агар Бенетта. Хороший ріст, жовтуватий переходить в оранжево-жовтий. Повітряний міцелій стає рожевим. Світло-бурштиновий пігмент.
- Дріжджовий екстракт меласи-агар. Рясний, грубий нарід, від безбарвного до жовтуватого. Білуватий повітряний міцелій. Розчинний пігмент глибокого бурштину.
- Сахарозний агар Чапека-Докса. Поганий ріст, тонка і від безбарвної до світлої дині. Сліди рожево-білого повітряного міцелію. Немає розчинного пігменту.
- Картопляний агар. Поганий ріст тонкий і безбарвний. Сліди білуватого повітряного міцелію. Немає розчинного пігменту.

- Глюкозно-аспарагіновий агар. Помірного росту з гладкою поверхнею. Тонкий вегетативний міцелій світло-оранжево-рожевого кольору з жовтуватим виворотом. Повітряний міцелій відсутній. Трохи світло-жовтого розчинного пігменту.

- Гліцерин-аспарагіновий агар. Так само як глюкозо-аспарагіновий агар.
- Поживний агар. Помірний ріст з гладкою поверхнею; З жовтувато-помаранчевим оборотом. Повітряний міцелій рожево-білий. Розчинний пігмент відсутній [11].

2.4. Фізіолого-біохімічні ознаки

Оптимальна температура 28 °С. При 37 °С відбувається ріст, але ознаки менш чіткі. Асимілює майже всі джерела вуглецю, окрім: рафіноза, інулін, сорбіт, дульцитот, цитрат, ацетат і гліцин [11].

Також різні джерела азоту, такі як сульфат амонію, нітрат амонію, хлорид амонію, ацетат амонію, амоній карбонат, нітрат натрію і нітрат калію асимілюються біологічним агентом [9].

2.5. Таксономічний статус біологічного агента

Історія роду *Amycolatopsis* (*Nocardia mediterranei*) тісно пов'язана з історією відкриття антибіотиків. Рід *Amycolatopsis* раніше широко використовувався як одне з найефективніших джерел продуцентів вторинних метаболітів з антибактеріальними, протигрибковими, або противірусними властивостями і продовжує бути в центрі уваги при пошуку нових ліків сьогодні.

У золоту еру антибіотиків у 1950-х роках було відкрито ванкоміцин і споріднені глікопептиди (*Amycolatopsis orientalis*) і рифаміцин (*Amycolatopsis mediterranei*). Окрім виробництва антибіотиків, повідомлялося про важливість штамів *Amycolatopsis* у промисловості та екології, а саме для біоремедіації (імобілізація важких металів, гербіцидів та біодеградації полімерів) та біоконверсії (виробництво вуксістатину та ваніліну).

Amycolatopsis rifamycinica (*Amycolatopsis smediterranei*) — вид грамполозитивних бактерій роду *Amycolatopsis*. Він виробляє антибіотики

рифаміцину (наприклад, рифаміцин SV), які використовуються для лікування мікобактеріальних захворювань, таких як туберкульоз і проказа. Типовий штам *Amycolatopsis rifamycinica* DSM 46095 був перекласифікований кілька разів. Коли його вперше виділили із зразка ґрунту у Франції в 1957 році, його ідентифікували як *Streptomyces mediterranei*. У 1969 році вид було перейменовано в *Nocardia mediterranei*, оскільки вважалося, що його клітинна стінка нагадує клітинну стінку *Nocardia*. Вид був перейменований в *Amycolatopsis mediterranei* в 1986 році після виявлення того, що він не сприйнятливий до фага *Nocardia* і має клітинну стінку, у якій відсутня міколева кислота, тоді Лешевальє нарешті визнав *Amycolatopsis* як унікальний рід нокардіоформних актиноміцетів, які не містять міколевої кислоти, але містять мезодіамінопімелінову кислоту, арабінозу та галактозу в пептидоглікані клітинної стінки. У 2004 році було визначено, що штам DSM 46095 представляє новий вид, незалежний від *Amycolatopsis mediterranei*, на основі секвенування рибосомальної РНК 16S. Новий вид отримав назву *Amycolatopsis rifamycinica* [11,12]. Таксономічний статус бактерії наступний:

Таблиця 2.5

Таксономічний статус *Nocardia mediterranei*

Домен	<i>Bacteria</i>
Тип	<i>Actinomycetota</i>
Клас	<i>Actinomycetia</i>
Порядок	<i>Pseudonocardiales</i>
Родина	<i>Pseudonocardiaceae</i>
Рід	<i>Amycolatopsis</i>
Вид	<i>A. rifamycinica</i>

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

3.1. Потреба у цільовому продукті

В Україні за 5 місяців 2024 року зареєстровано 20 369 випадків гострих кишкових інфекцій (далі – ГКІ), проти 17 111 за аналогічний період минулого року. Найбільше випадків ГКІ медики зафіксували в Одеській – 2 313, Дніпропетровській — 1 721, Львівській — 1 832 та Вінницькій областях — 1 660.

Час від зараження до перших клінічних проявів захворювання триває від кількох годин до 2-3 діб. Захворювання починається раптово: з'являється нудота, блювота, діарея, спазми в животі. Можлива виражена загальна інтоксикація: головний біль, запаморочення, підвищення температури тіла до 38–39 градусів, слабкість, пересихання слизових оболонок [13].

За даними дослідження, в якому було включено 60 хворих на ГКІ у віці від 18 до 85 років, з них 36 жінок та 24 чоловіків, госпіталізованих в обласну інфекційну клінічну лікарню м. Суми з 01.07.13. по 30.09.13 та з 08.01.14 по 10.04.14. Проводилися визначення стану мікробіоценозу у випорожненнях за загальноприйнятою стандартною методикою та визначення вірусів (у 45пацієнтів) за допомогою швидких тестів.

Етіологічним чинником гострих кишкових інфекцій найчастіше є умовно патогенні мікроорганізми. Часткова доля умовно-патогенних збудників склала 79,1 % (всього 53 виділених культури) - переважно в містах з іншими УПБ, патогенними мікроорганізмами та вірусами. На першому місці серед УПБ були виділені штами *Stococcus aurtaphyeus* в монокультурі та в асоціаціях з іншими УПБ (26,41 %), на другому місці штами *Klebsiella pneumoniae* також в монокультурі та в асоціаціях з іншими УПБ (22,63 %).

Таким чином, дієвим фактом на цей час є зростання ролі умовно-патогенних мікроорганізмів у виникненні гострих кишкових захворювань

					НУХТ БТЕК 05.01.16 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Пустовойт А.М.			РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО- ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ	Літ.	Арк.	Акрушів
Консульт.							26	90
Керівник		Удимович В.М.				Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Зав. каф.		Стабніков В.П.						

серед населення і на сьогодні діагностика ГКІ лишається однією з актуальних проблем системи охорони здоров'я [14].

Рифаксимін, похідний антибіотик від рифаміцину є антибактеріальним агентом, що не має здатності абсорбуватися. В умовах *in vitro* оцінювалася дія рифаксиміну на різні патогени, а саме на ЕТЕС (ентеротоксигенна *E.coli*), ЕАЕС (ентероагрегативна *E.coli*), *Salmonella* spp., *Shigella* spp., Non-V. *Cholerae* vibrios, *Plesiomonas* spp., *Aeromonas* spp., *Campylobacter* spp. Значення МІС90 (мінімальна інгібуюча концентрація) для виділених бактеріальних зразків, яке становило 32 мкг/мл, легко досягається у просвіті кишечника через високі концентрації рифаксиміну у фекаліях [15].

Використовуючи статистику, представлену Центром громадського здоров'я МОЗ України, в бюлетені «Інфекційна захворюваність населення України згідно зі звіт. формою № 1 за грудень і 12 місяців 2016-2017 рр.(в абсолютних числах та інтенсивних показниках на 100 тис. населення)» зазначена сумарна кількість випадків ГКІ, яка складає 113 196 осіб за 12 місяців 2017 року [16].

3.2. Розрахунок потужності виробництва

Для визначення необхідної потужності виробництва необхідно розрахувати кількість рифаксиміну в рік для забезпечення потреб споживачів, що страждають на гострі кишкові інфекції. Розглянемо на прикладі препарату «Альфа Нормікс» із вмістом рифаксиміну 200 мг у 1 таблетці –дорослі і діти мають приймати від 1 таблетки 3 рази на добу до 2 таблеток 2 – 3 рази на добу (відповідає добовій дозі 600 – 1200 мг рифаксиміну). Тривалість лікування не повинна перевищувати 7 днів і залежить від клінічної відповіді на лікування. Отже, 0,6 г рифаксиміну раз на добу протягом 7 днів становить 4,2 г за курс прийому.

Враховуючі вищезгадані статистичні дані, в Україні в рік ГКІ охоплює приблизно 113 196 осіб. Потреба в рік складає $113\ 196 \times 0,0042 \text{ кг} = 475,4232 \text{ кг}$.

Згідно даних Державного реєстру лікарських засобів [17,18] та ресурсу Tabletki.ua [19], препарати, основні в яких використовується рифаксимін, такі як «Альфа Нормікс» та «Ксифаксан» - виробляються італійською компанією «АльфасігмаС.п.А.». Аналогічних препаратів від українського виробника на ринку немає, але для лікування ГКІ використовують не лише цю діючу речовину, тому ми можемо забезпечити $\approx 14\%$ від річних потреб на ринку. Для цього потрібно отримати $475,4232 \text{ кг/рік} \times 0,14169 = 67,3625 \text{ кг/рік}$ рифаксиміну.

Рифаксимін, що є діючою речовиною у препаратах проти ГКІ, виробляється із рифаміцину. Рифаксимін має наступні назви: Рифаміцин L, або напівсинтетичний рифаміцин, 4-дезоксид-4'-метилпіридо-[1',2'-1,2]-імідазо-[5,4-с]-рифаміцин SV [20]. Формула рифаксиміну - $C_{43}H_{51}N_3O_{11}$, молярна маса – $785,891 \text{ г/моль}^{-1}$ [21].

Обробка рифаміцину SV (I) дає 3-броморифаміцин S (II), який після циклоконденсації з 2-аміно-4-метил-піридином (III) у $CHCl_3$ дає похідне іміну (IV). Нарешті, відновлення (IV) L-(+)-аскорбіною кислотою забезпечує цільовий рифаксимін. Вихід рифаксиміну із рифаміцину становить 85% [20].

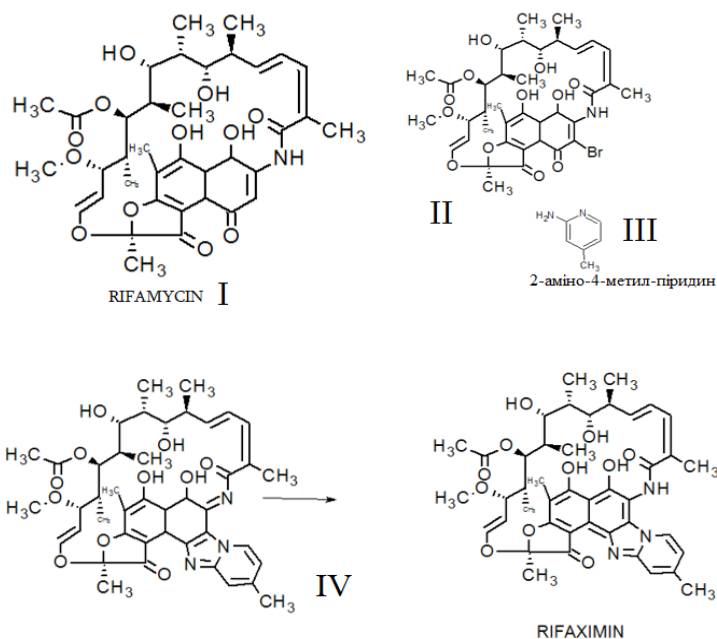


Рис. 3.1. Схема одержання рифаксиміну із рифаміцину [21]


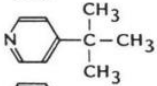


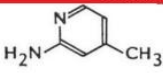
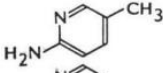
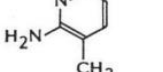
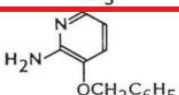
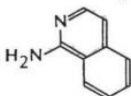
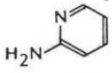
Compound (SV form)	Reacting group	Formula	MW	Yield (%)	Analyses ^a
1	$N(C_2H_5)_3$	$C_{43}H_{61}N_2O_{12}Br$	877.87	55	CHNBr
2		$C_{42}H_{51}N_2O_{12}Br$	855.79	80	CHNBr
3		$C_{46}H_{59}N_2O_{12}Br$	911.89	80	CHNBr
4		$C_{44}H_{53}N_2O_{14}Br$	913.82	30	CHNBr
5		$C_{43}H_{52}N_2O_{13}Br$	898.80	30	CHNBr
6		$C_{43}H_{51}N_3O_{11}$	785.89	85	CHN
7		$C_{43}H_{51}N_3O_{11}$	785.89	85	CHN
8		$C_{43}H_{51}N_3O_{11}$	785.89	85	CHN
9		$C_{49}H_{55}N_3O_{12}$	877.99	50	CHN
10		$C_{46}H_{51}N_3O_{11}$	821.23	45	CHN
11		$C_{42}H_{49}N_3O_{11}$	771.87	85	CHN

Рис. 3.2. Вихід речовин у відсотках та елементний аналіз сполук, що одержуються із рифаміцину [21]

Тобто, щоб одержати 67,3625кг рифаксиміну, нам необхідно 79,25 кг рифаміцину.

Оскільки вихід цільового продукту – рифаміцину - становить 5,32 г/л ($\text{кг}/\text{м}^3$), а потреба в Україні складає 79,2520кг/рік, то розрахуємо об'єм культуральної рідини за рік:

$$V \text{ к.р. річ} = 79,2520 / 5,32 = 14,897 \text{ м}^3$$

Окрім цього, нам необхідно врахувати втрати, які можуть виникнути в процесі виробництва (40%), отже, з урахуванням втрат річний об'єм культуральної рідини становитиме:

$$V \text{ к.р. річ} = 14,897 \text{ м}^3 \times 1,4 = 20,856 \text{ м}^3$$

3.3 Розрахунок кількості виробничих циклів і геометричного об'єму ферментера для біосинтезу рифаміцину

1. Приймаємо кількість трудоднів днів на рік – 300.

2. Кількість культуральної рідини за один цикл ферментації:

$$V_d = V_{гп} / T_{гп} = 20,856 \text{ м}^3 / 300 = 69,52 \text{ л}$$

3. Кількість продукту за цикл буде становити:

$$V_{цк} = (K_1 * V_d * T_{цф}) / 24 = (1,1 * 69,52 * 128,5) / 24 = 409,5 \text{ л/цикл},$$

де $T_{цф}$ – цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу (120 год) та час підготовки ферментера до роботи (8,5 год). K_1 – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій ($K_1 = 1,1 - 1,5$).

$T_{др}$ – тривалість допоміжних робіт (допоміжні роботи включають: миття та огляд (1,5 год), перевірка на герметичність (1 год), підігрів апарату (0,5 год), стерилізація (1 год), охолодження (1 год), завантаження середовища (2 год), засів (0,5 год), вивантаження культуральної рідини (1 год).

4. Визначаємо геометричний об'єм ферментера:

$$V_r = V_{цк} / K_3 = 409,5 / 0,65 = 630 \text{ л}$$

5. Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_3 = 409,5 / 630 = 0,65 \text{ – не перевищує заданого значення.}$$

3.4 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для біосинтезу рифаміцину

Завдання на проектування для ферментера, у якому буде здійснюватися виробниче культивування *Nocardia mediterranea* NCIM 5008, враховує геометричний об'єм 630 л та коефіцієнт заповнення $K_3 - 0,65$. На основі цього розрахуємо кількість стадій, необхідних для підготовки посівного матеріалу.

Розрахуємо робочий об'єм виробничого ферментера:

$$V_{роб} = 630 \times 0,65 = 409,5 \text{ л}$$

10% від об'єму поживного середовища складає кількість необхідного посівного матеріалу. Отже, для того, щоб одержати 409,5 л культуральної рідини, необхідно:

$$V_{роб1} = 409,5 \times 0,1 = 40,95 \text{ л посівного матеріалу.}$$

Зазначену кількість інокуляту – 40,95 л – можна одержати шляхом культивування бактерій у посівному апараті об'ємом 63 л ($40,95/0,65 = 63$) із коефіцієнтом заповнення $K_3 = 0,65$.

