



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

(назва)

**ЗАТВЕРДЖУЮ**

**Завідувач кафедри**

біотехнології і мікробіології

Віктор СТАБНІКОВ

«\_\_» \_\_\_\_\_ 2024 року

## ЗАВДАННЯ

### НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

ДУХОТИ Тетяни Олександрівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи «Біосинтез мупіроцину *Pseudomonas fluorescens*»

керівник роботи ПЕНЧУК Юрій Миколайович, доцент

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від «29» 03 2024 року № 238-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 28 травня 2024 року

3. Вихідні дані до роботи: біологічний агент: *Pseudomonas fluorescens*; цільовий продукт: мупіроцин; геометричний об'єм ферментера: 12,5 м<sup>3</sup>; коефіцієнт заповнення: 0,6

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

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема біосинтезу мупіроцину - 2 аркуші формату А1

Апаратурна схема біосинтезу мупіроцину - 2 аркуші формату А1

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, Дата	
		Завдання видав	Завдання прийняв

7. Дата видачі завдання 01.03.2024

### КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1.	<i>Характеристика мупіроцину</i>	01.03.24	
2.	<i>Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента</i>	08.03.24	
3.	<i>Техніко-економічне обґрунтування</i>	22.03.24	
4.	<i>Біосинтез цільового продукту</i>	30.03.24	
5.	<i>Обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва</i>	12.04.24	
6.	<i>Специфікація обладнання</i>	19.04.24	
7.	<i>Опис технологічної схеми</i>	03.05.24	
8.	<i>Контроль виробництва</i>	10.05.24	
9.	<i>Охорона довкілля</i>	17.05.24	
10.	<i>Оформлення кваліфікаційної роботи</i>	23.05.24	
11.	<i>Оформлення графічної частини</i>	28.05.24	

**Здобувач**

\_\_\_\_\_ (підпис)

**Тетяна ДУХОТА**

(ім'я та прізвище)

**Керівник роботи**

\_\_\_\_\_ (підпис)

**Юрій ПЕНЧУК**

(ім'я та прізвище)

## ЗМІСТ

ВСТУП .....	8
РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту .....	10
РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента.14	
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування .....	14
2.2. Розрахунок складу поживного середовища.....	18
2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента.....	21
2.4. Таксономічний статус біологічного агента.....	23
РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування.....	24
3.1. Потреба у цільовому продукті.....	24
3.2. Розрахунок потужності виробництва .....	25
3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів.....	26
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.	27
РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту .....	31
4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента.....	31
4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт..	33
РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми .....	35
5.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера....	35
5.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря.....	38
5.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів .....	39
5.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища.....	42
РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання.....	51
РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми. ....	56

РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва.....	64
РОЗДІЛ 9 Охорона довкілля .....	71
9.1. Перспективи впровадження системи екологізації виробництва.....	71
ЛІТЕРАТУРА.....	76

## РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена розробленню технологічної та апаратурної схем біосинтезу мупіроцину з використанням бактерії *Pseudomonas fluorescens* NC1MB 10586, який синтезує даний кінцевий продукт у концентрації 0,011 г/л. Сам мупіроцин – це природний антибіотик з класу монокарбонових кислот, який використовується як антибактеріальний засіб проти інфекцій м'яких тканин або шкіри та для деколонізації носа, спричинених золотистим стафілококом. Відповідно до розрахунків, потужність виробництва становить 2 060 г мупіроцину на рік та 244 м<sup>3</sup> культуральної рідини.

Технологія виробництва мупіроцину включає допоміжні роботи (підготовка аераційного повітря, підготовка титрувальних агентів, стерилізація піногасника та поживних середовищ) та технологічний процес (чотири стадії вирощування посівного матеріалу та біосинтез у ферментері об'ємом 12,5 м<sup>3</sup> з коефіцієнтом заповнення 0,6).

Кваліфікаційна робота викладена на 88 сторінках, містить 18 таблиць, 5 рисунків, складається зі вступу, дев'яти розділів, списку використаної літератури (92 найменувань), технологічної (формат А1, 2 аркуші) та апаратурної (формат А1, 2 аркуші) схем.

**Ключові слова:** мупіроцин, *Pseudomonas fluorescens* NC1MB 10586, синтез, ферментер, антибіотик.

## ABSTRACT

The qualification work is devoted to the development of technological and apparatus schemes for the biosynthesis of mupirocin using the bacterium *Pseudomonas fluorescens* NC1MB 10586, which synthesizes the final product at a concentration of 0.011 g/L. Mupirocin itself is a natural antibiotic from the class of monocarboxylic acids, used as an antibacterial agent against soft tissue or skin infections and for nasal decolonization caused by *Staphylococcus aureus*. According to calculations, the production capacity is 2,060 g of mupirocin per year and 244 m<sup>3</sup> of culture fluid.

The mupirocin production technology includes auxiliary operations (preparation of aeration air, preparation of titration agents, sterilization of antifoam and nutrient media) and the technological process (four stages of seed material cultivation and biosynthesis in a fermenter with a volume of 12.5 m<sup>3</sup> and a filling coefficient of 0.6).

The qualification work is presented on 88 pages, contains 18 tables, 5 figures, and consists of an introduction, nine chapters, a list of references (92 titles), technological (format A1, 2 sheets) and apparatus (format A1, 2 sheets) schemes.

**Keywords:** mupirocin, *Pseudomonas fluorescens* NC1MB 10586, synthesis, fermenter, antibiotic.

## ВСТУП

Біосинтез природних антибіотиків викликає все більший інтерес серед науковців у зв'язку зі зростанням опору бактерій до традиційних антибіотиків та необхідністю розробки нових лікарських засобів [1]. Одним з таких продуктів є мупіроцин, який виробляється бактерією *Pseudomonas fluorescens*.

Мупіроцин був вперше відкритий у 1971 році шляхом виділення з культури *P. fluorescens* NCIMB 10586. Основною складовою цієї сполуки є псевдомонічна кислота А, яку було окремо виділено, очищено та детально охарактеризовано Фуллером та його колегами. Пізніше, компанія GlaxoSmithKline вперше ввела мупіроцин на ринок під торговою назвою Vactroban, і він став широко використовуваним лікарським засобом як для людей, так і для ветеринарної медицини. Цей препарат має кілька переваг перед іншими антибіотиками, оскільки він місцево застосовується і не має системних побічних ефектів [2;4].

**Актуальність.** Виробництво даного антибіотик є особливим за рахунок того, що він проявляє потужну антибактеріальною дією, та має ряд переваг серед інших подібних препаратів, здебільшого пов'язаних з його унікальним механізмом дії для лікування шкірних інфекцій, які є значущою проблемою в медичній практиці по всьому світу, особливо серед пацієнтів, що мають знижену імунною відповіддю або у вразливих груп населення. Станом на сьогодні шкірні інфекції уражають 40% населення України [2-3;5].

**Новизною** даної роботи є використання штаму *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 10586, який на середовищі складу, г/л: Глюкоза – 60; Соеве борошно – 2; Кукурудзяний екстракт – 5; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 1; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1,5; KCl – 1; MgSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O – 0,5; CaCO<sub>3</sub> – 6,25, в порівнянні з іншими продуцентами демонструє високу продуктивність, а саме дає змогу отримати 0,011 г/л мипіроцину за короткий час культивування 48 годин. *Pseudomonas*

					НУХТ БТЕК 04.02.52 КР ПЗ			
Змн.	Лист.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив		Духота Т.О.			ВСТУП	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевірив		Пенчук Ю.М.					8	88
Консультант						Кафедра БТМ 8		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

*fluorescens* NCIMB 10586 також має переваги з точки зору економічної ефективності, так як росте та синтезує кінцевий продукт на дешевому субстраті порівняно з *Pseudomona fluorescens* Z4, *Pseudomonas fluorescens* NCAIM B 001235.

## РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА МУПІРОЦИНУ

Кінцевим продуктом біосинтезу *Pseudomonas fluorescens* є мупіроцин, що являє собою новий антибактеріальний засіб з унікальною хімічною структурою (Рис.1.1.) та механізмом дії, відмінними від інших антибіотиків. Мупіроцин також відомий під назвою псевдомонова кислота, що пов'язана з його основним метаболітом - псевдомонічною кислотою А, що в порівнянні з іншими метаболітами з антимікробною активністю, такі як псевдомонові кислоти В, С і D, є відповідальною за більшу частину його активності. Хімічна структура мупіроцину включає короткий бічний ланцюг жирної кислоти, зв'язаний з монієвою кислотою складним ефірним зв'язком [6].

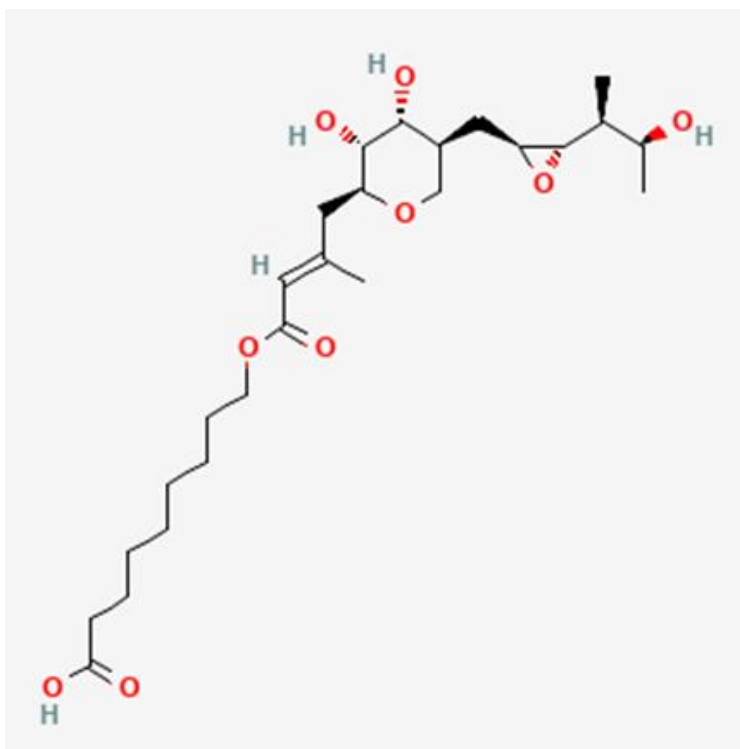


Рис.1.1. Мупіроцин. Структурна формула [7]

Даний антибіотик, застосовується в медицині як лікарський препарат під назвою "Бактробан" у формі мазі, який призначений для лікування різних

					НУХТ БТЕК 04.02.52 КР ПЗ			
Змн.	Лист.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив	Духота Т.О.				РОЗДІЛ 1. Характеристика мупіроцину	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевірив	Пенчук Ю.М.						10	88
Консультант						Кафедра БТМ <sup>10</sup>		
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							

бактеріальних інфекцій шкіри, що спричинені стафілококами, таких як імпетиго, фолікуліт, абсцеси та інші. За рахунок того, що він не використовується для системного лікування, ризик розвитку резистентності до нього низький. Також відомо, що мупіроцин можуть використовуватися у якості передопераційного скрабу для медичного персоналу. Він може зменшувати ріст біоплівки *S. aureus*, що безпосередньо може призводити до інфекції, але не може гарантувати повне видалення *S. aureus*, оскільки бактерії можуть повторно колонізувати область через кілька тижнів [4;6;8].

У 1976 році мупіроцин представили як перспективний препарат проти грампозитивних бактерій. Цей препарат спочатку був екстрагований із *Pseudomonas fluorescens* у 1971 році. Його механізм дії, зокрема полягає у інгібуванні ізолейцил-тРНК-синтетази, що відрізняється від інших доступних антибіотиків, що дозволяє уникнути перехресної резистентності з іншими препаратами такого ж спектру дії [6;9].

Фізико-хімічні властивості препарату [7; 10-11] наведено у таблиці 1.1.

Таблиця 1.1.

#### Фізико-хімічні властивості мупіроцину

Властивість	Опис
Хімічна формула	$C_{26}H_{44}O_9$
Молекулярна маса	500,6 г/моль
Температура плавлення	77-78 °С
Температура кипіння	672 °С
Температура спалаху	110 °С
Розчинність	Слаборозчинний у воді

**Фармакокінетика.** Мупіроцин вводять місцево на шкіру або носові отвори. Потрапляючи в кровотік, він швидко метаболізується в печінці, утворюючи основний метаболіт – моновою кислоту, яка не має антибактеріальної активності та виводиться нирками. Період напіввиведення становить 20-40 хвилин для мупіроцину і 30-80 хвилин для монової кислоти.

Місцевий мупіроцин має низьку біодоступність, а саме 0,24%, для непошкодженої шкіри та 1,2-5,1 % [2;12-13].

**Фармакодинаміка.** Мупіроцин має бактеріостатичну дію при низькій концентрації, але стає бактерицидним при концентраціях, які досягаються місцевим застосуванням. Антибактеріальна активність *in vitro* є найбільшою при кислому рН, що є перевагою при лікуванні шкірних інфекцій через низький рН шкіри. Мупіроцин активний проти чутливих аеробних грампозитивних коків, таких як: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* та стрептококів *Streptococcus pyogenes*. Він впливає на їх антибактеріальну активність, пригнічуючи синтез бактеріального білка та утворення бактеріальних білків, необхідних для виживання, завдяки зворотного і специфічного зв'язку з ізолейцин-трансфер-РНК-синтетазою, що призводить до бактеріостатичної дії [7;14] .

Нижче наведено фрагмент інструкції для медичного застосування препарату БАКТРОБАН (ВАСТРОВАН) [15]

**Склад.**

*Діюча речовина:* мупіроцин, 1 г мазі містить 20 мг мупіроцину;

*допоміжні речовини:* поліетиленгліколь 400 та поліетиленгліколь 3350.

**Лікарська форма.** Мазь.

**Фарматерапевтична група.** Дерматологічні засоби. Код АТХ D06A X09.

**Клінічні характеристики.**

**Показання.** Місцеве лікування бактеріальних інфекцій шкіри, наприклад імпетиго, фолікуліту, фурункульозу.

**Спосіб застосування та дози.**

*Дорослі, діти та пацієнти літнього віку*

Мазь у невеликій кількості тонким шаром слід наносити на уражені ділянки шкіри 2–3 рази на добу протягом періоду до 10 днів, залежно від перебігу захворювання. На оброблену маззю ділянку шкіри можна накладати пов'язку.

*Печінкова недостатність*

Корекція дози не потрібна.

*Ниркова недостатність*

Поліетиленгліколь може абсорбуватися крізь відкриті рани та пошкоджену шкіру. Як і інші мазі на основі поліетиленгліколю, Бактробан не слід застосовувати в умовах абсорбції великої кількості поліетиленгліколю, особливо якщо є ознаки помірної або тяжкої ниркової недостатності.

Препарат призначений для зовнішнього застосування. Після нанесення препарату на шкіру слід ретельно вимити руки. Не змішувати мазь з іншими препаратами, тому що при розведенні мазі зменшується її антибактеріальна активність та може втрачатись стабільність діючої речовини мазі.

*Діти.*

Застосовується для лікування дітей віком від 2 місяців.

## РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА.

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

Багато різних мікроорганізмів виробляють різноманітні типи антибіотиків, які допомагають сучасному світу боротись з великою кількістю хвороб. Але за останні роки виникла велика проблема пов'язана з виробкою резистентності мікроорганізмів до великої кількості препаратів, що призвело до пошуків нових антибіотиків [6].

При розробці нових методів виробництва даних препаратів, велика увага приділяється пошуку ефективних біологічних агентів для біосинтезу цих речовин. Одним з таких агентів є бактерія *Pseudomonas fluorescens*, основні штами якої, здатні до біосинтезу мупіроцину, а саме: *Pseudomonas fluorescens* NC1MB 10586, *Pseudomona fluorescens* Z4, *Pseudomonas fluorescens* NCAIM B 001235. Сам мупіроцин є потужним антибіотиком, який використовується для лікування інфекцій шкіри. Він також застосовується для профілактики інфекцій, пов'язаних з операціями та іншими медичними процедурами [4;16].

Для узагальнення даних та для визначення оптимальні умови для вирощування продуцента з метою отримання високої кількості мупіроцину, було створено таблицю 2.1, в якій міститься інформація про можливих продуцентів мупіроцину, їх поживне середовище та умови культивування, які забезпечують високі показники синтезу цього антибіотика.

На підставі даних з таблиці 2.1. було встановлено, що *Pseudomonas fluorescens* NC1MB 10586 є найкращим штамом для виробництва мупіроцину. Це пояснюється тим, що в порівнянні з іншими продуцентами, цей штам має найбільш перспективні характеристики. Він демонструє високу продуктивність (11 мг/мл) серед інших штамів та короткий час культивування (48 годин)

					НУХТ БТЕК 04.02.52 КР ПЗ			
Змн.	Лист.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив		Духота Т.О.			РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору біологічного агенту	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевірів		Пенчук Ю.М.					14	88
Консультант						Кафедра БТМ 14		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П						

Таблиця 2.1.

### Особливості одержання поверхнево-активних речовин на суміші ростових субстратів

Біологічний агент	Склад поживного середовища		Тривалість культивування, год	Показники синтезу мг/мл	Особливості процесу біосинтезу	Література
	Компонент	Концентрація, г/л				
<i>Pseudomonas fluorescens</i> NC1MB 10586	Глюкоза Соєве борошно Сухі речовини кукурудзяного розчину Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> KCl MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O CaCO <sub>3</sub>	60 2 5 1 1,5 1 0,5 6,25	48	11	Вирощування у ферментаторі Температура: 28 С рН : 6 Швидкість перемішування: 500 об/хв Швидкість аерації: 200 л/год	Alexandra Tucaliuc . Alexandra Cristina Blaga . Anca Irina Galaction . Dan Cascaval. Mupirocin: applications and production// Biotechnol Lett. – Romania. – 2019. – P. 8. - [Електронний ресурс]. Режим доступу: <a href="https://doi.org/10.1007/s10529-019-02670-w">https://doi.org/10.1007/s10529-019-02670-w</a>
<i>Pseudomona fluorescens</i> Z4	Глюкоза Соєве борошно Гліцерин Кукурудзяний розчин NaCl CaCl <sub>2</sub> CaCO <sub>3</sub> Соняшникова олія	20 50 10 5 5 3 4 10	48	0,98	Вирощування у ферментаторі Температура: 24-26°С рН : 5,3-7 Швидкість перемішування: 500 об/хв Швидкість аерації: 200 л/год Синтез мупіроцину через 24 години	Alexandra Tucaliuc . Alexandra Cristina Blaga . Anca Irina Galaction . Dan Cascaval. Mupirocin: applications and production// Biotechnol Lett. – Romania. – 2019. – P. 8. - [Електронний ресурс]. Режим доступу: <a href="https://doi.org/10.1007/s10529-019-02670-w">https://doi.org/10.1007/s10529-019-02670-w</a>
<i>Pseudomonas fluorescens</i> NCAIM B 001235	Глюкоза Соєве борошно Гліцерин Кукурудзяний розчин NaCl CaCO <sub>3</sub> Соняшникова олія	20 50 10 5 5 5 10	66	2,256	Вирощування у ферментаторі Температура: 24-26°С рН : 5,5-6 Швидкість перемішування: 300-600 об/хв Швидкість аерації: 200 л/год Синтез мупіроцину через 24 години	Alexandra Tucaliuc . Alexandra Cristina Blaga . Anca Irina Galaction . Dan Cascaval. Mupirocin: applications and production// Biotechnol Lett. – Romania. – 2019. – P. 8. - [Електронний ресурс]. Режим доступу: <a href="https://doi.org/10.1007/s10529-019-02670-w">https://doi.org/10.1007/s10529-019-02670-w</a>