Для засіву посівного апарату об'ємом 63 л (для одержання 40,95 л культуральної рідини) необхідно:

$$V_{\text{роб}2} = 40,95 \times 0,1 = 4,095 \text{ л посівного матеріалу.}$$

Зазначену кількість інокуляту – 4,095 л – можна одержати шляхом культивування бактерій у посівному апараті об'ємом 6,3 л ($4,095/0,65 = 6,3$) із коефіцієнтом заповнення $K_3 = 0,65$.

Для засіву посівного апарату об'ємом 6,3 л (для одержання 4,095 л культуральної рідини) необхідно:

$$V_{\text{роб}3} = 4,095 \times 0,1 = 0,4095 \text{ л або } 409,5 \text{ мл посівного матеріалу.}$$

Таку кількість інокуляту можна одержати шляхом культивування *Nocardia mediterranei* NCIM 5008 у колбах на качалці. Об'єм качалочної колби – 750 мл, в яку вноситься до 150 мл поживного середовища. K_3 для колб – 0,2. Отже:

$$N_{\text{колб}} = V_{\text{роб}3} / (V_{\text{колб}} \times K_{3к}) = 409,5 / (750 \times 0,2) = 2,73 = 3 \text{ колби.}$$

Таким чином, процес одержання посівного матеріалу *Nocardia mediterranei* NCIM 5008 для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 630 л із $K_3 = 0,65$.

РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

Біотрансформація ростового субстрату до цільового продукту наведена згідно даних Кегг [22,23].

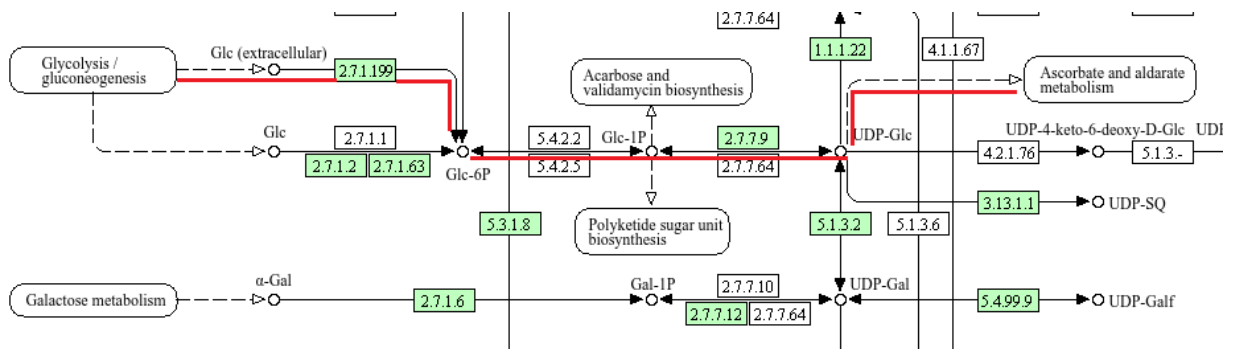


Рис. 4.1. Перетворення глюкози до UDP-глюкози, яка надалі використовується у біосинтетичному шляху

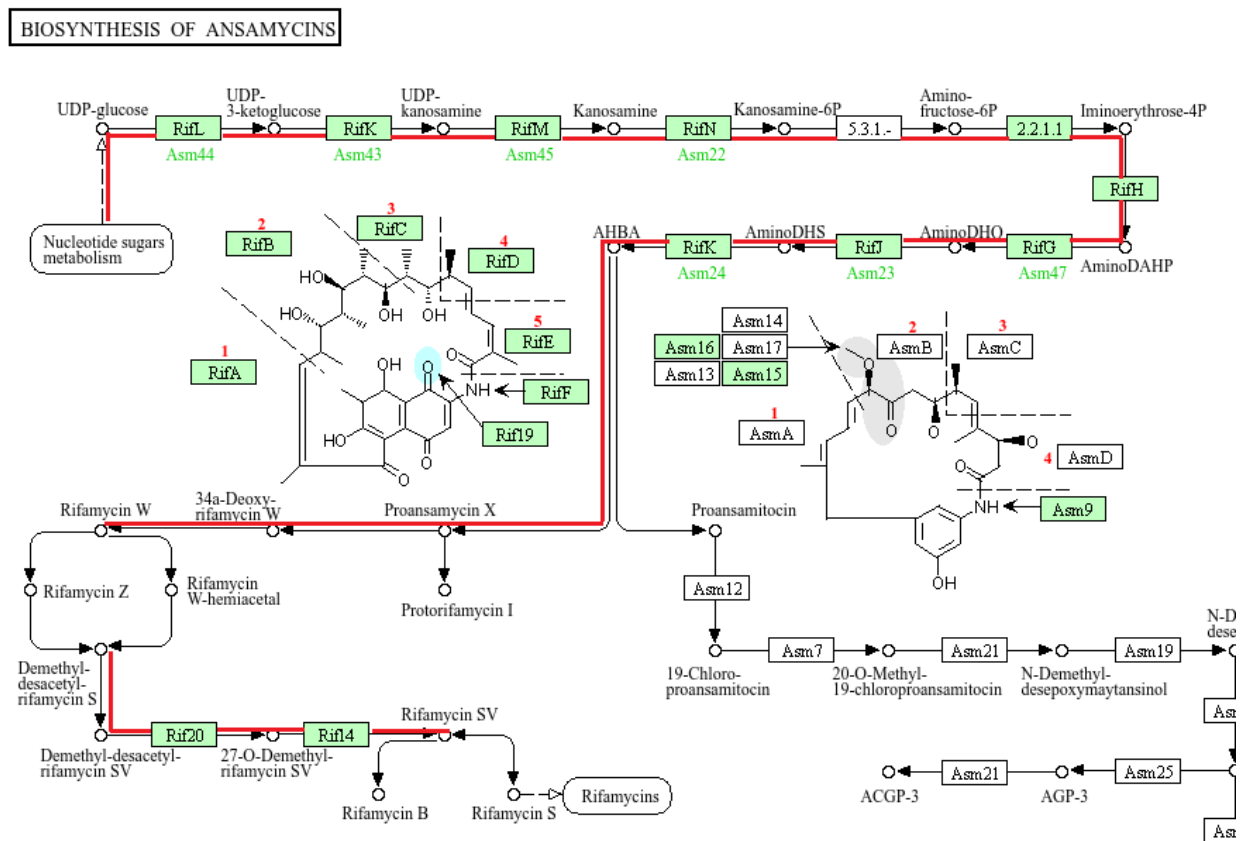


Рис. 4.2. Біосинтез рифаміцинів, починаючи від UDP-глюкози

НУХТ БТЕК 05.01.16 КР ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.		Пустовойт А.М.		
Консульт.				
Керівник		Удимович В.М.		
Н. Контр.				
Зав. каф.		Стабніков В.П.		
РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ				
		Літ.	Арк.	Акрушів
		32	90	
Кафедра БТМ				

РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

5.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Оцінка даних при різних умовах рН показала, що рН 7–9 підходить для виробництва рифаміцину В. Вищий або нижчий рН призводив до зниження продуктивності, однак це зниження є більш вираженим зі збільшенням рН порівняно зі зменшенням. Збільшення рН від 8,0 до 8,6 призвело до 45% зниження, тоді як при рН 7,4 спостерігається лише 19% зниження. Однак у декількох дослідженнях [7] зазначено про оптимальне виробництво рифаміцину В у діапазоні рН 6,7–7,0 та 7,2 відповідно, що вказує на штам-залежну варіацію рН для максимального виробництва антибіотиків [24].

Вплив температури інкубації на продукцію антибіотиків вивчали шляхом моніторингу продукції рифаміцину В у температурному діапазоні 24–32 °С. Аналіз виробництва рифаміцину В показав, що максимальний вихід антибіотика спостерігається при 28 °С інкубованих культурах. Однак різні температурні значення також були зареєстровані в різних мікробних штамів. При будь-якій зміні температури інкубації, відмінної від температури яка необхідна для інкубації конкретного штаму *Nocardia mediterranei*, спостерігалось зниження продукції рифаміцину В. Більш виражений вплив спостерігався при вищих температурах порівняно з низькими. У зазначений умовах відібраний штам продемонстрував максимальну продукцію при рН 7,2 і температурі 28 °С [9, 24].

Оскільки діапазон температури та рН для культивування різних штамів *Nocardia mediterranei* становить 24-32 °С та 6,7 – 8,6, то культивування мікроорганізму має проводитися у стерильних умовах із строгим дотриманням правил асептики, оскільки такі умови культивування є сприятливими для розвитку контамінуючої сторонньої мікрофлори. У досліджених статтях для

					НУХТ БТЕК 05.01.16 КР ПЗ			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Пустовойт А.М.</i>			РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушіє</i>
<i>Консульт.</i>							33	90
<i>Керівник</i>		<i>Удимович В.М.</i>				Кафедра БТМ		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Зав. каф.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						

всіх штамів використовувався глибинний метод культивування з метою одержання рифаміцину [7,8,9].

Бактерія є факультативним аеробом, тому для реалізації культивування із одержанням рифаміцину у кінцевому результаті має передбачати аерацію середовища шляхом подачі стерильного повітря [25].

Отже, культивування *Nocardia mediterranei* NCIM 5008 буде здійснюватися глибинним методом у стерильних умовах, із подачею кисню та за температурного режиму 28 °С та рН 7,2.

5.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря

Оскільки в якості продуценту використовують штам *Nocardia mediterranei* NCIM 5008, який є аеробом, стадія підготовки повітря необхідна, задля забезпечення процесу життєдіяльності продуценту.

Забезпечення ферментеру доцільно влаштувати наступним чином:

1) Через повітрозбірник, за допомогою турбокомпресору на висоті 2-3 м від найвищої точки будівлі, по забірній шахті здійснюється забір порцій атмосферного повітря. Враховуючи висоту ферментера об'ємом 0,63 м³ – 2,4 м, а також висоту поверху –7м, косий дах будівлі ~1,5 м, забір повітря виконують на висоті ~ 11 м.

2) Надалі систему необхідно оснастити фільтрами попередньої очистки, щоб кількість грубих часток у повітрі була зменшена і відповідала нормам первинної очистки повітря. Використовуємо фільтри попередньої очистки виконані із мікроскловолокна.

3) Потім за допомогою компресора очищене повітря стискається(до 0,35 -0,5 МПа), нагрівається до 120-250 °С і це дає змогу підвищити вологість повітря.

4) Повітря за допомогою теплообмінника охолоджується. Краплевловлювачі видаляють зайву вологу.

5) Попередньо очищене повітря подається на фільтри головної очистки. Фільтри видаляють до 98 % мікроорганізмів. Виготовлені фільтри з поліпропілену, що забезпечує його хімічну стійкість.

б) Очищене повітря подається по магістральним трубопроводам у ферментер/інокулятор (ступінь очищення 99,999%).

5.3 Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

Згідно із розрахунками у розділі 3, рифаміцин виробляється протягом 300 днів. Виробництво передбачає встановлення ферментеру об'ємом 630 л, інокуляторів об'ємом 6,3 л та 63 л, реакторів для композицій, установки-качалки, лабораторного мікробіологічного боксу, центрифуги і збірника культуральної рідини, що необхідні для відділення культуральної рідини.

Для організації виробництва антибіотику мають бути передбачені такі приміщення: мікробіологічна лабораторія (зберігання і робота із робочими культурами, контроль якості), приміщення із установкою-качалкою для колб, приміщення для вирощування інокуляту і біосинтезу і приміщення виділення антибіотику. Прийmemo, що в приміщеннях відстань між апаратами і між стінами 1,5 м, для зручності доступу і очистки під час прибирання. Розміри обладнання наведено у *табл. 5.1*.

Таблиця 5.1

Розміри обладнання, що використовується під час виробництва

Апарат	Об'єм, л	Діаметр, м	Висота, м
<i>I</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
Інокулятор	6,3	0,3	0,61
Інокулятор	63	0,3	0,61
Інокулятор	630	0,77	2,4
Реактор змішувач	50	0,19	0,4
Реактор змішувач	15	0,25	0,5
Реактор змішувач	15	0,25	0,5
Збірник	500	-	-
Центрифуга	500	-	-
Всього	1779,3	-	-

Згідно із інформації з *табл. 5.1* загальний об'єм виробничого обладнання складає 1779,3 л. Можна розрахувати об'єми мийних і дезінфікуючих засобів, необхідних для очистки приміщень виробництва. Схематичне зображення

приміщень отримання культуральної рідини *N. mediterranei* зображено на *рис. 5.1*

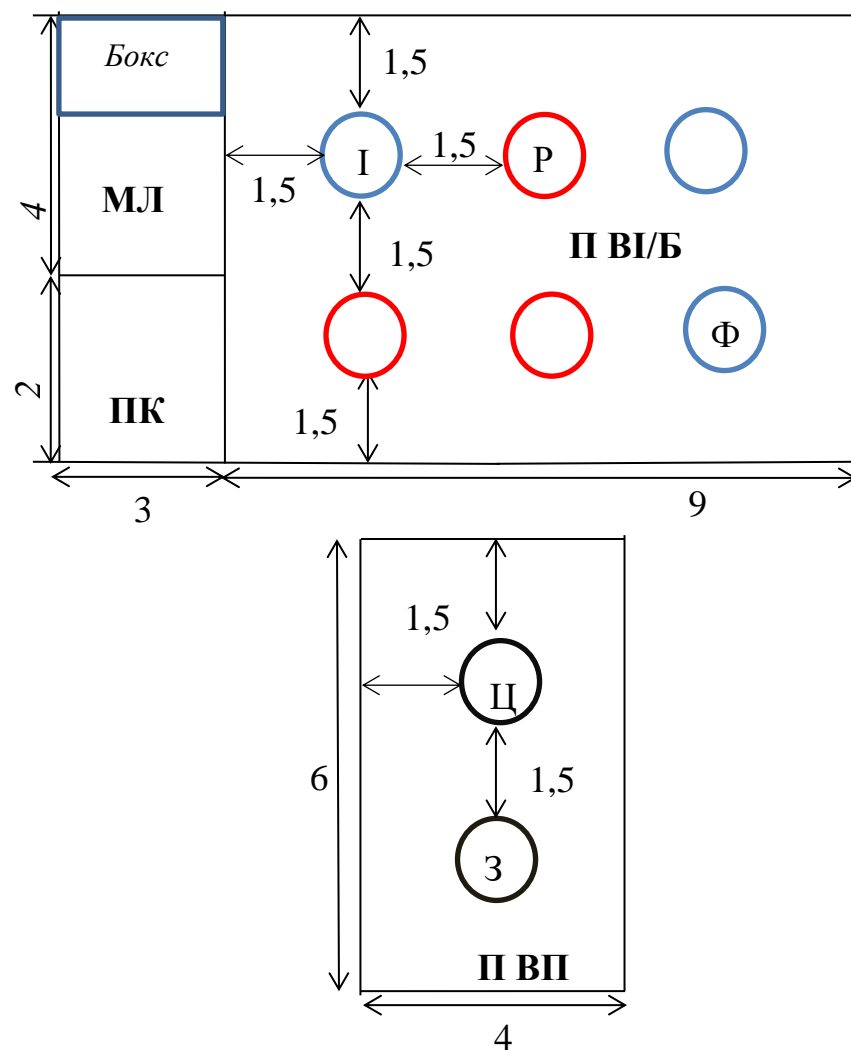


Рис. 5.1 Умовне зображення виробничого приміщення

ПВІ/Б – приміщення для вирощування інокуляту / біосинтезу;

МЛ – мікробіологічна лабораторія;

ПК – приміщення з установкою-качалкою.