Крім того, необхідно враховувати економічні аспекти, які впливають на вартість та собівартість виробництва, такі як витрати на культивування. Дані з таблиці 2.2 були використані для аналізу вартості компонентів поживного середовища, необхідних для культивування продуцентів мупіроцину. *Pseudomonas fluorescens* NC1MB 10586 є найдешевшим продуцентом з вартістю поживного середовища 4,18 грн за літр, що на 1,5 рази менше від ціни на середовище для інших штамів, таких як *Pseudomonas fluorescens* Z4 та *Pseudomonas fluorescens* NCAIM B 001235, де ціна становить 6,26 грн та 6,20 грн відповідно. Використання цього продуценту для виробництва мупіроцину дозволить підвищити ефективність та економічність виробництва цього важливого антибіотика.

Таблиця 2.2

**Вартість поживних середовищ для культивування продуцентів мупіроцину**

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,...12)*
<i>Pseudomonas fluorescens</i> NC1MB 10586	Глюкоза	60	53	3,18	1
	Соеве борошно	2	67	0,134	2
	Кукурудзяний розчин	5	0,84	0,0042	3
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1	450	0,45	4
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5	200	0,3	5
	KCl	1	86	0,086	6
	MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	0,5	15	0,0075	7
	CaCO <sub>3</sub>	6,25	3,35	0,021	8
<b>Вартість 1 л середовища – 4,18 грн</b>					
<i>Pseudomona fluorescens</i> Z4	Глюкоза	20	53	1,06	1
	Соеве борошно	50	67	3,35	2
	Гліцерин	10	132	1,32	9
	Кукурудзяний розчин	5	0,84	0,0042	3
	NaCl	5	17	0,085	10
	CaCl <sub>2</sub>	3	33	0,099	11
	CaCO <sub>3</sub>	4	3,35	0,0134	8
	Соняшникова олія	10	32,8	0,328	12
<b>Вартість 1 л середовища – 6,26 грн</b>					

<i>Pseudomonas fluorescens</i> NCAIM B 001235	Глюкоза	20	53	1,06	1
	Соєве борошно	50	67	3,35	2
	Гліцерин	10	132	1,32	9
	Кукурудзяний розчин	5	0,84	0,0042	3
	NaCl	5	17	0,085	10
	CaCO <sub>3</sub>	5	3,35	0,0167	8
	Соняшникова олія	10	32,8	0,328	12
	<b>Вартість 1 л середовища – 6,20 грн</b>				

**Примітка.** \* – Ціни наведено станом на квітень 2024 р. 1 - <https://flagma.ua/uk/glyukoza-dekstroza-o3302952.html>, 2 - <https://vkorm.com.ua/product/soyeve-boroshno-harchove/>, 3 - <https://flagma.ua/uk/prodam-krokhmal-kukurudzianyi-o5149824.html>, 4 - <https://vlemiko.com.ua/ua/p1237461796-natrij-fosfornokislyj-zameschennyj.html>, 5 - [https://www.covalent.com.ua/shop/potassium\\_phosphate/](https://www.covalent.com.ua/shop/potassium_phosphate/), 6 - <https://flagma.ua/uk/kalii-khlorystyj-o14569091.html>, 7 - <https://flagma.ua/uk/sulfat-magniya-semivodny-kristalicheskiy-o4927510.html>, 8 - <https://4sezon.com.ua/ua/p1496797515-karbonat-kaltsiya-izvest.html>, 9 - <https://flagma.ua/uk/glicerin-harchoviy-o9327416.html>, 10 - <https://flagma.ua/uk/sil-kharchova-1-o10589167.html>, 11 - <https://flagma.ua/uk/khloryd-kaltsiyyu-o14569093.html>, 12 - <https://flagma.ua/uk/oliya-sonyashnikova-nerafinovana-o13927649.html>

Щоб визначити найбільш ефективний біологічний агент з найкращими характеристиками процесу культивування, потрібно також розрахувати умовну вартість 1 г цільового продукту (див. таб. 2.3).

Таблиця 2.3

### Умовна вартість 1 г поверхнево-активних речовин, синтезованих на суміші ростових субстратів

Біологічний агент	Концентрація мупіроцину, мг/мл	Тривалість культивування, год	Кількість утворених мупіроцину за годину, мг/год	Вартість 1 л середовища, грн/л	Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г
<i>Pseudomonas fluorescens</i> NC1MB 10586	11	48	0,23	4,18	380
<i>Pseudomona fluorescens</i> Z4	0,98	48	0,02	6,26	6 387
<i>Pseudomonas fluorescens</i> NCAIM B 001235	2,256	66	0,034	6,20	2 748

Аналізуючи дані з таблиці 2.3, можна стверджувати, що *Pseudomonas fluorescens* NC1MB 10586 є найкращим штамом за умовною вартістю мупіроцину. Це пояснюється тим, що в порівнянні з іншими продуцентами, такими як *Pseudomonas fluorescens* Z4 та *Pseudomonas fluorescens* NCAIM B 001235, вона має нижчу ціну. Крім того, *Pseudomonas fluorescens* NC1MB 10586 має найвище значення синтезу мупіроцину, яке становить 0,00023 грам за годину.

## 2.2. Перевірочний розрахунок складу поживного середовища

Розраховуємо поживне середовище для вирощування продуцента мупіроцину *Pseudomonas fluorescens* NC1MB 10586, якщо за 48 год культивування концентрація мупіроцину становить 0,011 г/л, а концентрація біомаси 24 г/л.

### *Розрахунок вмісту в середовищі джерела вуглецевого живлення*

*Потреби для синтезу мупіроцину.* Як джерело вуглецю для одержання мупіроцину використовується глюкоза.

Розраховуємо, скільки вуглецю (за елементом С) міститься в 0,011 г мупіроцину. Молекулярна маса мупіроцину [C<sub>26</sub>H<sub>44</sub>O<sub>9</sub>] становить 500,6. Отже, у 500,6 г мупіроцину міститься 312,3 г вуглецю, а в 0,011 г мупіроцину ( $312,3 \times 0,011$ ) / 500,6 = 0,0069 г вуглецю.

Далі розраховуємо, у скількох грамах глюкози міститься 0,0069 г вуглецю, враховуючи, що вміст Карбону у вуглеводах глюкози становить 40%. Отже, у 180 г глюкози міститься 72 г вуглецю, а у 0,0069 г вуглецю міститься  $(180 \times 0,0069) / 72 = 0,017$  г глюкози. Враховуючи, що при вирощуванні мікроорганізмів на вуглеводах близько 40% субстрату окислюється до CO<sub>2</sub> для одержання енергії, необхідної для конструктивного метаболізму, вміст глюкози у середовищі становитиме  $(0,017 \times 0,4) + 0,017 = 0,0238$  г/л.

*Потреби для синтезу біомаси.* У біомасі міститься 50% вуглецю, отже вміст вуглецю у 24 г біомаси становить  $24 \times 0,5 = 12$  г. Ця кількість вуглецю

міститься у  $(12 \times 180) / 72 = 30$  г вуглеводів. Враховуючи 40% втрат субстрату на “холосте окислення”, для одержання 24 г/л біомаси у середовище необхідно внести  $(12 \times 0,4) + 12 = 16,8$  г/л глюкози.

Отже, загальний вміст глюкози в середовищі, необхідний для синтезу біомаси (24 г/л) та мупіроцину (0,011 г/л), становить  $0,0238 + 16,8 = 17$  г/л.

#### ***Розрахунок вмісту в середовищі джерела азотного живлення.***

*Потреби для синтезу біомаси.* Припустимо, що у біомасі міститься 10 % азоту. Таким чином, у 24 г/л біомаси вміст азоту (за елементом N) становить  $(24 \times 0,10) = 2,4$  г. Соєве борошно є джерелом органічного азоту [17], який засвоюється продуцентом мупіроцином. Таким органічним азотом є аміний азот і частково білковий. У ньому міститься близько 40-50 % білків. Для хімічного складу білків характерний постійний середній вміст нітрогену - біля 16% [18]. Далі розрахуємо, у скількох грамах білку міститься 16 г нітрогену. Отже, у 100 г білку міститься 16 г нітрогену, тоді 2,4 г нітрогену міститься в  $(100 \times 2,4) / 16 = 15$  г білку.

У перерахунку на соєве борошно одержимо 36 г/л.

#### ***Розрахунок вмісту фосфору у середовищі***

У біомасі міститься близько 3% фосфору (за елементом P). Отже, для синтезу 24 г/л біомаси вміст фосфору у середовищі повинен становити  $24 \times 0,03 = 0,72$  г/л. Джерелам фосфору у промисловому виробництві мупіроцину –  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ .

Далі розрахуємо, у скількох грамах  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  міститься 0,72 г фосфору.

Отже, у 174 г –  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  міститься 31 г фосфора, тоді 0,72 г фосфору міститься в  $(174 \times 0,72) / 31 = 4$  г/л  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ .

#### ***Розрахунок вмісту магнію в середовищі***

У біомасі міститься близько 0,5 % магнію (за елементом Mg). Отже, для синтезу 24 г/л біомаси вміст магнію в середовищі повинен становити  $24 \times 0,005 = 0,12$  г/л. Джерелом магнію у промисловому виробництві мупіроцину виступає  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$

Отже, у 246 г  $MgSO_4 \times 7H_2O$  міститься 24 г магнію, тоді 0,12 г магнію міститься в  $(246 \times 0,12) / 24 = 1,2$  г  $MgSO_4 \times 7H_2O$ .

#### ***Розрахунок вмісту кальцію у середовищі***

Потреби на синтез біомаси. У біомасі міститься близько 0,5 % Ca (за елементом Ca). Отже, для синтезу 24 г/л біомаси вміст кальцію в середовищі повинен становити  $24 \times 0,005 = 0,12$  г/л. Джерелом кальцію у промисловому виробництві мупіроцину є  $CaCO_3$ .

Отже, у 100 г  $CaCO_3$  – міститься 40 г кальцію, тоді 0,12 г кальцію міститься в  $(100 \times 0,12) / 40 = 0,3$  г  $CaCO_3$ .

#### ***Розрахунок вмісту натрію в середовищі***

У біомасі міститься близько 1% натрію (за елементом Na). Отже, для синтезу 24 г/л біомаси вміст натрію у середовищі повинен становити  $24 \times 0,01 = 0,24$  г/л. Джерелом натрію у виробництві мупіроцину є  $Na_2HPO_4$ .

Отже, у 142 г  $Na_2HPO_4$ . – міститься 46 г натрію, тоді 0,24 г натрію міститься в  $(142 \times 0,24) / 46 = 0,7$  г  $Na_2HPO_4$ .

#### ***Розрахунок вмісту хлору в середовищі***

У біомасі міститься близько 0,5% хлору (за елементом Cl). Отже, для синтезу 24 г/л біомаси вміст хлору у середовищі повинен становити  $24 \times 0,005 = 0,12$  г/л. Джерелом хлору у виробництві мупіроцину є  $KCl$ .

Отже, у 75 г  $KCl$  – міститься 36 г хлору, тоді 0,12 г хлору міститься в  $(75 \times 0,12) / 36 = 0,25$  г  $KCl$ .

Отже, з метою одержання максимальної кількості продукту мікробного синтезу, отримано середовище наступного складу (таб. 2.4.).

Таблиця 2.4.

#### **Склад поживного середовища для культивування продуцента мупіроцину**

Компоненти поживного середовища	Сумарний вміст, г/л	Початковий вміст, г/л
Глюкоза	17	60
Соеве борошно	36	2
$K_2HPO_4$	4	1,5

MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	1,2	0,5
CaCO <sub>3</sub>	0,3	6,25
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,7	1
KCl	0,25	1

Отримання саме такого складу поживного середовища було здійснено за допомогою математичних методів, які дозволили розрахувати оптимальну кількість кожного з компонентів.

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

#### *Pseudomonas fluorescens*

*Pseudomonas fluorescens* (Рис. 2.1.) – червона неспороутворююча бактерія, яка має пряму паличкоподібну форму клітин, що зазвичай називають бацилами. Вони мають розмір від 0,5 до 1,0 мікрметра в ширину та 2,0 - 2,5 мкм в довжину. Від клітинної стінки відходять джгутики, які розташовуються полярно та забезпечують рухливість даній бактерії. За грамом є негативною бактерією, а отже для них є характерним тонкий шар пептидоглікану у клітинній стінці [17;19;23].

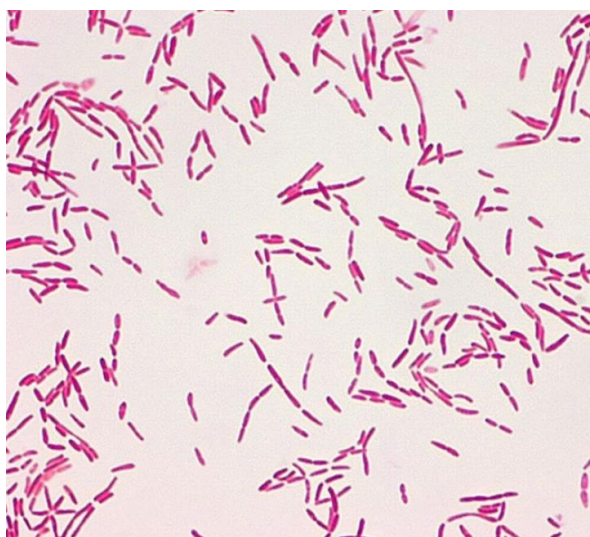
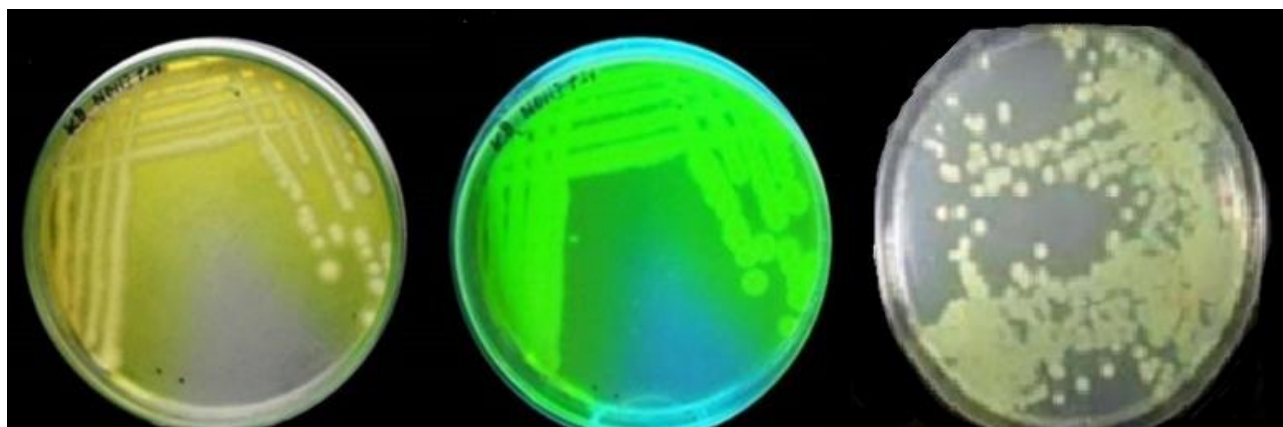


Рис.2.1. *Pseudomonas fluorescens* [21]

Даний мікроорганізм виробляє синій пігмент піовердин від якого походить назва, та забезпечує йому флуорисцентність під ультрафіолетовим світлом (УФ). Піовердин – це сполука, яка необхідна для отримання заліза з навколишнього середовища, а також росту та підвищення виживання бактерій [17]

Зазвичай даний мікроорганізм утворює круглі опуклі колонії жовтуватого кольору з гладкою та блискучою поверхнею [22]. На середовищі Кінга В, де бактерію вирощували 3 дні при кімнатній температурі (Рис.2.2. А), *Pseudomonas fluorescens* утворюють круглі блискучі зеленувато-жовті колонії середнього розміру, приблизно 2 мм. Також колонії мають гладкі краї та опуклу поверхню, за рахунок пігменту є флуоресцентні в УФ-світлі (Рис.2.2 В) [18;23].

Колонії *Pseudomonas fluorescens* які вирощували на чашках з поживним агаром протягом 24 годин, (Рис.2.2. С) утворюють круглі непрозорі, зеленуваті або блідно-жовті колонії великого розміру. Вони є плоскими, а також мають нерівні краї та виразний фруктовий запах [25].



А

В

С

**Рис.2.2. Колонії *Pseudomonas fluorescens*: на середовищі Кінга В (А) та на середовищі Кінга В під УФ (В), на поживному агарі (С) [20]**

За типом живлення *Pseudomonas fluorescens* є хемоорганотрофом, що свідчить про те що джерелом енергії у даного мікроорганізма є хімічні

речовини, а донором електронів виступає органічна речовина [17]. Він є облигатним аеробом, а отже може рости лише за наявності кисню, але деякі штами здатні використовувати нітрат замість кисню, як кінцевий акцептор електронів під час клітинного дихання. Дихання є єдиним процесом, залученим до обміну енергії, всі види використовують кисень як кінцевий окислювач.