ПВП – приміщення виділення продукту

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

Підлога у приміщеннях буде митися щодня (300 разів) аби підтримувати належний рівень чистоти. З періодичністю 2 рази на місяць будуть проводити обробка стін, вікон і дверей (генеральні прибирання – 21 раз). Тепер можна розрахувати кількості миючих засобів для обробки. Згідно із *рис. 5.1*, враховуючи висоту приміщень в 7 м, площа підлоги приміщення для вирощування інокуляту / біосинтезу становить 54 м² (6 м × 9 м), площа стін –

$((6\text{ м} \times 7\text{ м}) \times 2 + (9\text{ м} \times 7\text{ м})) \times 2 = 210\text{ м}^2$, загальна площа – $54\text{ м}^2 + 210\text{ м}^2 = 264\text{ м}^2$. Для мікробіологічної лабораторії площа підлоги: $4\text{ м} \times 3\text{ м} = 12\text{ м}^2$, площа стін – $((4\text{ м} \times 7\text{ м}) \times 2 + (3\text{ м} \times 7\text{ м})) \times 2 = 108\text{ м}^2$, загальна площа – $12\text{ м}^2 + 108\text{ м}^2 = 120\text{ м}^2$. Для приміщення з качалками площа підлоги: $2\text{ м} \times 3\text{ м} = 6\text{ м}^2$, площа стін – $((2\text{ м} \times 7\text{ м}) \times 2 + (3\text{ м} \times 7\text{ м})) \times 2 = 60\text{ м}^2$, загальна площа – $6\text{ м}^2 + 60\text{ м}^2 = 66\text{ м}^2$. Площа підлоги приміщення для виділення антибіотику 24 м^2 ($6\text{ м} \times 4\text{ м}$), площа стін – $((6\text{ м} \times 7\text{ м}) \times 2 + (4\text{ м} \times 7\text{ м})) \times 2 = 140\text{ м}^2$, загальна площа – $24\text{ м}^2 + 140\text{ м}^2 = 164\text{ м}^2$.

Сумарна площа поверхонь обробки миючими засобами наведена в *табл. 5.2*.

Таблиця 5.2

Розрахунок сумарної площі стін та підлоги приміщень

Приміщення	Площа підлоги, м ²	Площа стін, м ²	Загальна площа, м ²
Приміщення вирощування інокуляту / біосинтезу	54	210	264
Мікробіологічна лабораторія	12	108	120
Приміщення з установкою-качалкою	6	60	66
Приміщення виділення антибіотику	24	140	164
Разом	96	518	614

Необхідно визначити періодичність із якою буде митися обладнання. Загальний об'єм культуральної рідини становить 20 856л, а об'єм культуральної рідини за 1 цикл дорівнює 409,5л/цикл, то кількість виробничих циклів (циклів миття) становить: $20\ 856\text{ л} / 409,5\text{ л/цикл} = 51\text{ цикл}$. Враховуючи додаткове миття після останнього циклу виробництва, загальна кількість буде становити 51. Тоді загальний об'єм миття (*див. табл. 5.3*):

$$1,77 \times 51 = 90,27\text{ м}^3$$

Розрахунок площ миття / дезінфекції під час виробничого процесу

Об'єкт	Площа / об'єм об'єкту, м ² / м ³	Періодичність миття / дезінфекції під час виробничого процесу	Загальна площа / об'єм, м ² /м ³
Обладнання	1,77м ³	51	90,27 м ³
Підлога	96 м ²	300	28 800 м ²
Стіни, двері, вікна	518 м ²	21	10 878м ²

Вибір мийних / дезінфікуючих засобів для промислового виробництва рифаміцину

В інструкціях по застосуванню різних миючих / дезінфікуючих засобів зазначено, що витрата робочих розчинів на 1 м² становить в середньому 100 мл.

Оскільки в реакторах/ інокуляторах / ферментері передбачено встановлення СІР-мийки, то під час подачі миючих засобів в середину апаратів, витрата мийного засобу буде становити близько 50 % від об'єму посудини. Тоді для одного циклу миття знадобиться: 1770 л × 0,5 = 885 л робочого розчину миючого засобу, а для всього періоду виробничого процесу: 885 л × 51 = 45135 л. Загальна площа всіх поверхонь (див. табл. 5.3) складає 28 800 м² + 10 878 м² = 39 678 м². Тоді кількість миючого / дезінфікуючого розчину складає: 39 678 м² × 100 мл = 3967,8 л.

Підбір мийного / дезінфікуючого засобу для виробництва

Стадія очистки і дотримання санітарних норм є одною із основних елементів успішного ведення біотехнологічного процесу, оскільки дає змогу знизити ризики мікробного забруднення і перехресної контамінації до мінімуму. Тому вибір діючих миючих / дезінфікуючих засобів є дуже відповідальним процесом і до них висуваються наступні вимоги:

- легка розчинність у воді;
- зручність у використанні;
- безпечність для оброблюваних матеріалів;
- відсутність впливу на смакові якості, колір, запах продукту;

- ефективність проти значної кількості мікроорганізмів;
- екологічність та безпечність для людини.

Розрахунок вартості і витрат мийних та дезінфікуючих засобів наведено у *табл.5.4.*

Вартість / витрати мийних / дезінфікуючих засобів під час виробництва рифаміцину

Назва	Концентрація робочого розчину, %	Об'єкт миття / дезінфекції	Площа /об'єм миття / дезінфекції об'єкту, м ² /м ³	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
Efir C-12¹	4,0%	Обладнання	90,27	35100	81	3,24	113724
EFIR ПРО-АКТИВ²	1,0 %	Обладнання	90,27	35100	196	1,96	68 796
EFIR Perox-Dez³	1,0 %	Стіни/підлога/ вікна	39 678	3967,8	153	1,53	6070,7
EFIR DEZO⁴	4,0 %	Стіни/підлога/ вікна	39 678	3967,8	120	4,8	19045,4

Примітка. Вартість засобів наведено станом на січень 2025 р.: 1. https://prom.ua/p1168816304-moyuschee-sredstvo-dlya.html?srsId=AfmBOoolWb8qtXfMUrtDpvuCKJj_Ln_AiieuI-agulMe46GayUkolXNb, 2 - <https://prom.ua/p1392321726-dezinfitsiruyuschee-sredstvo-dlya.html?srsId=AfmBOooQUROFa4IvxCzVzPQdYhJyIUB8P2ejCRoANFPpysPS4Dyg-Vik>, 3 -https://prom.ua/p1780613209-perekis-vodoroda-efir.html?srsId=AfmBOopZyBQi0ZhU3Tq1mh_esFTiOJ2mxdZCMQgdj_gY3fdDiXyoh3ad, 4 -<https://rozetka.com.ua/401542092/p401542092/>

* **розрахунок вартості 1 л робочого розчину описано для мийного засобу «Efir C-12»:**Ціна 1 л становить 81грн, концентрація його робочого розчину –4,0 %, тому в 1000 мл робочого розчину міститься 40 мл (0,04 л) концентрату. Таким чином вартість 4 % розчину становить:81 грн × 0,04 л = 3,24 грн/л.

Миючі засоби

Миючий засіб Efir C-12 – лужний пінний дезінфікуючий миючий засіб з активним хлором. Призначений для миття та дезінфекції будь-якого обладнання та інвентарю з нержавіючої сталі. Ефективно видаляє органічні забруднення білкової та жирової природи. Склад: вода підготовлена, гідроксид натрію 25 %, поверхнево-активні речовини 10 %, гіпохлорид натрію. Робочий розчин 3-5 %. Термін зберігання – 2 роки [30].

Миючий засіб EFIR ПРО-АКТИВ – пінний засіб призначений для миття та дезінфекції виробничого обладнання та інвентарю. Прозора рідина або з жовтуватим кольором, щільністю 1,0...1,1 кг/дм³, має концентрацію водневих іонів (рН) 7,0...9,0, без запаху, або з легким запахом миючих засобів, не містить фосфати. Склад: вода підготовлена, комплекс амонійних четвертинних сполук, біоцид, поверхнево-активні речовини, комплексоутворюючі компоненти. Робоча концентрація 0,5-1,5 %. [31].

Порівнявши два засоби, доцільніше обрати миючий засіб **EFIR ПРОАКТИВ**, оскільки **Efir C-12** містить у складі хлоровмісну сполуку, а також тому, що ціна засобу **EFIR ПРО-АКТИВ** майже у два рази менша.

Дезінфікуючі засоби

Дезінфікуючі засоби дозволяють суттєво зменшити кількість мікроорганізмів на поверхнях, летально впливаючи на структуру клітини і внутрішньоклітинні процеси, до прийняттого в конкретній ситуації рівня.

Для порівняння розглянемо 2 дезінфікуючі засоби:

Дезінфікуючий засіб EFIR Perox-Dez – рідка безбарвна речовина на основі перекису водню, щільністю 1,11...1,12 кг/дм³, величина рН 3,0...5,0, з сильно вираженими окислювальними властивостями. Препарат являється дезінфікуючим засобом нового покоління, не спінюється і може використовуватися в холодному і гарячому вигляді, в режимі СІП-миття. Не шкідливий для стічних вод, не містить фосфати, саморозкладаючий на прості елементи. Склад: перекис водню 25...35%, функціональні компоненти, стабілізатор. Робоча концентрація 0,5-1,5 %. [32].

Дезінфікуючий засіб EFIR DEZO—Склад: кислота надоцтова, перекис водню, кислота оцтова, стабілізатор, вода підготовлена. Ефективно знищує бактерії групи кишкової палички (БГКП), плісеневі гриби та дріжджі та їх спорові форми. Область застосування: дезінфекція, дезінфекція та санітарна обробка на поверхонь приміщень об'єктах біотехнологічної, мікробіологічної, парфумерно-косметичної промисловості. Робоча концентрація 3,0-5,0 % Термін зберігання – 2 роки [33].

Порівнявши дезінфікуючі засоби **DEZALDUM 20** і **EFIR DEZO**, для проведення дезінфекції варто обрати **DEZALDUM 20**, оскільки перекис водню є більш екологічним засобом, ціна якого у 3 рази менша за вартість засобу **EFIR DEZO**.

5.4 Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Біосинтез рифаміцину здійснюється у ферментері об'ємом 630 м³. Підготовка посівного матеріалу відбувається у чотири стадії (в колбах на качалці, у посівних апаратах об'ємом 6,3 л, 63 л, і 630 л).

Згідно із інформацією зі статті [Додаток 1] склад поживного середовища для виробничого культивування має такий вигляд (г/л):

Таблиця 5.5

Соеве борошно	20
Арахісове борошно	20
Глюкоза	20
(NH ₄) ₂ SO ₄	6
CaCO ₃	4
Розчин мікроелементів:	
ZnSO ₄ ×7H ₂ O	0,001
MnSO ₄ ×7H ₂ O	0,05
CoCl ₂ ×6H ₂ O	0,004
CuSO ₄ ×5H ₂ O	0,002
(NH ₄) ₂ MoO ₄	0,0033

*Дозування компонентів вказані в одиницях г/л.

Для максимально ефективного біосинтезу обов'язково є дотримання умов стерильності поживного середовища, яке використовується для вирощування *Nocardia mediterranea*. Компоненти поживного середовища розділяють на відповідні композиції, щоб правильно обрати режими стерилізації.

Так як для вирощування у колбах на качалках посівного матеріалу потрібен невеликий об'єм поживного середовища, то він стерилізується в автоклаві. Наступні стадії одержання інокуляту та виробничого біосинтезу, підготовку компонентів середовища будемо здійснювати в окремих реакторах-змішувачах. Соєве борошно, арахісове борошно та глюкозу стерилізуємо окремо через термолабільність. (Важливо зазначити необхідність підготовки композиції Б та В окремо для запобігання утворення нерозчинного осаду CaSO_4)

Таблиця 5.6

Склад композицій

Композиція А	Соєве борошно
	Арахісове борошно
	Глюкоза
Композиція Б	Амоній сульфат - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
Композиція В	Карбонат кальцію - CaCO_3
Розчин мікроелементів	Гептагідрат сульфату цинка – $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$
	Гептагідрат сульфату мангану - $\text{MnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$
	Гексагідрат кобальт хлорид - $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$
	Гептагідраткупрум сульфат – $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$
	Молибдат амонію - $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$

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

Необхідно підготувати загальний об'єм інокуляту 409,5 мл, що дорівнює заповненню трьох колб. Маніпуляції із внесення середовища у колби та посів інокуляційної культури проводиться в ламінарному боксі в асептичних умовах.

Композиція А: м'ясний екстракт, пептон, дріжджовий екстракт, гідролізат казеїну (режим стерилізації 120°C , під тиском 0,1 МПа протягом 20-30 хв)

Композиція Б: Глюкоза (режим стерилізації 120 °С, під тиском 0,1 МПа впродовж 40-60 хв)

Композиція В: Хлорид натрію, цитрат натрію (режим стерилізації 131 °С, під тиском 0,15 МПа впродовж 40-60 хв)

Таблиця 5.7

Композиції та режими їх стерилізації для культивування у колбах на качалках

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 409,5 мл поживного середовища, г	Композиції	Об'єм композиції	Режим стерилізації
М'ясний екстракт	5	2,0475	А	150 мл	120°С, під тиском 0,1 МПа протягом 20-30 хв
Пептон	5	2,0475			
Дріжджовий екстракт	5	2,0475			
Гідролізат казеїну	2,5	1,02375			
Глюкоза	2	0,819	Б	150	112°С, під тиском 0,05 МПа впродовж 20-30 хв
Хлорид натрію	1,5	0,61425	В	109,5	131 °С, під тиском 0,15 МПа впродовж 40-60 хв
Цитрат натрію	0,0259	0,0106			
Усього	409,5 мл				

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

Підготовка посівного матеріалу передбачає приготування 4,095 і 40,95 л стерильного поживного середовища.

Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 6,3 л

Для цієї стадії необхідно 4,095 л поживного середовища, склад композиції та умови їх стерилізації аналогічні пункту 2.2.1. Композиції стерилізується в автоклаві.

Композиція А: соєве борошно, арахісове борошно, глюкоза (режим стерилізації 112 °С, під тиском 0,05 МПа протягом 20-30 хв)

Композиція Б: Амоній сульфат – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (режим стерилізації 131 °С, під тиском 0,15 МПа впродовж 40-60 хв)

Композиція В: Карбонат кальцію – CaCO_3 (режим стерилізації 131 °С, під тиском 0,15 МПа впродовж 40-60 хв)

Таблиця 5.8

Композиції та режими їх стерилізації для культивування у посівному апараті об'ємом 6,3 л

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 4,095 л поживного середовища, г	Композиції	Об'єм композиції	Режим стерилізації
Соєве борошно	20	81,9	А	2054,05 мл	112 °С, під тиском 0,05 МПа протягом 20-30 хв
Арахісове борошно	20	81,9			
Глюкоза	20	81,9			
Амоній сульфат – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	6	24,57	Б	1024,57 мл	131 °С, під тиском 0,15 МПа впродовж 40-60 хв
Карбонат кальцію – CaCO_3	4	16,38	В	1016,38 мл	131 °С, під тиском 0,15 МПа впродовж 40-60 хв
Усього	4,095 л				

Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 63 л

Для цієї стадії необхідно 40,95 л поживного середовища, склад композицій та умови їх стерилізації аналогічні пункту 2.2.1. Композиції стерилізуються у автоклаві та реакторі.

Таблиця 5.9

Композиції та режими їх стерилізації для культивування у посівному апараті об'ємом 63 л

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 40,95 л поживного середовища, г	Композиції	Об'єм композиції	Режим стерилізації
Соєве борошно	20	819	А	38,5405 л	112 °С, під тиском 0,05 МПа протягом 20-30 хв
Арахісове борошно	20	819			
Глюкоза	20	819			
Амоній сульфат – (NH ₄) ₂ SO ₄	6	245,7	Б	1,2457 л	131 °С, під тиском 0,15 МПа впродовж 40-60 хв
Карбонат кальцію – CaCO ₃	4	163,8	В	1,1638 л	131 °С, під тиском 0,15 МПа впродовж 40-60 хв
Усього				40,95 л	

5.4.3. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу

Для цієї стадії необхідно 409,5 л поживного середовища, склад композицій та умови їх стерилізації аналогічні пункту 2.2.1. Композиція А стерилізується в реакторі, а композиція Б,В в ферментері.

Таблиця 5.10

Композиції та режими їх стерилізації для культивування у ферментері об'ємом 630 л

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 409,5 л поживного середовища, г	Композиції	Об'єм композиції	Режим стерилізації
Соєве борошно	20	8190	А	385,405	112 °С, під тиском 0,05 МПа протягом 20-30 хв
Арахісове борошно	20	8190			
Глюкоза	20	8190			

Амоній сульфат – (NH ₄) ₂ SO ₄	6	2 457	Б	12,457 л	131 °С, під тиском 0,15 МПа впродовж 40-60 хв
Карбонат кальцію – CaCO ₃	4	1 638	В	11,638 л	131 °С, під тиском 0,15 МПа впродовж 40-60 хв
Усього	409,5 л				

5.4.4 Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН та піногасника

Культивування продуценту і біосинтез рифаміцину *Nocardia mediterranei* передбачає підготовку титрувальних агентів. Розчини для регуляції рН необхідні задля забезпечення нормального синтезу цільового продукту. Обраний продуцент демонструє найбільший синтез при рН = 7,2.

В якості буферних розчинів було обрано розчини гідроксиду натрію та соляної кислоти, у концентраціях по 6%.

Таблиця 5.11

Вміст титрувальних агентів у різних об'ємах поживного середовища на відповідних стадіях культивування

Об'єм середовища, л	Соляна кислота 6%		Гідроксид натрію 6%	
	Вміст, мл	Ємність для приготування	Вміст, мл	Ємність для приготування
409,5	819	Колба об'ємом 2 л	819	Колба об'ємом 2 л
40,95	81,9	Колба об'ємом 200 мл	81,9	Колба об'ємом 200 мл
4,095	8,19	Колба об'ємом 20 мл	8,19	Колба об'ємом 20 мл

Отже, технологічна схема, крім стадій підготовки поживного середовища, включає додаткову стадію з приготування та стерилізації 6% розчинів NaOH і HCl.

Крім того, необхідно передбачити реактори для приготування та стерилізації композицій, об'ємами: 6,3 л, 63 л, 630 л.

РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

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

Таблиця 6.1

Специфікація обладнання для виробництва рифаміцину

Позиція	Найменування	К-сть	Технічні характеристики (за даними виробника)
1	2	3	4
ПЗ-1	Повітрязабірник	1	Прямокутний повітряний пелюстковий клапан ССК ТМ-KOL-60-30 Виробник: ССК ТМ; Діапазон температур: -30 до +50 °С; Швидкість повітря крізь переріз: від 12 м/с; Матеріал: Алюміній; Габаритні розміри, мм: 600 x340 мм [34].
Ф-2	Фільтр попереднього очищення	1	Фільтри попередньої очистки ФВК G4 Виробник: TWE Group; Матеріал: поліестр, мікроскловолокно, для рамки оцинкована сталь, н/ж сталь. Продуктивність: 7200 м ³ /год; Опір: 45 Па; Габаритні розміри, мм: 1195 x 59 5x 225 [26].
К-3	Компресор	1	Гвинтовий безмасляний компресор EAGLE 315 Виробник: DALGAKIRAN; Продуктивність: 50,10 м ³ /год; Тиск: 7 бар; Потужність: 315 кВт; Габаритні розміри, мм: 3685x2140x6300 [27].
Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Промисловий осушувач МХ-60L Виробник: Махтон; Продуктивність: до 400м ³ /год; Тип: Компресорний Площа поверхні теплообміну: 150 м ² ; Потужність: 710 Вт; Габаритні розміри, мм:365 x 396 x 650 [28].
Р-5	Ресивер	1	Ресивер Виробник: Компресормаш-Сервіс; Робочий об'єм: 1,5 м ³ ; Тиск: 12 бар [29];

НУХТ БТЕК 05.01.16 КР ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.		Пустовойт А.М.		
Консульт.				
Керівник		Удимович В.М.		
Н. Контр.				
Зав. каф.		Стабніков В.П.		
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ				
		Літ.	Арк.	Акрушіє
			49	90
Кафедра БТМ				

Продовження табл. 6.1

Т-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Калорифер СФО-7,5 (ПНЕ-7,5) електричний Виробник: Укрвентсистеми; Продуктивність: 600до м ³ /год; Тип: електричний Потужність: 7,5 кВт; Габаритні розміри, мм: 82 x 122 x 162 [35];
Ф-7	Фільтр головного очищення	1	Фільтр тонкого очищення повітря Виробник: Вент-фільтр; Матеріал: мікроскловолокно Продуктивність: 600 м ³ /год; Опір: 250 Па; Габаритні розміри, мм: 305 x 305 x 150 [36].
ІФ-8, ІФ-13, ІФ-23	Фільтри індивідуального очищення	3	Магістральні фільтри очищення стисненого повітря модель SPF005 Виробник: Коприг; Продуктивність: 75 м ³ /год; Опір: 16 бар; Габаритні розміри, мм: 23 x 116 x 16,1 x 74 [37].
І-9	Посівний апарат об'ємом 6,3 л	1	Біореактор BR100-С1 (під замовлення) Виробник: Lab1st Матеріал: нержавіюча сталь SS316L, боросилікатне скло; Об'єм геометричний та робочий: 6,3 л та 4,095 л; Датчики: РТ100 (температури), DO, піни, рН. Тиск: 0,15 МПа; Швидкість обертання: 50-1000 rpm; Тип вивантаження: самоплином; Габаритні розміри, мм:300×315×618 [38].
Р-10	Реактор об'ємом 50 л для приготування композиції А	1	Скляний хімічний реактор Kogi DF-50L Виробник: Ukrchemgroup; Матеріал: нержавіюча сталь із покриттям з РТФЕ 12 мм; Швидкість обертання:60-600 rpm; Діапазон температур: від -120 до +200 °С; Габаритні розміри, мм:400×190 [39]
Д-11	Дозатор води для реактору об'ємом 50 л для приготування композиції А	1	ТЕКНА EVO APG 803 NHH0000 Виробник: Seko Потужність: 22,2 Вт Продуктивність: 54 л/год Тиск: 3 бар [40].
Н-12	Насос від реактору об'ємом 50 л для композиції А	1	Мембранний насос Sera тип RF409.2-180e Виробник: Hennlich Матеріал: EPDM із захисним РТФЕ-покриттям, нержавіюча сталь 1.4571; Продуктивність: до 180 л/год; Робочий тиск: 4 бари; Потужність: 0,18 кВт [41].

Продовження табл. 6.1

I-14	Посівний апарат об'ємом 63 л	1	<p>Біореактор об'ємом 63 л (під замовлення) Виробник: Ruianglobalmachinery LTD\$ Матеріал: нержавіюча сталь SS316L Об'єм геометричний та робочий: 63 л та 40,95 л; Датчики: PT100 (температури), DO, піни, рН. Швидкість обертання: 50-500rpm; Тип вивантаження: труба перетискання; Габаритні розміри, мм: 300×315×618[42].</p>
P-15, P-16	Реактори об'ємом 15 л для приготування композицій Б та В	2	<p>Реактор 15 л Виробник: ХімМіст; Матеріал: нержавіюча сталь AISI 316; Швидкість обертання: 25-500 rpm; Тиск: 4 атм; Діапазон температур: до 160°C; Габаритні розміри, мм: 250 x 500 [43]</p>
Д-17, Д-18	Дозатори води для реакторів об'ємом 15 л для приготування композицій Б та В	2	<p>Насос-дозатор eONE MF пропорційного дозування3005 Виробник: Etatron; Продуктивність: 30 л/год; Тиск: 5 бар [44]</p>
ВД-19, ВД-20	Вагові дозатори для реакторів об'ємом 15 л для приготування композицій Б та В	2	<p>Дозатор ваговий ДВСВ-S Виробник: Politechnik Продуктивність: від 0,25 до 25 кг Клас точності – 0,1% [45].</p>
Н-21, Н-22	Насоси від реакторів об'ємом 15 л для приготування композицій Б та В	2	<p>Мембранний насос Sera тип RF409.2-50e Виробник: Hennlich Матеріал: EPDM із захисним PTFE-покриттям, нержавіюча сталь 1.4571; Продуктивність: до 50 л/год; Робочий тиск: 10 бари; Потужність: 0,18 кВт [46].</p>
Ф-24	Ферментер об'ємом 630 л	1	<p>Stationary bioreactor– 630 L Виробник: Sys Bio Tech; Матеріал: AISI 316L для частин, що контактують із середовищем, та AISI 304L для частин, що не контактують. Об'єм геометричний та робочий: 630 л та 409,5 л; Датчики: PT100 (температури), DO, піни, рН, рівня. Швидкість обертання: 20-1500rpm; Габаритні розміри, мм: внутрішній діаметр 630 мм, зовнішній діаметр 770 мм; Корпус посудини становить 700 мм, загальна висота з мішалкою і ніжками близько 2400 мм [47].</p>

Закінчення табл. 6.1

Д-25	Дозатор води для ферментеру	1	Насос дозуючий SEKO MS1C165C51C4000 Виробник: Seko Потужність: 0,37 кВт Продуктивність: 500 л/год Тиск: 3 бар [48].
ВД-26	Ваговий дозатор для ферментеру	1	Ваговий дозатор AF – 25К Виробник: ТензоМір; Матеріал: SS304, вуглецева сталь; Продуктивність: до 25 кг [49].

РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

ДР 1. Підготовка стерильного повітря для аерації

ДР 1.1. Забір атмосферного повітря [50]

ДР 1.2. Попереднє очищення повітря (від крупних часток розміром 5-10 мкм)

В якості фільтруючих матеріалів у фільтрах попереднього очищення використовують багатошарові дротяні сітки, набивання зі стружок металів, з полімерних матеріалів, із грубих мінеральних і синтетичних волокон. В якості фільтрів попереднього очищення застосовуються також губчаті фільтри з модифікованого пінополіуретану. Ефективність уловлювання атмосферного пилу на пінополіуретані становить 50-85 %, його пилоємність - 0,2 кг/м². Гранична робоча температура використання пінополіуретану дорівнює 121 °С.

ДР 1.3. Компресіонування повітря

Потужність компресора підбирають із таким розрахунком, щоб забезпечити подачу повітря через всю систему очищення у ферментатори й щоб у процесі культивування підтримувався надлишковий тиск 0,01-0,03 МПа. На шляху проходження від компресора до ферментатору повітря переборює опір: у системі апаратів і комунікацій (близько 0,03 МПа); у фільтруючому шарі (близько 0,02 МПа); опір стовпа рідини у ферментаторі (0,04-0,06 МПа); при виході з барботажного пристрою в результаті розширення (0,01-0,02 МПа).

Для стиснення й нагнітання повітря можна використовувати поршневі компресори або турбокомпресори. Щодо цього кращими технологічними характеристиками володіють турбокомпресори, у яких стиснення повітря відбувається під дією відцентрової сили. Вони більш складні в обслуговуванні, але мають високу продуктивність (від 100 до 1000 м³ /хв) і не забруднюють повітря маслом.

					НУХТ БТЕК 05.01.16 КР ПЗ			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Пустовойт А.М.</i>			РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушів</i>
<i>Консульт.</i>							53	90
<i>Керівник</i>		<i>Удимович В.М.</i>				Кафедра БТМ		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Зав. каф.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						

ДР 1.4. Охолодження повітря з ціллю видалення надлишкової вологи

Стиснення повітря супроводжується його сильним нагріванням, тому після компресорів повітря надходить у холодильник. Щоб видалити з повітря зайву вологу, його необхідно прохолоджувати до температури нижче крапки роси. Перед фільтрами встановлюють одну більшу ємність (ресивер) або систему невеликих посудин, які служать для вирівнювання тиску в системі й забезпечення рівномірної подачі повітря на фільтри.

ДР 1.5. Нагрівання повітря

Повітря нагрівається до 70-80 °С. Далі повітря прямує на знепліднення спочатку в головний, а потім в індивідуальні фільтри.

ДР 1.6. Очищення повітря у головному фільтрі (груба очистка повітря від частинок розміром 1-1,5 мкм)

Ефективність очищення повітря в головних фільтрах від часток діаметром 1 -1,5 мкм тобто бактеріальних забруднень повітря, досягає 98 %.

Широке поширення у якості фільтруючого матеріалу головних фільтрів одержали волокнисті матеріали. Волокнисті фільтри є фільтрами об'ємної дії, тому що вони розраховані на вловлювання й нагромадження часток не тільки на поверхні фільтруючого матеріалу, але й і глибині шару. Для фільтруючого матеріалу з певним діаметром волокна характеристики очищення можна змінювати, збільшуючи щільність упакування волокна у фільтрі або товщину шару матеріалу.

Найбільш оптимальним є застосування багатошарової конструкції однорідної волокнистої насадки з різною щільністю шарів, що дає значне збільшення пилоємності й терміну служби фільтра при порівняно невеликому опорі потоку повітря, високої ефективності фільтрування й невеликих габаритів фільтра. При такій конструкції більш пухкі шари розташовуються першими по ходу руху газів. Товщину першого шару вибирають у межах 50-60 % загальної товщини насадки. Останній шар насадки роблять значно більш щільним і зневеликою товщиною, він лімітує ефективність усього фільтра.

На підприємствах мікробіологічної промисловості в головних фільтрах знайшов застосування фільтруючий матеріал з базальтових волокон. Основним достоїнством базальтового волокна є висока паростійкість (більша ніж скляного волокна). При багаторазовому впливі гострої пари під тиском 0,2 МПа волокно не знижує своєї міцності протягом 1 року роботи фільтра. Властивості базальтового волокна при нагріванні до 1100 °С не змінюються. Базальтоне волокно не піддається гниттю й горінню.

ДР 1.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

Стадія тонкого очищення повітря. До цієї стадії пред'являються найбільш тверді вимоги. Для тонкого очищення повітря використовуються індивідуальні фільтри, які встановлюються перед кожним ферментатором і повинні забезпечувати очищення повітря від часток діаметром 0,3 мкм на 99,999 %.

Специфічною вимогою, пропонованою до фільтруючих матеріалів, застосовуваних на даній стадії очищення, є необхідність їхньої періодичної стерилізації гострою парою разом з усім устаткуванням технологічної лінії. Фільтруючі матеріали, використовувані на стадії тонкого очищення, поділяються на кілька груп: тонковолокнисті матеріали у вигляді матів, картону й паперу, зернисті тверді фільтруючі перегородки (керамічні, металокерамічні, з полімерних матеріалів) і мембранні фільтри. У промислових фільтрах тонкого очищення повітря найбільш часто використовуються тонковолокнисті фільтруючі матеріали.

Волокнисті матеріали звичайно формують у вигляді матів-пластин з об'ємною часткою волокон близько 0,1. Волокна втримуються або силами тертя, або за допомогою сполучного матеріалу. До цього виду фільтруючих матеріалів можна віднести базальтоне волокно, скловату, синтетичні волокна (віскоза, перхлорвініл). Волокнисті матеріали можуть бути оформлені також у вигляді картону й паперу. Для таких матеріалів використовують базальтоне супертонке волокно (БСТВ), хлопкасбест, скло, сополімер вінілхлориду і акрилонітрилу. Картон і папір використовуються для ущільнення матів при впакуванні їх у фільтрі. Волокнисті матеріали дешеві, вони мають малий

гідралічний опір (0,01-0,03 МПа) і велику пилоємність, тому вони вважаються досить перспективними для мікробіологічної промисловості. Для підвищення стійкості до впливу гострої пари використовують латексні просочення. Додатково проводять просочення волокон бактерицидними з'єднаннями, наприклад, антибіотиками, гексахлорофеном і іншими речовинами.

Високоєфективними фільтруючими матеріалами є азбестово-целюлозні папери й картони. Волокна целюлози товщиною близько 15 мкм служать каркасом, на якому лежать волокна азбесту товщиною в десять частки мікрометра, які втримують частки.

ДР 2. Приготування та стерилізація титрувальних розчинів

ДР 2.1. Приготування 6% розчину гідроксиду натрію

ДР 2.1.1. Приготування 819 мл 6% розчину гідроксиду натрію

Попередньо 40,25 г гідроксиду натрію зважуються на технічних терезах. У колбу об'ємом 2 л додається 40,25 гідроксиду натрію до 778,75 мл води, відміряних у мірному циліндрі. Вміст колби перемішують, закривають короком, стерилізують у автоклаві за режиму для солей при 131 °С, під тиском 0,15 МПа впродовж 40-60 хв.

ДР 2.1.2. Приготування 81,9 мл 6% розчину гідроксиду натрію

Попередньо 4,025 г гідроксиду натрію зважуються на технічних терезах. У колбу об'ємом 200 мл додається 4,025 гідроксиду натрію до 77,875 мл води, відміряних у мірному циліндрі. Вміст колби перемішують, закривають короком, стерилізують у автоклаві за режиму для солей при 131 °С, під тиском 0,15 МПа впродовж 40-60 хв. І куди далі іде цей розчин?