Ріст *Pseudomonas fluorescens* відбувається в межах рН середовища від 4 до 8, з оптимум 7-8, що вказує на те що дана бактерія є алкалофілом. *Pseudomonas fluorescens* – це мезофіл мікроорганізм, який має такі температурні межі росту від +4 до +42°C. Оптимальна температура для росту даної бактерії є 25–30°C для екологічних ізолятів та 34–37°C для ізолятів ссавців [17-18]. *Pseudomonas fluorescens* здатні виробляти каталазу, лецитиназу, оксидазу, та здійснювати гідроліз желатину [24].

#### **2.4. Таксономічний статус продуцента мупіроцину**

У роді *Pseudomonas* налічується 211 видів і 18 підвидів. Завдяки прогресу в таксономії багато ізолятів *Pseudomonas*, спочатку ідентифікованих як «вид» *P. fluorescens*, тепер пере класифікуються як нові види *Pseudomonas* у «комплексі видів» *P. fluorescens*. У цій групі є 52 види і вони мають багато спільних фенотипових характеристик. За філогенетичною класифікацією згідно останнього Видання Бергі з систематики бактерій *P. fluorescens* знаходиться [17]:

Домен - *Bacteria*

Відділ - *Proteobacteria*

Клас - *Gamma proteobacteria*

Порядок - *Pseudomonadales*

Родина - *Pseudomonaceae*

Рід - *Pseudomonas*

Вид – *Fluorescens*

## РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

### 3.1. Потреба в цільовому продукті – мупіроцині

Шкіра є найбільшим органом людського тіла і функціонує як захисний бар'єр від зовнішнього середовища. Однак інфекції шкіри можуть розвиватися під впливом різноманітних мікроорганізмів, таких як бактерії, грибки та віруси. Ці інфекції можуть мати різні симптоми і впливати на якість життя населення [26]. Саме тому, інфекції шкіри можуть стати серйозною проблемою для здоров'я та життя людини, тому для боротьби з певним спектром інфекцій шкіри, а саме ті, що спричинені стафілококами (імпетиго, фолікуліт) використовують антибіотик мупіроцин. Україна, подібно до багатьох інших країн, стикається зі збільшенням випадків інфекцій шкіри. Це може бути пов'язано з рядом факторів, таких як зростання забруднення навколишнього середовища, зниження імунітету у деяких груп населення, а також зміни у мікроорганізмах, що викликають інфекції [27].

Опираючись на інформацію з даного джерела [5] кількість випадки захворюваності на піодермію в Україні становить 40% від усіх шкірних інфекцій, а це приблизно 5.9% від загального числа захворюваності. Таким чином беручи останні дані з перепису населення України за 2019 рік [28], кількість людей, що проживає в державі – 37 мільйонів 289 тисяч. Враховуючи той фактор, що після повномасштабного вторгнення РФ на територію країни, виїхало щонайменше 8 мільйони 177 тисяч жителів [29], приблизне число захворюваності на піодермію становить 687 043 випадків щорічно.

Приблизна чисельність народу України після початку війни:

$$37\ 289\ 000 - 8\ 177\ 000 = 29\ 112\ 000 \text{ людей}$$

Приблизне число захворюваності на шкірні інфекції в Україні:

$$29\ 112\ 000 \times 5.9\% = 1\ 717\ 608 \text{ випадків}$$

Приблизне число захворюваності на піодермію в Україні:

					НУХТ БТЕК 04.02.52 КР ПЗ			
Змн.	Лист.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив	Духота Т.О.				РОЗДІЛ 3. Техніко- економічне обґрунтування	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевірив	Пенчук Ю.М.						24	88
Консультант						Кафедра БТМ <sup>24</sup>		
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							

$$1\,717\,608 \times 40\% = 687\,043 \text{ випадків}$$

Бактробан як препарат використовується для лікування таких шкірних інфекцій як піодермія. Застосовується для лікування дітей віком від 2 місяців. Відповідно до інструкції рекомендується наносити невелику кількість мазі на уражену зону [30]. Прийmemo, що одна упаковка препарату розрахована на курс лікування тривалістю 10 діб, з кількістю прийому 2-3 рази на день, таким чином враховуючи, що кількість мазі в тюбику становить 15 г, приблизна доза препарату за один прийом становить 50 мг. Тож можемо дізнатись загальну кількість препарату на всіх хворих:

$$3 \times 0,05 \times 10 \times 687\,043 = 1\,030\,565 \text{ г} = 1\,031 \text{ кг}$$

### Вихідні дані для розрахунку річної потреби в мупіроцині

Група пацієнтів	Доза препарату на добу, мазь	Кількість Прийомів на добу	Тривалість прийому, діб	Кількість хворих в Україні на піодермію	Загальна кількість препарату на всіх хворих
1	2	3	4	5	6
Дорослі, діти та пацієнти літнього віку	0,05 г	3	10	823 380	1 031 кг
					<b>1031</b>

### 3.2. Розрахунок потужності виробництва

На 2023 рік більшість препаратів з діючою речовиною мупіроцину є імпорнтними, до них відносять відповідно Бактробан (Велика Британія), Бондерм (Хорватія) та Бактопiк (Індія) [31]. Єдине виробництво в Україні, що займається випуском аналогу даних препаратів це ТОВ «ДКП «Фармацевтична фабрика», що випускає лікарський засіб під назвою «Бактіаліс» [31]. Таким чином згідно з попередніх розрахунків загальна кількість антибіотика з діючою речовиною мупіроцином для населення України становить 1031 кг, тобто враховуючи, що імпорнтні препарати займають основну частину ринку (75%), а також є українське виробництво ДКП «Фармацевтична фабрика» (15%), пропонується виробляти власного

препарату 10 %. Це означає що державі, щоб забезпечити своє населення власним лікарським засобом потрібно виготовляти:

$$G_{\text{гп}} = 1031 \times 0,10 = 103 \text{ кг препарату на рік}$$

Відповідно до інструкції в 1 г мазі міститься 20 мг мупіроцину. Тому для отримання 103 кг препарату, потрібно синтезувати таку кількість діючої речовини:

$$1 \text{ г препарату} - 0,02 \text{ г}$$

$$103 \text{ 000} - X$$

$$X = 103 \text{ 000} \times 0,02 = 2 \text{ 060 г мупіроцину на рік}$$

Враховуючи продуктивність обраного біологічного агенту *Pseudomonas fluorescens* NC1MB 1058, а саме 11 мг/л. Кількість культуральної рідини становить:

$$0,011 \text{ г} - 1 \text{ л}$$

$$2 \text{ 060 г} - X \text{ л}$$

$$X = 2060 / 0,011 = 187 \text{ 273 л (187 м}^3\text{)}$$

Враховуючи сумарні втрати цільового продукту при виділенні (30 %), необхідно отримати таку кількість культуральної рідини:

$$187 \text{ 273} \times 1,3 = 243 \text{ 455 л (244 м}^3\text{)}$$

### 3.3. Розрахунок геометричного об'єму ферментера

Для забезпечення мупіроцином всіх жителів України, потрібно отримати 244 м<sup>3</sup> культуральної рідини. Прийmemo кількість робочих трудоднів 105. Тривалість циклу роботи ферментера, включає ряд стадій підготовки апарата, а саме: 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) та ферментація (48 год). Тобто можемо визначити цикл роботи ферментера:

$$T_{\text{цф}} = 1,5 + 1 + 0,5 + 1 + 1 + 2 + 0,5 + 1 + 48 = 56,5$$

Знаючи цикл роботи ферментера, об'єм культуральної рідини за добу становить:

$$V_d = V_{гп} / T_{тр} = 244/105 = 2,32 \text{ м}^3$$

Кількість продукту за цикл буде становити:

$$V_{цк} = (K_1 \times V_d \times T_{цф})/24 = (1,2 \times 2,32 \times 56,5)/24 = 6,55 \text{ м}^3/\text{цикл}$$

Визначивши об'єм КР за один цикл і знаючи коефіцієнт заповнення  $K_3$ , визначаємо геометричний об'єм ферментера:

$$V_r = V_{цк} / K_3 = 6,55/0,6 = 10,9 \text{ м}^3$$

Згідно з таблицею, найближчим за геометричним об'ємом є ферментер  $V_{\phi} = 10 \text{ м}^3$ .

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_3 = 6,55/10 = 0,65 \text{ – не перевищує заданого значення}$$

### **3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для біосинтезу мупіроцину**

За один виробничий цикл отримують  $6,55 \text{ м}^3$  культуральної рідини. При її одержанні також потрібно врахувати втрати при біосинтезі ( $E_{\phi}$ ), які становлять від 10 до 15 %.

Отже, з урахуванням покриття 10% втрат об'єм поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом має становити:

$$V_{роб.1} = V_{кр} \times (1 + E_{\phi}) = 6,55 \times (1 + 0,1) = 7,2 \text{ м}^3$$

Робочий об'єм ферментера складає  $7,2 \text{ м}^3$ , і при обраному коефіцієнту заповнення 0,6 геометричний об'єм ферментера дорівнює:

$$V_{\phi} = 7,2 / 0,6 = 12 \text{ м}^3$$

Ми вибираємо стандартний ферментер з об'ємом, який найближчий до цього значення, і він складає  $12,5 \text{ м}^3$ .

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_{31} = 7,2/12,5 = 0,57.$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах для аеробних процесів (0,55-0,65), отже геометричний об'єм ферментера обрано правильно.

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить 10 % від об'єму поживного середовища.