ДР 2.1.3. Приготування 8,19 мл 6% розчину гідроксиду натрію

Попередньо 0,4025 г гідроксиду натрію зважуються на технічних терезах. У колбу об'ємом 20 мл додається 0,4025 гідроксиду натрію до 7,7875 мл води, відміряних у мірному циліндрі. Вміст колби перемішують, закривають короком, стерилізують у автоклаві за режиму для солей при 131 °С, під тиском 0,15 МПа впродовж 40-60 хв. І куди далі іде цей розчин?

ДР 2.2. Приготування 6% розчину соляної кислоти

ДР 2.2.1. Приготування 819 мл 6% розчину соляної кислоти У мірному циліндрі відміряються 136,5 мл 36% розчину соляної кислоти. У колбу об'ємом 2 л додається 136,5 мл 36% розчину соляної кислоти до 682,5 мл води, відміряних у мірному циліндрі. Вміст колби перемішують, закривають короком, стерилізують у автоклаві за режиму для солей при 131 °С, під тиском 0,15 МПа впродовж 40-60 хв.

ДР 2.2.2. Приготування 81,9 мл 6% розчину соляної кислоти

У мірному циліндрі відміряються 13,65 мл 36% розчину соляної кислоти. У колбу об'ємом 200мл додається 13,65 мл 36% розчину соляної кислоти до 68,25 мл води, відміряних у мірному циліндрі. Вміст колби перемішують, закривають короком, стерилізують у автоклаві за режиму для солей при 131 °С, під тиском 0,15 МПа впродовж 40-60 хв.

ДР 2.2.3. Приготування 8,19 мл 6% розчину соляної кислоти

У мірному циліндрі відміряються 1,365 мл 36% розчину соляної кислоти. У колбу об'ємом 20 мл додається 1,365 мл 36% розчину соляної кислоти до 6,825 мл води, відміряних у мірному циліндрі. Вміст колби перемішують, закривають короком, стерилізують у автоклаві за режиму для солей при 131 °С, під тиском 0,15 МПа впродовж 40-60 хв.

ДР 3. Приготування та стерилізація поживних середовищ для різних етапів культивування

ДР 3.1. Приготування запасного розчину мікроелементів для всіх етапів культивування

Таблиця 7.1

Розрахунок вмісту мікроелементів у різних об'ємах поживного середовища

Об'єм середовища, л	Вміст, мг:					Загальний вміст:
	ZnSO ₄ ×7 H ₂ O	MnSO ₄ ×7 H ₂ O	CoCl ₂ ×6 H ₂ O	CuSO ₄ ×5 H ₂ O	(NH ₄) ₂ MoO ₄	
409,5	409,5	409,5	409,5	409,5	409,5	-
40,95	40,95	40,95	40,95	40,95	40,95	

4,095	4,095	4,095	4,095	4,095	4,095	
0,4095	0,4095	0,4095	0,4095	0,4095	0,4095	
Усього	454,95 мг	454,95 мг	454,95 мг	454,95 мг	454,95 мг	2,274 г

На технічних терезах зважуються $ZnSO_4 \times 7H_2O$, $MnSO_4 \times 7H_2O$, $CoCl_2 \times 6H_2O$, $CuSO_4 \times 5H_2O$, $(NH_4)_2MoO_4$ по 454,95 мг кожного (усього – 2,274 г). Наважку розчиняють у 20 мл води очищеної у колбі та стерилізують у автоклаві при 131 °С, під тиском 0,15 МПа впродовж 40-60 хв.

ДР 3.2. Приготування та стерилізація поживних середовищ для культивування у колбах на качалках (409,5 мл).

ДР 3.2.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних терезах зважують 2,0475 г м'ясного екстракту, 2,0475 г пептону, 2,0475 г дріжджового екстракту та 1,02375 г гідролізату казеїну. Наважку поміщають у колбу об'ємом 200 мл та перемішують у 142,83 мл води очищеної. Колбу закривають корком та стерилізують при 120°C, під тиском 0,1 МПа впродовж 20-30 хв.

ДР 3.2.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних терезах зважують 0,819 г глюкози. Наважку поміщають у колбу об'ємом 200 мл та перемішують у 149,18 мл води очищеної. Колбу закривають корком та стерилізують при 112°C, під тиском 0,05 МПа впродовж 20-30 хв.

ДР 3.2.3. Приготування та стерилізація композиції В

На технічних терезах зважують 0,61425 г хлориду натрію та 0,0106 л цитрату натрію. Наважку поміщають у колбу об'ємом 200 мл та перемішують у 108,87 мл води очищеної. Колбу закривають корком та стерилізують при 131 °С, під тиском 0,15 МПа впродовж 40-60 хв.

ДР 3.3. Приготування та стерилізація поживних середовищ для культивування у посівному апараті об'ємом 6,3 л (4,095 л).

ДР 3.3.1. Заварювання борошна

Наважки соєвого та арахісового борошна відміряють на технічних терезах по 81,9 г кожної. Наважки поміщають у колбу об'ємом 1000 л та розчиняють у питній воді на водяній бані при 80 ° С. Наважки постійно перемішують та заварюють, доки компоненти повністю не будуть однорідні.

ДР 3.3.2. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних терезах зважують 81,9 г глюкози. Попередньо гомогенізоване соєве та арахісове борошно від ДР 3.3.1 поміщається із наважкою глюкози у колбу об'ємом 3 л. Додають 1808,35 мл води очищеної, перемішують, колбу закривають корком та стерилізують при 112 ° С, під тиском 0,05 МПа протягом 20-30 хв.

ДР 3.3.3. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних терезах зважують 24,57 г амоній сульфату. Наважку амоній сульфату поміщають у колбу об'ємом 2 л та перемішують у 1000 мл води очищеної. Колбу закривають корком та стерилізують при 131 ° С, під тиском 0,15 МПа впродовж 40-60 хв.

ДР 3.3.4. Приготування та стерилізація композиції В

На технічних терезах зважують 16,38 г карбонату кальцію. Наважку карбонату кальцію поміщають у колбу об'ємом 2 л та перемішують у 1000 мл води очищеної. Колбу закривають корком та стерилізують при 131 ° С, під тиском 0,15 МПа впродовж 40-60 хв.

ДР 3.4. Приготування та стерилізація поживних середовищ для культивування у посівному апараті об'ємом 63 л (40,95 л).

ДР 3.4.1. Заварювання борошна

Наважки соєвого та арахісового борошна відміряють на технічних терезах по 819 г кожної. Наважки поміщають у колбу об'ємом 2 л та розчиняють у питній воді на водяній бані при 80 ° С. Наважки постійно перемішують та заварюють, доки компоненти повністю не стануть однорідними.

ДР 3.4.2. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних терезах зважують 819 г глюкози. Попередньо гомогенізоване соєве та арахісове борошно від ДР 3.4.1 поміщається із наважкою глюкози у реактор об'ємом 50 л. Подають 36,08 л води очищеної, вмикають перемішуючий пристрій для перемішування композиції. Стерилізують при 112 °С, під тиском 0,05 МПа протягом 20-30 хв.

ДР 3.4.3. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних терезах зважують 245,7 г амоній сульфату. Наважку амоній сульфату поміщають у колбу об'ємом 2 л та перемішують у 1000 мл води очищеної. Колбу закривають корком та стерилізують при 131 °С, під тиском 0,15 МПа впродовж 40-60 хв.

ДР 3.4.4. Приготування та стерилізація композиції В

На технічних терезах зважують 163,8 г карбонату кальцію. Наважку карбонату кальцію поміщають у колбу об'ємом 2 л та перемішують у 1000 мл води очищеної. Колбу закривають корком та стерилізують при 131 °С, під тиском 0,15 МПа впродовж 40-60 хв.

ДР 3.5. Приготування та стерилізація поживних середовищ для виробничого культивування у ферментері об'ємом 630 л (409,5 л).

ДР 3.5.1. Заварювання борошна

Наважки соєвого та арахісового борошна відміряють за допомогою вагового дозатору по 8190 г кожної. Наважки поміщають у ферментер та суспендують у холодній воді. Поступово суміш нагрівається до 80 °С протягом 30 хв, та весь цей час перемішується.

ДР 3.5.2. Приготування та стерилізація композиції А

За допомогою вагового дозатору зважують 8 190 г глюкози. Попередньо гомогенізоване соєве та арахісове борошно від ДР 3.5.1 знаходиться у ферментері. У ферментер подають наважку глюкози, для того щоб не використовувати зайвий реактор. Подають 360,835 л води очищеної, вмикають перемішуючий пристрій для перемішування композиції. Стерилізують при 112 °С, під тиском 0,05 МПа протягом 20-30 хв.

ДР 3.5.3. Приготування та стерилізація композиції Б

За допомогою вагового дозатору зважують 2457 г амоній сульфату. Наважку амоній сульфату поміщають у реактор об'ємом 15 л та перемішують у 10л води очищеної за допомогою перемішувача реактору. Стерилізують при 131 °С, під тиском 0,15 МПа впродовж 40-60 хв.

ДР 3.5.4. Приготування та стерилізація композиції В

За допомогою вагового дозатору зважують 1 638 г карбонату кальцію. Наважку амоній сульфату поміщають у реактор об'ємом 15 л та перемішують у 10 л води очищеної за допомогою перемішувача реактору. Стерилізують при 131 °С, під тиском 0,15 МПа впродовж 40-60 хв.

ТП 4. Підготовка посівного матеріалу

ТП 4.1. Підтримання колекційної культури

Колекційну культуру бактерій *Nocardia mediterranei* NCIM 5008 зберігають у пробірках із повним середовищем (complete medium - CM), яке містило (г/л) наступне: дріжджовий екстракт 3,0, м'ясний екстракт 10,0, глюкозу 4,0 і агар 20,0, рН 7,2.

ТП 4.2. Одержання робочої культури на агаризованих середовищах

Колекційну культуру *Nocardia mediterranei* NCIM 5008 розсівають на чашки Петрі із МПА із метою одержання ізольованих колоній, культивують при 26 °С протягом 24 год.

ТП 4.3. Вирощування посівного матеріалу у пробірках

Одержані ізольовані колонії *Nocardia mediterranei* NCIM 5008 пересівають у пробірки із скошеним МПА. Тривалість вирощування – 24 год при 26 °С. Здійснюється контроль чистоти культури шляхом мікроскопіювання.

ТП 4.4. Вирощування посівного матеріалу у колбах на качалках

У колбу об'ємом 1 л із дотриманням асептичних умов вноситься композиція А (від ДР 3.2.2) об'ємом 205,405 мл, композиція Б (від ДР 3.2.3) об'ємом 102,457 мл та композиція В (від ДР 3.2.4) об'ємом 101,638 мл. Вміст

колби перемішується та розливається по 150 мл у три стерильні качалочні колби об'ємом по 750 мл кожна.

У пробірку із робочою культурою *Nocardia mediterranei* NCIM 5008 (від ТП 4.3) вносять 5 мл фізіологічного розчину та «змивають» культуру, стерильною піпеткою відбирають одержану суспензію бактерій та вносять у качалочні колби із поживним середовищем. Для засіву однієї качалочної колби використовують суспензію із однієї пробірки.

Умови процесу культивування - 26 ° С, 250 rpm, рН 7.2, час вирощування – 24 год.

ТП 4.5. Вирощування культури у посівному апараті об'ємом 6,3 л

В посівний апарат об'ємом 6,3 літри асептично вносять простерилізовані та охолоджені композицію А (від ДР 3.3.2) об'ємом 2054,05 мл, композицію Б (від ДР 3.3.3) об'ємом 1024,57 мл та композицію В (від ДР 3.3.4) об'ємом 1016,38 мл. Рівень рН контролюють та підтримують на значенні рН 7.2 шляхом підкислення або підлужнення 6% розчинами гідроксиду натрію (від ДР 2.1.3) або соляної кислоти (від ДР 2.2.3).

Засів середовища проводиться із посівної колби з використанням посівного матеріалу від ТП 4.4.

Умови процесу культивування - 26 °С, 250 rpm, рН 7.2, час вирощування – 48 год. Вноситься запасний розчин від ДР 3.1.

ТП 4.6. Вирощування культури у посівному апараті об'ємом 63 л

В посівний апарат об'ємом 63 літри асептично вносять простерилізовані та охолоджені композицію А (від ДР 3.4.2) об'ємом 38,5405 л за допомогою труби перетискування із реактору об'ємом 50 л, композицію Б (від ДР 3.4.3) об'ємом 1,2457 л та композицію В (від ДР 3.4.4) об'ємом 1,1638 л. Рівень рН контролюють та підтримують на значенні рН 7.2 шляхом підкислення або підлужнення 6% розчинами гідроксиду натрію (від ДР 2.1.3) або соляної кислоти (від ДР 2.2.3).

Засів середовища проводиться перетискуванням стерильним повітрям посівного матеріалу від ТП 4.5.

Умови процесу культивування - 26 °С, 250 rpm, рН 7.2, час вирощування – 48 год. Вноситься запасний розчин від ДР 3.1.

ТП 5. Виробниче культивування

Композиція А (від ДР 3.5.2) готувалася безпосередньо у реакторі та вже знаходиться у ньому. Охолоджені та простерилізовані розчини композиції Б (від ДР 3.5.3) об'ємом 12,457 л передається за допомогою труби перетискування із реактору об'ємом 15 л, композиції В (від ДР 3.5.4) об'ємом 11,638 л також передається за допомогою труби перетискування із реактору об'ємом 15 л. Рівень рН контролюють та підтримують на значенні рН 7.2 шляхом підкислення або підлужнення 6% розчинами гідроксиду натрію (від ДР 2.1.3) або соляної кислоти (від ДР 2.2.3).

Засів середовища проводиться перетискуванням стерильним повітрям посівного матеріалу від ТП 4.6.

Умови процесу культивування - 26 °С, 250 rpm, рН 7.2, час вирощування – 120 год. Вноситься запасний розчин від ДР 3.1.

РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

8.1. Мікробіологічний контроль

Мікробіологічний контроль чистоти культури бактерій *Nocardia mediterranei*.

Із зразку культуральної рідини готується препарат «роздавлена крапля», а потім досліджується під мікроскопом. Препарат має містити лише бактерії *Nocardia mediterranei*, наявність інших мікроорганізмів свідчить про контамінацію культури. Метод «роздавленої краплі»:

1. На чисте знежирене предметне скло мікробіологічною петлею наносять краплю суспензії мікроорганізмів. Якщо бактеріальна суспензія «густа», тобто у культурі розвинулося дуже багато бактерій, її розводять ізотонічним розчином (0,9 % NaCl).

2. Покривне скло ставлять на ребро з краю краплі та поступово опускають на неї. Між предметним та покривним скельцями не повинно залишатися пухирців повітря, які заважатимуть мікроскопії. У якісно приготованому препараті, крапля повинна бути невеликою, щоб після «роздавлення» рідина не виступала за краї покривного скла.

3. Препарат розглядають

Після устанавлення освітлення приготовлений сухий пофарбований препарат спочатку розглядають із невеликим збільшенням під об'єктивом сухої системи (8x, 40x). Знайшовши найбільш вдале місце на ньому, препарат закріплюють затисками на столику мікроскопа. Тубус мікроскопа піднімають і, повертаючи револьвер, устанавлюють імерсійний об'єктив. Потім у центр препарату на мазок, не знімаючи зі столика мікроскопа, наносять краплю імерсійної олії і, дивлячись збоку, обережно опускають тубус мікроскопа до занурення об'єктива в олію. Після цього, дивлячись в окуляр, макрометричним

					НУХТ БТЕК 05.01.16 КР ПЗ			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Пустовойт А.М.</i>			РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	<i>Лім.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушів</i>
<i>Консульт.</i>							64	90
<i>Керівник</i>		<i>Удимович В.М.</i>				Кафедра БТМ		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Зав. каф.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						

гвинтом повільно піднімають об'єктив до появи у полі зору досліджуваного об'єкта. Фокус уточнюють за допомогою мікрометричного гвинта [51].

Мікробіологічний контроль чистоти поживних середовищ. На поверхню щільного поживного середовища (МПА або сусло-агар) наносять зразок охолодженого поживного середовища, що буде використовуватися для культивування бактерій *Nocardia mediterranei*. Чашки Петрі із зразком досліджуваного середовища перевертають догори дном та поміщають у термостат при 29° С. Підрахунок колоній, що виростили, виконують через 1, 3-5 діб. Найпоширенішим універсальним поживним середовищем в мікробіологічних дослідженнях є м'ясо-пептонний агар (МПА), на сусло-агарі або Сабуро на 5-7 добу ростуть колонії грибів та дріжджів [50].

5.2. Визначення концентрації джерела азоту та вуглецю

Визначення концентрації джерела вуглецю. Для визначення концентрації джерела вуглецю у культуральній рідині використовується кількісний аналіз відновлюючих цукрів 3,5-динітросаліциловою кислотою (метод DNSA)

«Відновлюючі цукри» - це моносахариди та деякі дисахариди, які мають вільну альдегідну (-CHO) або кетонну (-C=O) групу, здатну відновлювати окисники (наприклад, іони Cu^{2+} у реактиві Фелінга або DNS). До них входять глюкоза, маноза та галактоза, та ін моносахариди, і деякі дисахариди, такі як мальтоза, яка також є продуктом метаболізації крохмалю із борошна.

Принцип: Метод заснований на виявленні присутності вільної карбонільної C=O групи відновлюючих цукрів. Початкове окислення кетонної та альдегідної функціональної групи фруктози та глюкози відповідно 3,5-динітросаліциловою кислотою (жовтий колір) до 3-аміно-5-нітросаліцилової кислоти (помаранчево-червоний) у лужному середовищі.

Матеріали та реагенти:

1. 250 мкг/мл 100 мл стандартного розчину відновлюючого цукру.
2. 1% мас./об., 60 мл стандартного розчинника цукру в насиченому розчині бензойної кислоти.

3. 2 моль/л гідроксиду натрію.
4. Розчин тартрату натрію калію (300 г у 500 мл води очищеної)/розчин солі Рошелля.
5. Розчин 3,5-динітросаліцилової кислоти (10 г у 200 мл 2 моль/л гідроксиду натрію).
6. Свіжоприготований реактив динітросаліцилової кислоти [DNS] (розчини 4 і 5 змішати та довести водою до 1 л безпосередньо перед використанням).
7. Кипляча водяна баня
8. 0,5% мас./об. сульфату натрію (використовується для поглинання розчиненого кисню, який може перешкоджати окисленню глюкози)
9. 2,0% мас./об. кристалічного фенолу (використовується як підсилювач кольору)

Процедури:

1. Додають 1 мл реагенту DNSA до 3 мл зразка відновлюючого цукру пробірках із загвинченими кришками.
2. Порожній розчин готують шляхом додавання 1 мл реагенту DNS до 3 мл води очищеної.
3. Поміщають пробірки на киплячу водяну баню на 5 хв і охолодити при кімнатній температурі. Розвивається червоно-коричневе забарвлення.
4. Додають 1 мл розчину сульфату натрію до отримання стійкого забарвлення.
5. Зчитують абсорбцію пробірки при 540 нм проти холостого зразка (для порівняння).
6. Стандартна крива може бути підготовлена та використана для визначення концентрації відновлюючого цукру в невідомих зразках

Застосування: для кількісного аналізу цукрів у щойно приготованих готових до вживання харчових продуктах, підсолоджених фармацевтичних препаратах; у виявленні редукуючих цукрів у процесі ферментації [52].

Визначення концентрації джерела азоту. Для визначення використовується метод К'ельдаля.

У даному випадку, відбувається перетворення органічного та неорганічного азоту в аміак при нагріванні. Враховуючи склад середовища, окрім основного неорганічного джерела вуглецю у вигляді сульфату амонію, ми ще маємо два види борошна, які можуть бути частково органічним джерелом азоту. Метод Несслера та іоноселективний метод, наприклад, застосовуються лише для визначення неорганічного азоту, такого як аміак (NH_3) або іони амонію (NH_4^+). Вони не дозволяють безпосередньо вимірювати органічний азот).

Він включає розщеплення азотовмісних сполук сірчаною кислотою за допомогою тепла та перетворення азоту в іони амонію. Для підвищення температури кипіння розчину кислоти додають сульфат калію. Потім розчин переганяють з їдким натром (NaOH), щоб вивільнити газоподібний аміак, який поглинається розчином сірчаної кислоти. Частина розчину сірчаної кислоти нейтралізується газоподібним аміаком, що виділяється, а надлишок кислоти зворотно титрується гідроксидом натрію. Інформація заснована на даних Official Methods of Analysis, 16 видання, метод 978.02 [53].

Крок 1 — мінералізація зразку

Додайте 15 г K_2SO_4 або 12 г безводного Na_2SO_4 , 0,4 г безводного CuSO_4 або 0,6 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ та приблизно 0,8 г гранул алунду (гранули Hengar, алюміній). Додайте 37 мл розведеної сірчаної кислоти з водою $\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{O}$ (1 + 1, об./об.) або 20 мл концентрованої сірчаної кислоти, якщо є достатня вентиляція. Додайте достатню масу пробної порції, точніше від 0,1000 до 2,800 г для добрив із вмістом азоту від 30 до 5% відповідно. Промийте внутрішню стінку приблизно 10 мл води. Перенесіть колби в попередньо нагрітий (400°C) блочний реактор К'ельдаля та мінералізуйте досліджувані порції протягом 75 хв. Офіційний метод AOAC SM 955.04 або наступні модифіковані версії (970.02 і 978.02) не вказують температуру. Він описує використання попередньо

нагрітого блоку таким чином, щоб довести 250 мл води до кипіння за 5 хвилин. Це відповідає 400°C.

Модифікації етапу 1 включали усунення сульфату міді та алуунду. Також використовували 7–8 г K_2SO_4 замість 15 г і 15 мл концентрованої H_2SO_4 замість 37 мл (1 + 1). Співвідношення K_2SO_4 і H_2SO_4 (1 + 1) становить приблизно 2,5 (37 мл/15 г = 2,466). Суми були відповідно зменшені, але в тому ж співвідношенні. У результаті використовували 7,5–8 г K_2SO_4 і 15 мл концентрованої H_2SO_4 , а стінки пробірок для мінералізації промивали 5–10 мл води, таким чином замість цього використовували 20–25 мл H_2SO_4 (1 + 1). 37 мл. Це підтримує співвідношення K_2SO_4 до H_2SO_4 (1 + 1), як зазначено, але використовує менше реагентів.

Крок 2 — визначення

Вийміть колби з нагрівального блоку та після охолодження (реакційна суміш має бути близько кімнатної температури) промийте внутрішню стінку 20–30 мл води та перемішайте. Підготуйте колбу для прийому дистиляту (колбу Ерленмейера на 300 мл), додавши 30 мл 0,25 N стандартизованої сірчаної кислоти, щоб уловити очікуваний загальний вміст азоту в досліджуваній порції. Додайте 2–3 краплі індикатора метилового пурпуру та встановіть приймач на випускню трубку дистиляційної установки, переконавшись, що кінець вихідної трубки дистиляту повністю занурений у стандартизований розчин кислоти. Встановіть трубку для переварювання на дистиляційну установку. Почніть утворення пари та повільно влийте приблизно 80 мл (30–35%) гідроксиду натрію в колбу. Продовжуйте дистиляцію з водяною парою, поки в приймальній колбі не буде зібрано приблизно 250 мл або більше конденсату пари. Зазвичай для цього потрібно близько 6–8 хв. Якщо колір зміниться на зелений, додайте ще 0,25 N H_2SO_4 , щоб повернути колір до фіолетового, і зафіксуйте кількість доданої кислоти. Титруйте до сірої кінцевої точки (рН 5,7) 0,25 н стандартним NaOH. До кроку 2 не було внесено жодних змін.

Крок 3—Обчислення

Колір дистилляту залежить від кількості загального азоту в досліджуваній порції, яка є функцією кількості аміаку, що потрапив у приймальну колбу. Зелений колір означає, що кислоту в пастці було нейтралізовано аміаком. У цей момент додайте додаткову відому кількість стандартизованої H_2SO_4 , щоб досягти сірої кінцевої точки. Чистий об'єм (у мл) стандартизованої кислоти буде дорівнювати загальній кількості кислоти, спочатку доданої до приймальної колби, плюс кількість кислоти, доданої після дистиляції, щоб досягти сірої кінцевої точки. Синій або фіолетовий колір вказує на те, що в приймальній колбі ще є кислота, і потрібне зворотне титрування NaOH. Чистий об'єм стандартизованої (стандартної) кислоти буде дорівнювати кількості кислоти в приймальній колбі мінус кількість основи, доданої після дистиляції для досягнення сірої кінцевої точки. Масовий відсоток загального азоту розраховується наступним чином [52]:

$$\text{Загальний азот, \%} = \frac{(\text{нетто стандартної кислоти, мл} \times N \text{ стандартної кислоти}) - (\text{нетто стандартної бази, мл} \times N \text{ стандартної бази}) \times 1,4008}{\text{Вага зразку, г}}$$

5.3. Визначення концентрації цільового продукту

Для визначення рифаміцину зразок культуральної рідини об'ємом 1 мл розбавляли 5 мл ацетатного буфера при рН 4,63, і у порожню пробу додавали 0,1 % нітриту натрію в тому самому буфері для зчитування при довжині хвилі 447 нм за допомогою спектрофотометра UV-Vis (Spectronics, Японія) [54]. Нітрогену, що дорівнює 14 (мг азоту)/(1 мл 1 н NaOH)

Дані щодо проведення постадійного контролю виробництва рифаміцину наведено у *табл. 8.1*.

Таблиця 8.1

Карта постадійного контролю виробництва рифаміцину

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю та показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та відбору проб	Нормативні значення показника
Кт 1.2. <i>Попереднє очищення повітря (від крупних часток розміром 5-10 мкм)</i>	Ступінь очищення повітря	Термометр, мікробіологічний контроль	Після проходження повітря через фільтр	E = 85%
Кт 1.3. <i>Компресіонування повітря</i>	Ступінь стиснення повітря, тиск, температура	Манометр, термометр	Після здійснення компресіонування	У системі апаратів і комунікацій (близько 0,03 МПа); у фільтруючому шарі (близько 0,02 МПа);
Кт 1.4. <i>Охолодження повітря з ціллю видалення надлишкової вологи</i>	Температура, вологість	Термометр, гігрометр	Після охолодження повітря у теплообмінному апараті	T = 20-40 °C; W = 60%
Кт 1.5. <i>Нагрівання повітря</i>	Температура	Термометр	Після нагрівання повітря	T = 70-80 °C
Кт 1.6. <i>Очищення повітря у головному фільтрі (груба очистка повітря від частинок розміром 1-1,5 мкм)</i>	Ступінь очищення повітря	Термометр, мікробіологічний контроль	Після проходження повітря через фільтр	E = 98%
Кт 1.7. <i>Очищення повітря в індивідуальному фільтрі</i>	Ступінь очищення повітря	Термометр, мікробіологічний контроль	Після проходження повітря через фільтр	E = 99,999%

Кт, Км, Кх 2.1. Приготування 6% розчину гідроксиду натрію	Розчин гідроксиду натрію Для режиму стерилізації: температура, тиск, час стерилізації, стерильність	Термометр, манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Концентрація внесеного реактиву контролюється та вимірюється у процесі приготування розчину; Температура, тиск та час відслідковуються протягом усього процесу стерилізації; Мікробіологічний контроль здійснюється після стерилізації.	T = 131 °C; P = 0,15 МПа; t = 40-60 хв, Відсутність мікробіоти
Кт, Км, Кх 2.2. Приготування 6% розчину соляної кислоти	Розчин соляної кислоти Для режиму стерилізації: температура, тиск, час стерилізації, стерильність	Термометр, манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Концентрація внесеного реактиву контролюється та вимірюється у процесі приготування розчину; Температура, тиск та час відслідковуються протягом усього процесу стерилізації; Мікробіологічний контроль здійснюється після стерилізації.	T = 131 °C; P = 0,15 МПа; t = 40-60 хв, Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.1. Приготування запасного розчину мікроелементів для всіх етапів культивування	ZnSO ₄ ×7H ₂ O, MnSO ₄ ×7H ₂ O, CoCl ₂ ×6H ₂ O, CuSO ₄ ×5H ₂ O, (NH ₄) ₂ MoO ₄ Для режиму стерилізації: температура, тиск, час стерилізації, стерильність	Термометр, манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура, тиск та час відслідковуються протягом усього процесу стерилізації; Мікробіологічний контроль здійснюється після стерилізації.	T = 131 °C; P = 0,15 МПа; t = 40-60 хв, Відсутність мікробіоти
Кт 3.2.1. Заварювання борошна	Соеве та арахісове борошно Температура, час	Термометр, манометр, годинник.	Температура відслідковується протягом усього процесу перемішування.	T = 80 °C; Однорідність розчину

Кт, Км 3.2.2. Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А Для режиму стерилізації: температура, тиск, час стерилізації, стерильність	Термометр, манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура, тиск та час відслідковуються протягом усього процесу стерилізації; Мікробіологічний контроль здійснюється після стерилізації.	T = 112 °C; P = 0,05 МПа; t = 20-30 хв, Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.2.3. Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б Для режиму стерилізації: температура, тиск, час стерилізації, стерильність	Термометр, манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура, тиск та час відслідковуються протягом усього процесу стерилізації; Мікробіологічний контроль здійснюється після стерилізації.	T = 131 °C; P = 0,15 МПа; t = 40-60 хв, Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.2.3. Приготування та стерилізація композиції В	Композиція В Для режиму стерилізації: температура, тиск, час стерилізації, стерильність	Термометр, манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура, тиск та час відслідковуються протягом усього процесу стерилізації; Мікробіологічний контроль здійснюється після стерилізації.	T = 131 °C; P = 0,15 МПа; t = 40-60 хв, Відсутність мікробіоти
Кт 3.3.1. Заварювання борошна	Соеве та арахісове борошно Температура, час	Термометр, манометр, годинник.	Температура відслідковується протягом усього процесу перемішування.	T = 80 °C; Однорідність розчину
Кт, Км 3.3.2. Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А Для режиму стерилізації: температура, тиск, час стерилізації, стерильність	Термометр, манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура, тиск та час відслідковуються протягом усього процесу стерилізації; Мікробіологічний контроль здійснюється після стерилізації.	T = 112 °C; P = 0,05 МПа; t = 20-30 хв, Відсутність мікробіоти

Кт, Км 3.3.3. Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б Для режиму стерилізації: температура, тиск, час стерилізації, стерильність	Термометр, манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура, тиск та час відслідковуються протягом усього процесу стерилізації; Мікробіологічний контроль здійснюється після стерилізації.	T = 131 °C; P = 0,15 МПа; t = 40-60 хв, Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.3.3. Приготування та стерилізація композиції В	Композиція В Для режиму стерилізації: температура, тиск, час стерилізації, стерильність	Термометр, манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура, тиск та час відслідковуються протягом усього процесу стерилізації; Мікробіологічний контроль здійснюється після стерилізації.	T = 131 °C; P = 0,15 МПа; t = 40-60 хв, Відсутність мікробіоти
Кт 3.4.1. Заварювання борошна	Соєве та арахісове борошно Температура, час	Термометр, манометр, годинник.	Температура відслідковується протягом усього процесу перемішування.	T = 80 °C; Однорідність розчину
Кт, Км 3.4.2. Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А Для режиму стерилізації: температура, тиск, час стерилізації, стерильність	Термометр, манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура, тиск та час відслідковуються протягом усього процесу стерилізації; Мікробіологічний контроль здійснюється після стерилізації.	T = 112 °C; P = 0,05 МПа; t = 20-30 хв, Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.4.3. Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б Для режиму стерилізації: температура, тиск, час стерилізації, стерильність	Термометр, манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура, тиск та час відслідковуються протягом усього процесу стерилізації; Мікробіологічний контроль здійснюється після стерилізації.	T = 131 °C; P = 0,15 МПа; t = 40-60 хв, Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.4.3. Приготування та стерилізація композиції В	Композиція В Для режиму стерилізації: температура, тиск, час стерилізації, стерильність	Термометр, манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура, тиск та час відслідковуються протягом усього процесу стерилізації; Мікробіологічний контроль здійснюється після стерилізації.	T = 131 °C; P = 0,15 МПа; t = 40-60 хв, Відсутність мікробіоти