Для засіву  $7,2 \text{ м}^3$  середовища необхідно приготувати :

$$V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб.1}} \times X_{\text{ф}} = 7,2 \times 0,1 = 0,72 \text{ м}^3 \text{ посівного матеріалу}$$

Тоді об'єм поживного середовища в ферментері буде становити:

$$V_{\text{пс1}} = V_{\text{роб.1}} - V_{\text{пм1}} = 7,2 - 0,72 = 6,48 \text{ м}^3.$$

Беручи до уваги, що при отриманні  $0,72 \text{ м}^3$  інокуляту в посівному апараті 10% культуральної рідини буде втрачено через колектор відпрацьованого повітря через краплевинос, об'єм поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті складатиме:

$$V_{\text{роб.2}} = V_{\text{пм1}} \cdot (1 + E_{\text{ф}}) = 0,72 \cdot 1,1 \approx 0,79 \text{ м}^3$$

Об'єм інокуляту  $0,79 \text{ м}^3$  за коефіцієнта заповнення 0,6 можна отримати в посівному апараті об'ємом:

$$V_{\text{па2}} = 0,79 / 0,6 = 1,32 \text{ м}^3 .$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер  $V_{\text{ст2}} = 1,25 \text{ м}^3$  .

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_{32} = 0,79 / 1,25 = 0,63.$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах для аеробних процесів (0,55-0,65), отже геометричний об'єм посівного апарату обрано правильно.

Кількість посівного матеріалу для посівного апарата становить 10 % від об'єму поживного середовища. Отже, для засіву  $0,79 \text{ м}^3$  необхідно приготувати:

$$V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб.2}} \times X_{\text{ф}} = 0,79 \times 0,1 = 0,079 \text{ м}^3 = 79 \text{ л}$$

Тоді об'єм поживного середовища в посівному апараті буде становити:

$$V_{\text{пс2}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пм2}} = 0,79 - 0,079 = 0,71 \text{ м}^3$$

Врахуємо, що під час одержання 79 л посівного матеріалу в інокуляторі 10 % культуральної рідини буде втрачено внаслідок краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря. Тоді об'єм поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становитиме:

$$V_{\text{роб.3}} = V_{\text{пм2}} \times (1 + E_{\text{ф}}) = 0,079 \times 1,1 \approx 0,087 \text{ м}^3$$

Об'єм інокуляту 0,087 м<sup>3</sup> за коефіцієнта заповнення 0,6 можна отримати в посівному апараті об'ємом:

$$V_{\text{па2}} = 0,087 / 0,6 = 0,15 \text{ м}^3$$

Обираємо апарат з найближчим номінальним об'ємом - 0,16 м<sup>3</sup>.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_{з.3} = 0,09 / 0,16 = 0,56.$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах, отже геометричний об'єм посівного апарату обрано правильно. Кількість посівного матеріалу становить 10 % від об'єму поживного середовища. Для засіву поживного середовища об'ємом 87 л необхідно:

$$V_{\text{пм3}} = V_{\text{роб.3}} \times X_{\text{ф}} = 87 \times 0,1 = 8,7 \text{ л посівного матеріалу}$$

Тоді об'єм поживного середовища в посівному апараті буде становити:

$$V_{\text{пс3}} = V_{\text{роб.3}} - V_{\text{пм3}} = 87 - 8,7 = 78,3 \text{ л}$$

Врахуємо, що під час одержання 8,7 л посівного матеріалу в інокуляторі 10 % культуральної рідини буде втрачено внаслідок краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря. Тоді об'єм поживного середовища та посівного матеріалу в інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{роб.4}} = V_{\text{пм3}} \times (1 + E_{\text{ф}}) = 8,7 \times 1,1 = 9,57 \text{ л}$$

Об'єм інокуляту 9,57 л за коефіцієнта заповнення 0,6 можна отримати в інокуляторі об'ємом:

$$V_{\text{ін4}} = 9,57 / 0,6 = 15,95 \text{ л.}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний інокулятор  $V_{\text{ст4}} = 30$  л. Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_{з.4} = 15,95 / 30 = 0,53.$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах, отже геометричний об'єм інокулятора обрано правильно. Кількість посівного матеріалу становить 10 % від об'єму поживного середовища. Для засіву інокулятора необхідно підготувати:

$$V_{\text{пм4}} = V_{\text{роб.4}} \times X_{\text{ф}} = 9,57 \times 0,1 = 957 \text{ мл}$$

Тоді об'єм поживного середовища в інокуляторі буде становити:

$$V_{\text{пс4}} = V_{\text{роб.4}} - V_{\text{пм4}} = 9,57 - 0,96 = 8,61 \text{ л}$$

Одержання посівного матеріалу 957 мл для засіву інокулятора можна здійснити культивуванням бактерій у колбах на качалці. Для цього використовують качалочні колби об'ємом  $V_{\text{колб}} = 750$  мл з коефіцієнтом заповнення  $K_{\text{зк}} = 0,2$ . Тоді кількість колб становить:

$$N_{\text{колб}} = V_{\text{пм4}} / (V_{\text{колб}} \times K_{\text{зк}}) = 957 / (750 \times 0,2) = 7 \text{ колб}$$

Отже, за результатами розрахунків для біосинтезу мупіроцину бактерією *Pseudomonas fluorescens* NC1MB 10586 необхідно встановити ферментер для біосинтезу об'ємом  $12,5 \text{ м}^3$ , інокулятор об'ємом  $1,25 \text{ м}^3$ , інокулятори по 160 л і 30 л, а також 7 качалочних колб.

Таблиця 3.3

### Об'єми середовищ та апаратів для стадії підготовки посівного матеріалу та виробничого біосинтезу

№ стадії	Об'єм культуральної рідини $V_{\text{кр}}, \text{ м}^3 (\text{л})$	Уточнений об'єм культуральної рідини* $V_{\text{роб.}}, \text{ м}^3 (\text{л})$	Об'єм посівного матеріалу, $V_{\text{пм}}, \text{ м}^3 (\text{л})$	Об'єм поживного середовища, $V_{\text{пс}}, \text{ м}^3 (\text{л})$	Коефіцієнт заповнення, $K_{\text{зап}}, \text{ частка}$	Геометричний об'єм ферментера, $V_{\text{ст}}, \text{ м}^3 (\text{л})$
I	2	3	4	5	6	7
V	6.55	7,2	0,72	6,48	0,57	12,5
VI	0.72	0,79	79 (л)	0,71	0,63	1,25
III	0.079	0,087	8,7 л	78,3 (л)	0,56	0,16
II	8.7 (л)	9,57 (л)	0,957	8,61 (л)	0,53	30 (л)
I	0,957 (л)	0,957	-	0,957	0,2	7 колб

## РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

### 4.1. Шлях катаболізму ростового субстрату у продуцента мупіроцину

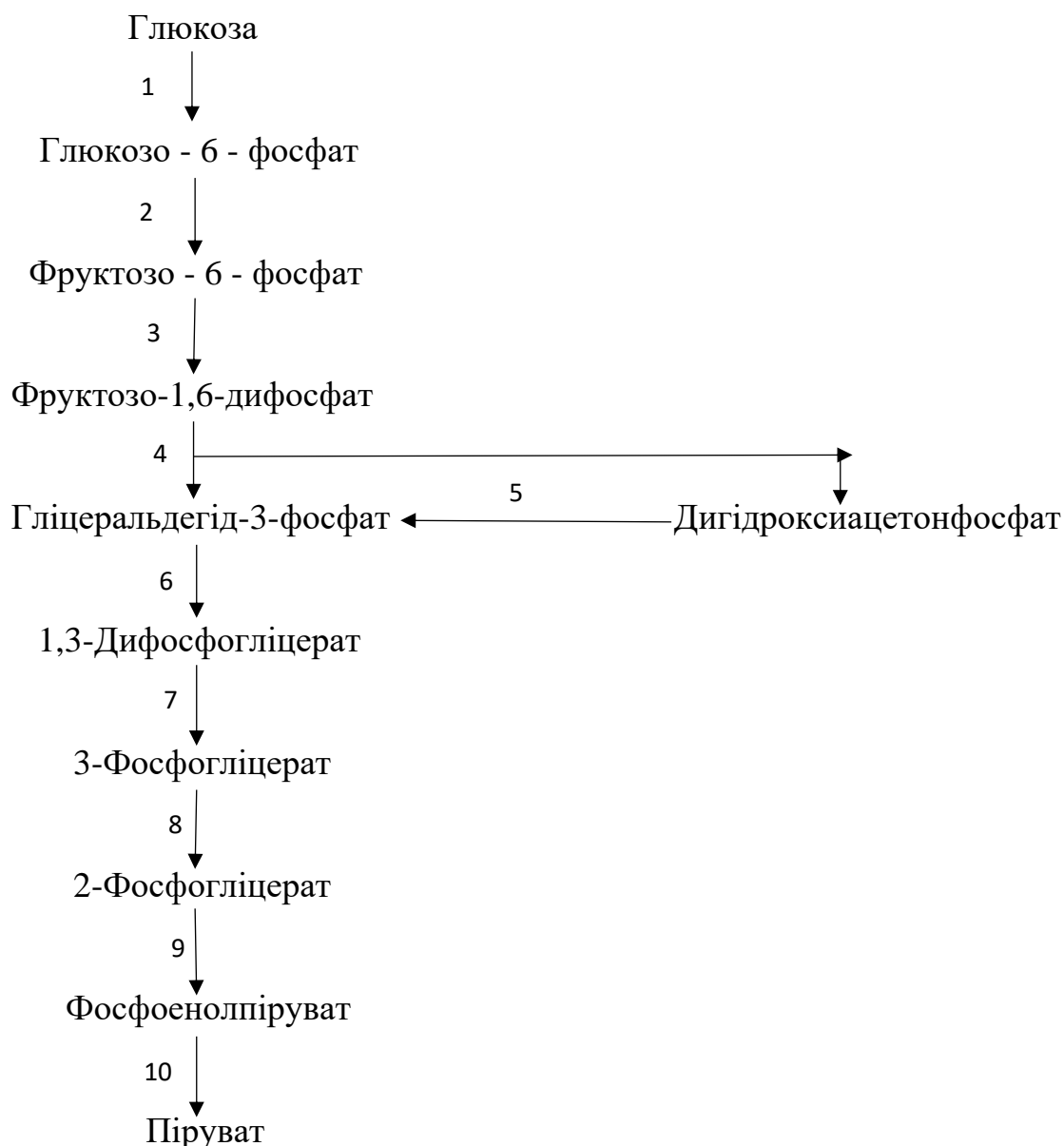
Для вирощування *Pseudomonas fluorescens* в якості джерела вуглецю та енергії використовують глюкозу. Оскільки в Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes [32] не міститься інформація про шляхи катаболізму глюкози для штаму *Pseudomonas fluorescens* NC1MB 10586, то для побудови шляху метаболізму глюкози можна взяти один з наявних штамів, зокрема *Pseudomonas fluorescens* SBW25 [32].

Використовуючи катаболізм цукрів - гліколіз (шлях Ембдена-Мейергофа-Парнаса) як основу для створення катаболічного шляху даного джерела вуглецю, нижче наведено схему перетворення глюкози (рис.4. 1), що представлена в Енциклопедії генів та геномів Kyoto для штаму SBW25.

Глюкоза, за допомогою ферменту глюконокінази (КФ 2.7.1.2), перетворюється на глюкозо-6-фосфат. Потім за дії глюкозо-6-фосфат ізомераз (КФ 5.3.1.9.), цей фосфат перетворюється на фруктозо-6-фосфат. Фруктозо-1,6-бісфосфатаза I (КФ 3.1.3.11) активує перетворення фруктозо-6-фосфату у фруктозо-1,6-дифосфат. Під дією фруктозо-бісфосфатазальдолази II класу (КФ 4.1.2.13), фруктозо-1,6-дифосфат розкладається на гліцеральдегід-3-фосфат та дигідроксиацетонфосфат. Далі, триозофосфатізомераза (КФ 5.3.1.1) перетворює дигідроксиацетонфосфат на гліцеральдегід-3-фосфат. Гліцеральдегід-3-фосфат залучається до подальшого катаболізму глюкози і під дією гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази (КФ 1.2.1.12), перетворюється на 1,3-дифосфогліцерат. Потім фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3) перетворює 1,3-дифосфогліцерат на 3-фосфогліцерат. Дія 2,3-бісфосфогліцератнезалежної фосфогліцератмутази (КФ 5.4.2.12) спричиняє перетворення 3-фосфогліцерату на 2-фосфогліцерат. Енолаза (КФ 4.2.1.11) перетворює

					НУХТ БТЕК 04.02.52 КР ПЗ			
Змн.	Лист.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив		<i>Духота Т.О.</i>			РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевірив		<i>Пенчук Ю.М.</i>					31	88
Консультант						31		
Н. Контр.						Кафедра БТМ		
Затверд.		<i>Стабніков В.П.</i>						

2-фосфогліцерат на фосфоенолпіруват. Нарешті, піруват утворюється з фосфоенолпірувату під дією піруваткінази (КФ 2.7.1.40) [32].



**Рис.4.1. Катаболізм глюкози. Шлях Ембдена-Месйргофа-Парнаса [32]**

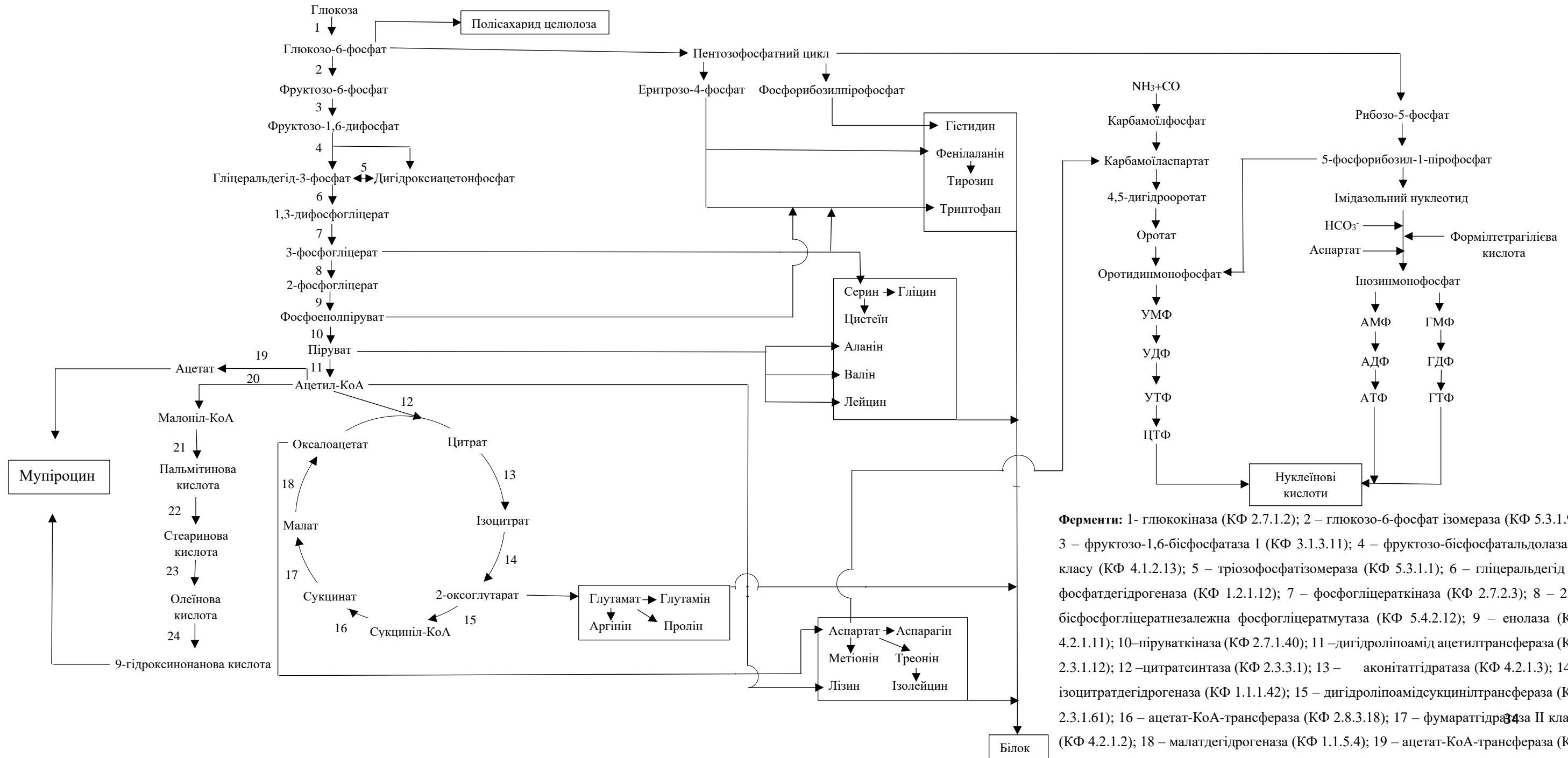
Ферменти: 1 – глюконокіназа (КФ.2.7.1.2); 2 – глюкозо-6-фосфатізомераза (КФ.5.3.1.9); 3 – фруктозо-1,6-бісфосфатаза I (КФ.3.1.3.11); 4 – фруктозо-бісфосфатальдолаза II класу (КФ.4.1.2.13); 5 – триозофосфатізомераза (КФ.5.3.1.1); 6 – гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ.1.2.1.12); 7 – фосфогліцераткіназа (КФ.2.7.2.3); 8 – 2,3-бісфосфогліцератнезалежна фосфогліцератмутаза (КФ.5.4.2.12); 9 – енолаза (КФ.4.2.1.11); 10 – піруваткіназа (КФ.2.7.1.40).

## 4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт

Під час росту *Pseudomonas fluorescens* NC1MB 10586 як джерело вуглецю використовують глюкозу. Піруват в даному випадку утворюється шляхом перетворення глюкози, в результаті гліколізу [32].

З Ацетил-КоА і Малоніл-КоА утворюються основні інтермедіатори мупіроцину, а саме моноа кислота та 9-гідроксинонанова кислота. За допомогою ацетат-КоА-трансфераза (КФ 2.8.3.18) утворюється моноа кислота, ацетат [36]. Для утворення 9-гідроксинонанової кислоти малоніл –КоА за участі ферменту синтази жирних кислот (КФ 2.3.1.85), перетворюється на пальмітинову кислота, яка далі за допомогою елонгази жирних кислот 6 (КФ 2.3.1.199), утворює стеаринову кислоту, що переходить у олеїнову кислоту використовуючи фермент стеаройл-КоА-десатуразу 1 (КФ 1.14.19.1). Завершується утворення даного інтермедіатора за участі ферменту олеатгідратаза (КФ 4.2.1.53) [33-35].