Кт 3.5.1. Заварювання борошна	Соеве та арахісове борошно Температура, час	Термометр, манометр, годинник.	Температура відслідковується протягом усього процесу перемішування.	T = 80 °C; Однорідність розчину
Кт, Км 3.5.2. Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А Для режиму стерилізації: температура, тиск, час стерилізації, стерильність	Термометр, манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура, тиск та час відслідковуються протягом усього процесу стерилізації; Мікробіологічний контроль здійснюється після стерилізації.	T = 112 °C; P = 0,05 МПа; t = 20-30 хв, Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.5.3. Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б Для режиму стерилізації: температура, тиск, час стерилізації, стерильність	Термометр, манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура, тиск та час відслідковуються протягом усього процесу стерилізації; Мікробіологічний контроль здійснюється після стерилізації.	T = 131 °C; P = 0,15 МПа; t = 40-60 хв, Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.5.3. Приготування та стерилізація композиції В	Композиція В Для режиму стерилізації: температура, тиск, час стерилізації, стерильність	Термометр, манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура, тиск та час відслідковуються протягом усього процесу стерилізації; Мікробіологічний контроль здійснюється після стерилізації.	T = 131 °C; P = 0,15 МПа; t = 40-60 хв, Відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1. Підтримання колекційної культури	Колекційна культуру бактерій <i>Nocardia mediterranei</i> NCIM 5008 Температура, час, мікробіологічна чистота	Термометр, холодильник, мікробіологічний контроль	Температура контролюється під час вирощування культури <i>Nocardia mediterranei</i> NCIM 5008 у термостаті та при зберіганні у холодильнику. Пересів та мікробіологічний контроль здійснюється кожні 2-3 місяці.	T = 2-6 °C; t = 2-3 міс., Відсутність сторонньої мікробіоти

Кт, Км 4.2. Одержання робочої культури на агаризованих середовищах	Культура бактерій <i>Nocardiamediterranei</i> NCIM 5008 Температура, час, мікробіологічна чистота	Термометр, термостат, мікробіологічний контроль	Температура контролюється під час вирощування культури <i>Nocardia mediterranei</i> NCIM 5008 у термостаті. Мікробіологічний контроль здійснюється після культивування.	T = 26 °C; t = 24 год, Відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 4.3. Вирощування посівного матеріалу у пробірках	Культура бактерій <i>Nocardiamediterranei</i> NCIM 5008 Температура, час, мікробіологічна чистота	Термометр, термостат, мікробіологічний контроль	Температура контролюється під час вирощування культури <i>Nocardia mediterranei</i> NCIM 5008 у термостаті. Мікробіологічний контроль здійснюється після культивування.	T = 26 °C; t = 24 год, Відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 4.4. Вирощування посівного матеріалу у колбах на качалках	Температура, час, рН, мікробіологічна чистота	Термометр, годинник, рН-метр, мікробіологічний контроль	Температура, рН, швидкість обертів контролюється під час вирощування культури <i>Nocardia mediterranei</i> NCIM 5008. Мікробіологічний контроль здійснюється після культивування.	T = 26 °C; рН = 7.2; Швидкість обертів = 250 об/хв; t = 24 год, Відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 4.5. Вирощування культури у посівному апараті об'ємом 6,3 л	Температура, час, рН, об/хв, мікробіологічна чистота	Термометр, годинник, рН-метр, тахометр, мікробіологічний контроль	Температура, рН, швидкість обертів контролюється під час вирощування культури <i>Nocardia mediterranei</i> NCIM 5008. Мікробіологічний контроль здійснюється після культивування.	T = 26 °C; рН = 7.2; Швидкість обертів = 250 об/хв; t = 48 год, Відсутність сторонньої мікробіоти

Закінчення табл. 8.1

Кт, Км 4.6. <i>Вирощування культури у посівному апараті об'ємом 63 л</i>	Температура, час, рН, об/хв, мікробіологічна чистота	Термометр, годинник, рН-метр, тахометр, мікробіологічний контроль	Температура, рН, швидкість обертів контролюється під час вирощування культури <i>Nocardia mediterranei</i> NCIM 5008. Мікробіологічний контроль здійснюється після культивування.	Т = 26 °С; рН = 7.2; Швидкість обертів = 250 об/хв; t = 48 год, Відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 5. <i>Виробниче культивування</i>	Температура, час, рН, об/хв, концентрація цільового продукту, мікробіологічна чистота	Термометр, годинник, рН-метр, тахометр, мікробіологічний контроль	Температура, рН, швидкість обертів контролюється під час вирощування культури <i>Nocardia mediterranei</i> NCIM 5008. Мікробіологічний контроль визначається під час культивування з періодичністю у декілька годин.	Т = 26 °С; рН = 7.2; Швидкість обертів = 250 об/хв; t = 120 год, Відсутність сторонньої мікробіоти

РОЗДІЛ 9 ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ

9.1. Аналіз технологічної схеми виробництва рифаміцину на місця емісії твердих, рідких та газоподібних відходів

Виробництво рифаміцину штамом *Nocardia mediterranei* NCIM 5008 включає в себе: допоміжні стадії:

- 1) приготування миючих і дезінфікуючих розчинів;
- 2) приготування та стерилізація розчинів титрувальних агентів;
- 3) приготування і стерилізація композицій поживних середовищ для

виращування інокуляту та виробничого біосинтезу. Виробничі стадії:

- 1) підготовка інокуляту;
- 2) біосинтез рифаміцину.

У табл. 9.1 приведено інформацію по утворенню твердих/рідких/газоподібних відходів під час виконання допоміжних і виробничих стадій.

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	НУХТ БТЕК 05.01.16 КР ПЗ			
Розроб.		Пустовойт А.М.			РОЗДІЛ 9 ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ	Літ.	Арк.	Акрушів
Консульт.							77	90
Керівник		Удимович В.М.				Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Зав. каф.		Стабніков В.П.						

Етапи утворення відходів під час біосинтезу рифаміцину

Етап утворення відходів		Тип і характеристика утворюваних відходів
Допоміжні стадії	Підготовка робочих розчинів миючих / дезінфікуючих засобів	Мийний / дезінфікуючий засіб після використання і промивна вода, що містить залишки цих засобів, потрапляє у каналізацію. Пластикові ємності від засобів передають на сортування і переробку пластику.
	Приготування і стерилізація розчинів титрувальних агентів	Рідкі відходи можуть утворюватися тільки у випадку порушення режиму стерилізації і забруднення готового розчину натрію гідроксиду. В усіх інших випадках 6%-го розчини соляної кислоти і натрію гідроксиду використовуються як регулятори рН і у відходи не потрапляють. Пластикові ємності від засобів передають на сортування і переробку пластику.
	Приготування і стерилізація композицій поживних середовищ для вирощування інокуляту та виробничого біосинтезу	Рідкі відходи можуть утворюватися тільки у випадку порушення режиму стерилізації. Тверді відходи можуть утворюються тільки у випадку невідповідності якості сировини вимогам відділу якості. Пластикові ємності від засобів передають на сортування і переробку пластику.
Виробничі стадії	Підготовка посівного матеріалу	Газоподібні відходи. <i>Nocardia mediterranei</i> потребує постачання кисню для росту і біосинтезу антибіотику, тому необхідна подача стерильного повітря. Під час росту і біосинтезу утворюються об'єми відпрацьованого повітря, які можна повторно використати, встановивши установку рекуперації повітря.
	Біосинтез рифаміцину	Рідкі відходи не утворюються, бо культуральна рідина поступає на наступну стадію вирощування інокуляту/ у збірник після біосинтезу.

9.2. Перспективи впровадження системи екологізації виробництва рифаміцину

9.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів.

Виробництво рифаміцину займає 300 днів. Обладнання обробляють розчином *EFIR ПРО-AKTIB*, у кількості 35100 л за весь період. Для обробки стін, підлоги, вікон та дверей використовують робочий розчин *EFIR Perox-Dez*, в кількості 3967,8 л.

Таблиця 9.2

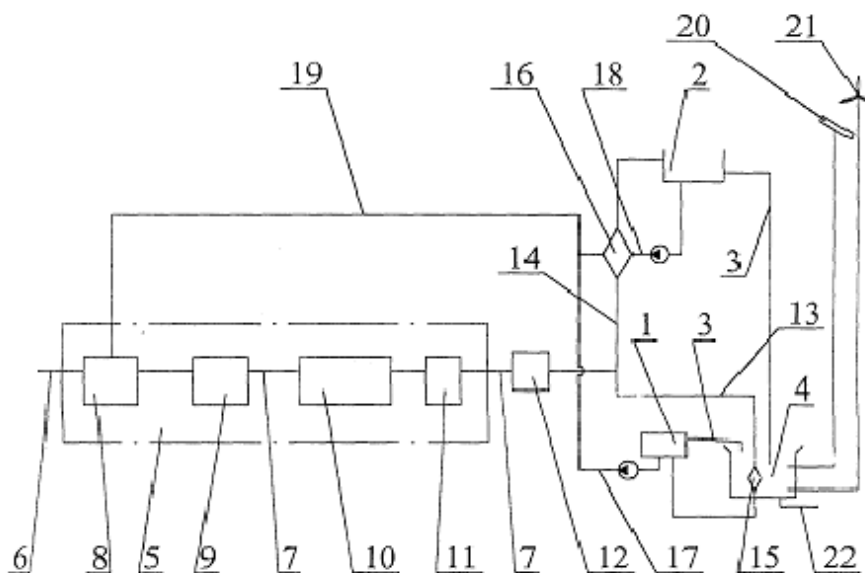
Характеристика рідких відходів виробництва рифаміцину

Назва рідких відходів	Склад відходів	Об'єм відходів на 1 цикл виробництва, л	Клас небезпеки
1,0 % <i>EFIR ПРО-AKTIB</i>	комплекс амонійних четвертинних сполук, біоцид, поверхнево-активні речовини, комплексоутворюючі компоненти	35100	III
1,0% <i>EFIR Perox-Dez</i>	перекис водню, функціональні компоненти, стабілізатор	3967,8	IV
	Усього:	3967,8	

Щоб очистити підрахований об'єм стічних вод розглянемо установку біологічного очищення (рис 9.1). У встановленому перед заморожувачами 1, 2 багатоступеневому біореакторі 5, який розподілено на низку послідовних зон обробки стічної води, в зоні 8 забруднена вода частково, до 50%, біологічно очищуються за рахунок багатократного повторення циклів аерації та перемішування, а також сорбції, при дефіциті кисню повітря, завдяки цьому тут відбувається процес денітрифікації при наявності нітритів та нітратів, які надходять зі зворотнім активним мулом по рециркуляційному трубопроводу 19

та легкоокислюваної органіки, яка надходить по трубопроводу 6 із стічними водами.

В зоні 9, куди мулова суміш потрапляє із зони 8 по транзитному трубопроводу 7 вона також багатократно аерується та перемішується, але тут переважно відбувається окислення сорбованих речовин і починається процес нітрифікації. В зоні 10 відбувається доочистка стічних вод від органіки і нітрифікація, причому мулова суміш аерується, перемішується і відстоюється, потім здійснюється відкачування частково очищених стічних вод ерліфтом в відстійник 11, а мул відкачують в зону 8. Стічні води влітку самопливом після відстійника 11 відводяться через заспокійливу камеру 12, трубопровід 13 та теплообмінник 15 у заморожувач 1, де відбувається її розподілення на два потоки, одним з яких є верхній шар води у фазі льоду, а інший, нижній шар, у вигляді забрудненої води, яку відводять із заморожувача 1 та повертають по трубопроводах 17, 19 на біологічне очищення у зону 8, а утворений лід скидають по лінії 3 у розморозувач 4, в якому встановлений теплообмінник 15 та приймачі теплоти від геліоустановки 20 і вітродвигуна 21. Вода із розморозувача 4 відводиться на господарчі потреби або у навколишнє середовище по лінії 22. Узимку воду після заспокійливої камери 12 спрямовують по трубопроводу 14 через теплообмінник 16 на площадку природного заморожування 2, відкіля утворений лід скидають у розморозувач 3, а фугат по трубопроводах 18, 19 через теплообмінник 16 повертають у зону 8 біореактора 5.[55].



Фіг.

Рис. 9.1 Установа очищення стічних вод

9.2.2. Система знешкодження та утилізації твердих відходів

Тверді відходи (пластикова тара) накопичується після приготування мийних / дезінфікуючих засобів, а також компонентів поживного середовища.

Таблиця 9.3

Тверді відходи, що утворюються після виробництва рифаміцину

Назва твердих відходів	Тип пластику	Приблизна кількість відходів на 1 цикл виробництва, кг	Клас небезпек и
Пластикова тара від мийних /дезінфікуючих засобів	Поліпропілен	0,5	IV
Упаковка відскладових поживного середовища	Поліпропілен/ Полівінілхлорид / поліетилен	0,5	IV
	Усього:	1,0	

Весь пластик, що залишився після виробництва рифаміцину передається на сортування в пункти прийому, а потім перенаправляється до пунктів переробки пластику.

9.2.3. Система знешкодження газоповітряних викидів

Відходи, що утворюються під час вирощування інокуляту та виробничого біосинтезу складаються з вуглекислого газу та аерозольних часточок.

Тривалість вирощування інокуляту в виробничому обладнанні складає 2x48 годин (2x2880 хв), а час виробничого біосинтезу – 120 год (7200 хв). Швидкість подачі стерильного повітря для підтримання аеробних умов культивування складає 1 л/л КР·хв. Для 2-х інокуляторів на 6,3 л, 63 л і ферментеру об'ємом 630 м³, приблизний об'єм відпрацьованого повітря складає: $6,3 \cdot 2880 + 63 \cdot 2880 + 630 \cdot 7200 = 18144 + 181440 + 4\,536\,000 = 4\,735\,584$ л (4735,5 м³).

Система для очистки відпрацьованого повітря працює наступним чином. В ємності 7 завантажують відповідно кожен з них окремо лужними розчинами (NaOH, KOH, LiOH, Ca(OH)₂), герметизують ємності 7 кришками, крізь отвори в яких встановлюють трубопровідні з'єднання, які виконують переважно з гнучких труб або труб з гофрованими вставками. У приміщеннях 13 (згідно з будівельною архітектурою) у відсіки у вікнах 14 прокладають повітрозабірники 1, після герметизації усіх трубних з'єднань вмикають потужний безшумний вентилятор 3, повітря з якого спрямовують у повітророзподільний трубопровід 4, патрубками 5 з якого барботують лужні розчини у ємностях 7, з яких очищене від діоксиду вуглецю повітря крізь патрубки 10 направляють у повітророзбірник 11 очищеного повітря, а з нього на сепаратор 12 для виходу в атмосферу або до установки підготовки очищеного повітря, що подає чисте повітря у виробничі приміщення. Насичені діоксидом вуглецю до остаточної межі лужні розчини з ємностей 7 вилучають шляхом тимчасового припинення постачання брудного повітря. Припинення постачання здійснюють шляхом запирання арматури (запірно-розпірних кранів) 6, що спрацьовує автоматично від блока 8 автоматичного регулювання, оснащеного контролером 9 [56].

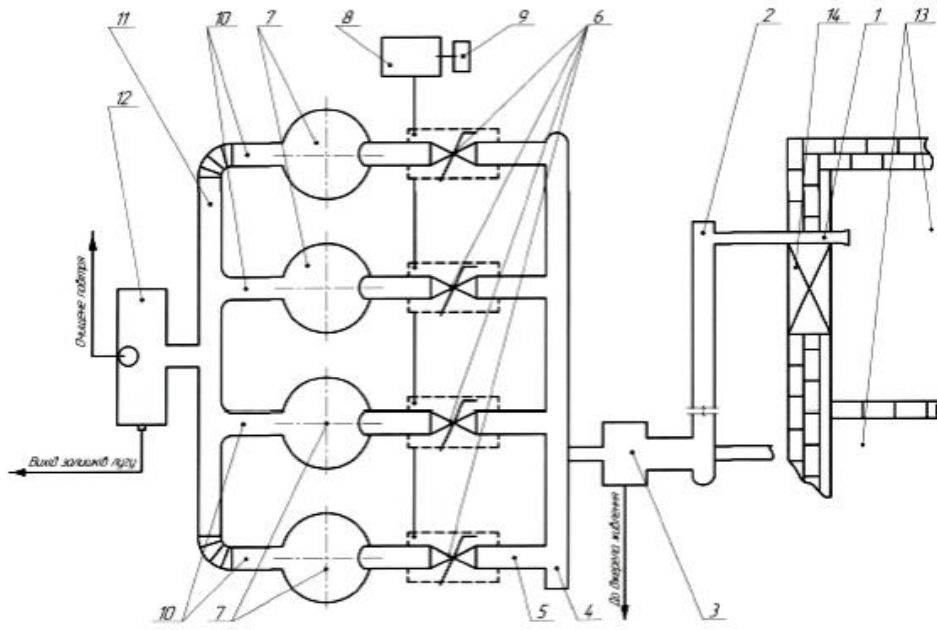


Рис. 9.2 Установа очищення відпрацьованого повітря

1–забірники брудного повітря, 2 – повітряний колектор, 3 –безшумний вентилятор, 4 –повіторозподільний трубопровід,5 –патрубки, 6–автоматичні запірні-розпірні крани, 7 – ємність, попередньо заповнена лужним розчином відповідного складу (NaOH, KOH, LiOH, Ca(OH)₂). 8 –блок автоматичного регулювання, 9 – контролер, 10 –патрубок, 11 – повітрязбірник очищеного від діоксиду вуглецю повітря, 12 –сепаратор, 13 –умовне приміщення, 14 –вікна, крізь відсіки у яких пропущені повітрязабірники 1

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ:

1. El-Tayeb, O.M., Salama, A.A., Hussein, M.M.M, etal. Optimization of industrial production of rifamycin B by *Amycolatopsis mediterranei*. I. Therole of colony morphology and nitrogen sources in productivity. *African Journal of Biotechnology*. -2004. -3(5): 266-272. [Електронний ресурс]. Режим доступу: 10.5897/AJB2004.000-2049
2. Kim R. Hardie and Samuel Jacob Fenn. JMM profile: rifampicin: a broad- spectrum antibiotic. *Journal of Medical Microbiology* -2022. -71:001566. [Електронний ресурс]. Режим доступу: DOI 10.1099/jmm.0.001566
3. Floss, H. G., & Yu, T.-W. Rifamycin Mode of Action, Resistance, and Biosynthesis. *Chemical Reviews*. -2005. -105(2), 621–632. [Електронний ресурс]. Режим доступу: doi:10.1021/cr030112j
4. Гребенюк В.І. антибіотикорезистентність. Проблеми, перспективи. -2022. С. 199-200. [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://dspace.bsmu.edu.ua/xmlui/bitstream/handle/123456789/19693/199-200_Гребенюк.pdf?sequence=1&isAllowed=y
5. Adams, R. A., Leon, G., Miller, N. M., Reyes, S. P., Thantrong, C. H., Thokkadam, A. M., Brynildsen, M. P. Rifamycin antibiotics and the mechanisms of their failure. *The Journal of Antibiotics*. -2021. [Електронний ресурс]. Режим доступу: doi:10.1038/s41429-021-00462-x
6. Rifamycin. From Wikipedia, the free encyclopedia. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://en.wikipedia.org/wiki/Rifamycin>
7. G. Venkateswarlu, P.S. Murali Krishna, G. Sharma, L. Venkateswar Rao. Improvement of rifamycin B production using mutant strains of *Amycolatopsis mediterranei*. *Bioprocess Engineering*. -2000. -23: 315-318. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://doi.org/10.1007/s004499900068>
8. Nagavalli Mandali, V. Girijashankar, S. P. D. Ponamgi, etal. Rifamycin SV production using immobilized cells of *Amycolatopsis mediterranei* OVA5-E7 in different matrices. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. -2014. -6(9): 298-306. [Електронний ресурс]. Режим доступу:

https://www.researchgate.net/profile/Veeranki-Girijashankar/publication/266672330_Rifamycin_SV_production_using_immobilized_cells_of_Amycolatopsis_mediterranei_OVA5-E7_in_different_matrices/links/543690ad0cf2dc341db35e7a/Rifamycin-SV-production-using-immobilized-cells-of-Amycolatopsis-mediterranei-OVA5-E7-in-different-matrices.pdf

9. M. Nagavalli, S. P. D. Ponamgi, V. Girijashankar, et al. Enhanced rifamycin SV production by submerged fermentation using *Amycolatopsis mediterranei*. *Appl Microbiol Biotechnol.* -2015. P.: 1-9. [Електронний ресурс]. Режим доступу: DOI 10.1007/s00253-015-6682-2

10. Margalith, P., & Beretta, G. Rifomycin. XI. taxonomic study on *Streptomyces mediterranei* nov. sp. *Mycopathologia et Mycologia Applicata.* -2960. -13(4), 321–330. [Електронний ресурс]. Режим доступу: doi:10.1007/bf02089930

11. Kisil, O.V.; Efimenko, T.A.; Efremenkova, O.V. Looking Back to *Amycolatopsis*: History of the Antibiotic Discovery and Future Prospects. *Antibiotics.* -2021. -10, 1254. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://doi.org/10.3390/antibiotics10101254>.

12. *Amycolatopsis rifamycinica*. From Wikipedia, the free encyclopedia. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://en.wikipedia.org/wiki/Amycolatopsis_rifamycinica

13. Міністерство охорони здоров'я України. Гострі кишкові інфекції: понад 20 тисяч українців перехворіли з початку року. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://moz.gov.ua/uk/gostri-kishkovi-infekciyi-ponad-20-tisyach-ukrayinciv-perehvorili-z-rochatku-roku>

14. Холодило, О.В. Гострі кишкові інфекції у дорослих: мікробіологічна характеристика [Текст] / О.В. Холодило // Інфекційні хвороби в практиці лікаря-інтерніста: сучасні аспекти : матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції і Пленуму Асоціації інфекціоністів Сумщини, м.Суми, 4-5 червня 2014 р. / Редкол.: М.Д. Чемич, В.Д. Москалюк, О. І. Сміян,

В.О. Терьошин, Н.І.Ільїна, В.В. Захлебаєва, А.І. Піддубна. - Суми : СумДУ, 2014. - С. 118-120.

15. Tabletki.ua. Альфанормікстаблетки, в/плів. обол. по 200 мг №28 (14x2). [Електронний ресурс]. Режим доступу:<https://tabletki.ua/uk/Альфа-нормікс/1054446/>

16. Центр громадського здоров'я МОЗ України. Інфекційна захворюваність населення України. [Електронний ресурс]. Режим доступу:https://phcorgua.sharepoint.com/:w:/r/sites/communication/_layouts/15/Docs.aspx?sourcedoc=%7BBF5B77E9-971C-484A-B5E9-4D8EE7255718%7D&file=Кбюлетень-12-2017-2016.doc&action=default&mobileredirect=true

17. Державний реєстр лікарських засобів. Альфа нормікс. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://www.drlz.com.ua/ibp/ddsite.nsf/all/shlist?opendocument&query=%E0%EB%FC%F4%E0%20%ED%EE%F0%EC%B3%EA%F1>.

18. Державний реєстр лікарських засобів. Ксифаксан. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://www.drlz.com.ua/ibp/ddsite.nsf/all/shlist?opendocument&query=%E0%EB%FC%F4%E0%20%ED%EE%F0%EC%B3%EA%F1>

19. Tabletki.ua. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://tabletki.ua/uk/substance/292/>

20. Brufani, M., Cellai, L., Marchi, E., & Segre, A/ The synthesis of 4-deoxyurido(1',2'-1,2)imidazo(5,4-c)rifamycin SV derivatives. The Journal of Antibiotics, 37(12), 1611–1622. -1984. doi:10.7164/antibiotics.37.1611 [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://sci-hub.se/10.7164/antibiotics.37.1611>

21. Rifaximin. Wikipedia [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://en.wikipedia.org/wiki/Rifaximin>

22. Aminosugarandnucleotidesugarmetabolism - *Amycolatopsis mediterranei*. KEGG PATHWAY Database. [Електроннийресурс]. Режимдоступу:<https://www.genome.jp/pathway/amz00520>
23. Biosynthesis of ansamycins - *Amycolatopsis mediterranei*. KEGGPATHWAYDatabase. [Електроннийресурс]. Режимдоступу:<https://www.genome.jp/pathway/amz01051>
24. 24.Mahalaxmi, Y., Sathish, T., SubbaRao, C., &Prakasham, R. S. Cornhuskas a novelsubstratefortheproductionof rifamycin B byisolated *Amycolatopsis sp.* RSP 3 under SSF. ProcessBiochemistry. -2010. -45(1), 47–53. [Електроннийресурс]. Режимдоступу: doi:10.1016/j.procbio.2009.08.
25. RuiLi, MengWang, ZhenRen, etal. *Amycolatopsis aidingensis* sp. nov., a HalotolerantActinobacterium, ProducesNewSecondaryMetabolites. Front. Microbiol. -2021. -12. [Електронний ресурс]. Режим доступу:<https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2021.743116/full#B20>
26. Фільтри попередньої очистки ФВК G4. [Електронний ресурс]. Режим доступу:<https://ventfilter.kiev.ua/goods/predvaritelnye-filtry-fvk-g4-1380480280/>
27. Гвинтовий безмасляний компресор EAGLE 315. [Електронний ресурс]. Режим доступу:<https://dalgakiran.ua/uk/products/gvyntovi-bezmaslyani-kompresory-dalgakiran-seriyi-eagle/>
28. Промисловий осушувач MX-60L. [Електронний ресурс]. Режим доступу:https://maxton.com.ua/dehumidifiers/osushuvach-povtrya-maxton-mx-60l?gclid=Cj0KCQjwmOm3BhC8ARIsAOSbapWcFIA6-e27KWgcPELU8ZrKhPVeyFMcQoQuAAUC8DQQPXHxQcj29REaAq4qEALw_wcB
29. Ресивер Компресормаш-Сервіс. [Електронний ресурс]. Режим доступу:<https://kms-market.com.ua/ua/p65372678-vozduhosbornik-resiver-500.html?srsId=AfmBOop17j2s0YrOhB7LqJhLHhueoDNkww6Xo-ZR3uDvxd8FWssOxqEY>

30. Інструкція по експлуатації Efir C-12[Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://pro-formula.com.ua/efir-c-12-ua.html>
31. Інструкція по експлуатації EFIR ПРО-АКТИВ[Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://pro-formula.com.ua/efir-pro-active-ua.html>
32. Інструкція по експлуатаціїEFIR Perox-Dez [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://pro-formula.com.ua/efir-perox-dez-ua.html>
33. Інструкція по експлуатації EFIR DEZO[Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://pro-formula.com.ua/efir-dezo-ua.html>
34. Прямокутний повітряний пелюстковий клапан ССК ТМ-KOL-60-30. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://prom.ua/ua/p1365180908-klapan-lepestkovyj-kol.html?srsId=AfmBOorNh20XFKrFCOaH_8Gh3cLP0PSxRcKh4HbUwwei1DO02uBM57i
35. Калорифер СФО-7,5 (ПНЕ-7,5) електричний. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://ukrvent.com/sfo-7-5-html/>
36. Фільтр тонкого очищення повітря Вент-фільтр. [Електронний ресурс]. Режим доступу:<https://ventfilter.kiev.ua/goods/filtr-tonkoj-ochistki-vozduha-ftov-hera-hera/>
37. Магістральні фільтри очищення стисненого повітря модель SPF005. [Електронний ресурс]. Режим доступу:https://www.koprig.com.ua/koprig/vozduh/filter_SPF.html
38. Біореактор BR100-C1 (під замовлення). [Електронний ресурс]. Режим доступу:<https://files.lab1st.com/documents/BR100-C1-5L%20Lab1st%20Bioreactor%20V2.231010.pdf>
39. Скляний хімічний реактор Kori DF-50L. [Електронний ресурс]. Режим доступу:<https://ukrchemgroup.com/ua/p1459285357-steklyannyj-himicheskij-reaktor.html>
40. ТЕКНА EVO APG 803 NHH0000. [Електронний ресурс]. Режим доступу:<https://ukrkvateh.com.ua/ua/p502823366-nasos-dozator->

apg600.html?srsltid=AfmBOorD91kuHefMqs4NBGIZKyeUWpAmmLDQBox-EqCIrNv00-dcoben

41. Мембранний насос Sera тип RF409.2-180e. [Електронний ресурс]. Режим доступу:<file:///C:/Users/Anna/Downloads/Nasosy-Sera-tip-RF4092-eRukovodstvoпоксплуатации.pdf>

42. Біореактор об'ємом 63 л (під замовлення). [Електронний ресурс]. Режим доступу:https://chinapharmamachine.com/product/fermentation_tank_1

43. Реактор 15 л. [Електронний ресурс]. Режим доступу:<https://khimmix.ua/ua/himicheskie-reaktory/laboratornyj-reaktor-15-l>

44. Насос-дозатор eONE MF пропорційного дозування 3005. [Електронний ресурс]. Режим доступу:https://www.etatron.com.ua/en/pumps/dosing_pumps/eone/eone_mf/

45. Дозатор ваговий ДВСВ-S. [Електронний ресурс]. Режим доступу:https://polytechnic.in.ua/ua/p150685-dozator-vesovoj-dvsv.html?gad_source=1&gclid=Cj0KCQjwu-63BhC9ARIsAMMTLXQP-OXISGagMU4VryYeHG_2LHtZyNe-MK2DUoJzoRVhZxvjSr__tDEaAp_tEALw_wcB

46. Мембранний насос Sera тип RF409.2-50e. [Електронний ресурс]. Режим доступу:<https://hennlichshop.com/ua/products/hydrotech-membrannij-nasos-sera-tip-rf409-2-50e?44=0-50.0>

47. Stationarybioreactor– 630 L. [Електронний ресурс]. Режим доступу:<https://en.sysbiotech.at/stationary-reactor-with-cip-and-sip-630-l/>

48. Насос дозуючий SEKO MS1C165C51C4000. [Електронний ресурс]. Режим доступу:<https://dosingtech.com.ua/product/nasos-doziruyushhij-seko-ms1c165c51c4000-500-l-god-3-bar-pp-fpm/>

49. Ваговий дозатор AF – 25К. [Електронний ресурс]. Режим доступу:https://tenzomir.com/katalog/vesovie_dozatori/весовой-дозатор-af-25k/

50. Конспект лекцій з дисципліни «Асептика біотехнологічнихвиробництвсвітньо-професійної програми другого (магістерського) рівнявищоїосвітизіспеціальності 162 «Біотехнології та

біоінженерія» усіх форм навчання / Укл.: Головей О.П., Гуляєв В.М. – Кам'янське, ДДТУ, 2017 р., 140 с.

51. Сідашенко О.І. Методичні рекомендації до виконання лабораторних робіт з дисципліни «Мікробіологія та вірусологія». Частина I «Мікробіологія» для студентів освітньо-професійної програми «Біологія» спеціальності 091 Біологія та біохімія / О.І. Сідашенко, В.В. Федотов; М-во освіти і науки України, НТУ «Дніпровська політехніка». – Дніпро : НТУ «ДП», 2023. – 73 с.

52. Jain, A., Jain, R., & Jain, S. (2020). Basic Techniques in Biochemistry, Microbiology and Molecular Biology. Springer Protocols Handbooks. doi:10.1007/978-1-4939-9861-6.

53. D. Abrams, D. Metcalf, M. Hojjatie. Determination of Kjeldahl Nitrogen in Fertilizers by AOAC Official Method SM 978.02: Effect of Copper Sulfate as a Catalyst. Journal of AOAC International. -2014. – 97(3): 764 – 767.

54. Nagavalli, M., Ponamgi, S. P. D., Girijashankar, V., & Rao, L. V. (2015). Enhanced rifamycin SV production by submerged fermentation using *Amycolatopsis mediterranei*. Applied Microbiology and Biotechnology, 99(18), 7505–7513. [Електронний ресурс]. Режим доступу: doi:10.1007/s00253-015-6682-2.

55. Патент України на корисну модель № 12559. СПОСІБ ОЧИЩЕННЯ СТИЧНОЇ ВОДИ / Рожко В. Ф., Нагорна О. К. Опубл. 15.02.2006, Бюл. № 2, 2006 р.

56. Патент України на корисну модель № 157051. СИСТЕМА ОЧИЩЕННЯ ПОВІТРЯ В ПРИМІЩЕННЯХ ВІД ДІОКСИДУ ВУГЛЕЦЮ З ОДНОЧАСНОЮ УТИЛІЗАЦІЄЮ ОСТАННЬОГО / Швець І. І. Опубл. 04.09.2024, бюл. № 36/2024