# Схема біотрансформації ростового субстрату у кінцевий продукт [32-35;37]



**Ферменти:** 1- глюкокіназа (КФ 2.7.1.2); 2 – глюкозо-6-фосфат ізомераза (КФ 5.3.1.9); 3 – фруктозо-1,6-бісфосфатаза I (КФ 3.1.3.11); 4 – фруктозо-бісфосфатальдолаза II класу (КФ 4.1.2.13); 5 – триозофосфатізомераза (КФ 5.3.1.1); 6 – гліцеральдегід 3-фосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12); 7 – фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3); 8 – 2,3-бісфосфогліцератнезалежна фосфогліцератмутаза (КФ 5.4.2.12); 9 – енолаза (КФ 4.2.1.11); 10 – піруваткіназа (КФ 2.7.1.40); 11 – дигідроліпоамід ацетилтрансфераза (КФ 2.3.1.12); 12 – цитратсинтаза (КФ 2.3.3.1); 13 – аконітатгідратаза (КФ 4.2.1.3); 14 – ізоцитратдегідрогеназа (КФ 1.1.1.42); 15 – дигідроліпоамідсукцинілтрансфераза (КФ 2.3.1.61); 16 – ацетат-КоА-трансфераза (КФ 2.8.3.18); 17 – фумаратгідратаза II класу (КФ 4.2.1.2); 18 – малатдегідрогеназа (КФ 1.1.5.4); 19 – ацетат-КоА-трансфераза (КФ 2.8.3.18); 20 – ацетил-КоА-карбоксілаза (КФ 6.4.1.2); 21 – синтаза жирних кислот (КФ 2.3.1.85); 22 – елонгази жирних кислот 6 (КФ 2.3.1.199); 23 – Стеароіл-КоА-десатураза

## РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

### Підрозділ 5.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Важливо вибрати правильні умови для культивування *Pseudomonas fluorescens* NC1MB 10586, щоб забезпечити ефективний синтез мупіроцину. Так як, оптимізація умов біосинтезу може допомогти збільшити синтез кінцевого продукту та біомаси.

Безпосередньо фізіолого-біохімічні характеристики біологічного агента впливають на умови та спосіб його культивування. Тому для досягнення максимальної ефективності культивування та синтезу цільового продукту потрібно забезпечити наступні умови:

1. *Pseudomonas fluorescens* NC1MB 10586 є облигатним аеробом, що свідчить про те, що може розвиватись лише при наявності кисню. Культивування такого продуцента може здійснюватись за допомогою поверхневого та глибинного культивування. Глибинне вирощування призводить до збільшення кількості біомаси, порівняно з вирощуванням на поверхні, тому доцільно буде використовувати саме культивування за допомогою такого методу. Це призводить до збільшення вмісту антибіотика в кожному мілілітрі культуральної рідини і підвищення її антибіотичної активності. Глибинне культивування здійснюється за допомогою вирощування бактерії у ферментаторах, де безпосередньо відбувається постійне перемішування та подача кисню [38;41;43].

2. Продуцент мупіроцину є мезофільним нейтрофілом [39-40], тому для запобігання розвитку інших мікроорганізмів, що здатні розвиватись при таких же температурних режимах та рН середовищі, доцільно застосовувати

					НУХТ БТЕК 04.02.52 КР ПЗ			
Змн.	Лист.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив	Духота Т.О.				РОЗІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевірив	Пенчук Ю.М.						35	88
Консультант						Кафедра БТМ 35		
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							

культивування в асептичних умовах. Мезофіли - це мікроорганізми, оптимальна температура росту яких знаходиться в діапазоні від 20°C до 45°C. Нейтрофіли здатні рости в середовищах з нейтральним рН, тобто близько до 7, і можуть виживати в діапазоні рН від 5 до 8. Асептичні умови досягаються шляхом стерилізації обладнання та комунікацій, поживного середовища та повітря. Таким чином, культивування такої бактерії в асептичних умовах дозволяє зберегти оптимальні умови для його росту і розвитку, зменшуючи ризик забруднення культури і конкуренції з іншими мікроорганізмами. [38;42;45].

3. Біосинтез мупіроцину відбувається в процесі періодичного культивування, незважаючи на те, що безперервне культивування має свої вагомні переваги. Такий спосіб був обраний, за рахунок того, що найбільший синтез антибіотика відбувається в стаціонарній фазі росту продуцента. Тому не є доцільним підтримувати штам-продуцента в експоненційній фазі росту, оскільки це може призвести до зниження концентрації антибіотика у культуральній рідині [44]. Отже, культивування продуцента мупіроцину здійснюється періодично глибинним способом в аеробних умовах із забезпеченням асептики.

Біореактор є ідеальним місцем для культивування клітин, оскільки можна точно контролювати умови навколишнього середовища, що забезпечує оптимальну швидкість росту біомаси. Відомо, що ріст та виробництво метаболітів в ферментерах залежить від складу середовища та фізичних умов, таких як змішування, подача повітря, температура, тривалість культивування та розчиненість кисню. Тому опираючись на умови культивування *Pseudomonas fluorescens* NC1MB 10586, можна обрати конструкцію та оснащення ферментера [46-47].

Для біосинтезу мупіроцину, продуцента потрібно забезпечити киснем, так як виходячи із інформації вище, він є облігатним аеробом, а це свідчить про те, що ферментер повинен бути оснащений системою подачі повітря та перемішування. Для підведення повітря в поживне середовище застосовують

барботер, який забезпечує створення повітряних бульбашок та сприяє розподіленню кисню по всьому об'єму реактора через процес дифузії. Для покращення цього процесу поживне середовище піддається механічному перемішуванню мішалкою, що складається із центрального валу та лопатей різної форми. Оскільки вирощування мікроорганізму, що продукує мупіроцин, не вимагає специфічного типу або конструкції перемішувального пристрою, то його можна вибрати довільно [48-49].



**Рис.5.1. Зовнішній вигляд ферментеру від фірми «Solaris» [50]**

Зокрема, ферментери з механічним перемішуванням барботерного типу можуть бути дуже ефективними для культивування цього штаму. Для вирощування продуцента *Pseudomonas fluorescens* NC1MB 10586, підійде ферментер фірми «Solaris» об'ємом 6.3 м<sup>3</sup> серії S-I (Standard industrial equipment) [50], оскільки ця фірма спеціалізується на виготовленні реакторів різної ємності з нержавіючої сталі, а саме об'ємом від 5 літрів до 30 м<sup>3</sup>, апарати даної фірми має широкий діапазон вимірювань і параметрів контролю, включаючи датчиками температури, кисню, оптичної густини. Всі ферментери цієї серії компактні та гнучкі з можливістю бути встановлюється навіть у місцях з обмеженим простором.

## **Підрозділ 5.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря**

Для біосинтезу мупіроцину, продуцента потрібно забезпечити киснем, так як *Pseudomonas fluorescens* NC1MB 10586 є облигатним аеробом. Відповідно до цього важливою задачею є забезпечення бактерії великою кількістю стерильного повітря, яке подається через барботер, під час всього ферментаційного процесу.

Тому основною ціллю стадії підготовки аераційного повітря є забезпечення його чистоти, для запобігги проникненню шкідливих мікроорганізмів із навколишнього середовища, які можуть перешкодити росту та розмноженню продуцента. Система підготовки повітря відбувається ступінчасто. Щоб отримати стерильне повітря, відповідно до існуючих стандартів, безпосередньо існує процес фільтрування, який забезпечується за допомогою фільтрів різного ступення очищення, до яких відносять фільтри грубої та тонкої очистки, а також індивідуальний фільтер перед подачею повітря у ферментер. Важливо зазначити, що забор повітря зазвичай відбувається на висоті 30 м від найвищої точки будівлі. Після цього повітря проходить певні етапи фільтрації для досягнення 99,99% стерильності.

На першому етапі повітря після забору проходить через фільтри грубого очищення. Метою даного етапу є видалення більших часток, пилу, волосся та інших домішок із повітря. Безпосередньо це допомагає попередньо очистити повітря перед подальшими етапами фільтрації. Дані фільтри зазвичай мають ефективність очищення від 60%-90%, затримуючи при цьому часточки від 5 мкм, за допомогою встановлених на них для фільтрації тканних матеріалів.

На другому етапі використовуються фільтри тонкого очищення. На цьому моменті використовуються більш дрібні фільтри, які здатні усувати менші частки, включаючи бактерії, віруси, грибки, спори та інші мікроорганізми з повітря. Це подальше покращення якості очищення повітря.

Як третій етап очищення існують так звані фільтри індивідуального очищення. Для очищення повітря до прийнятих стандартів потрібно використовувати фільтри з більшою ефективністю фільтрації, наприклад високоефективні повітряні фільтри для твердих частинок (HEPA). Фільтри типу HEPA використовують на фінішних стадіях очистки повітря, тобто безпосередньо перед подачею у ферментер. Конструкція фільтра HEPA: фолонка для фільтрації, діаметр скловолонка у яких становить 0,5 -2 мікрона [49; 51-52].

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

Мийно-дезінфікуючі засоби є невід'ємною частиною процесу виробництва антибіотиків, які включають в себе ряд важливих функцій. Безпосередньо, вони гарантують високий рівень чистоти та гігієни на виробничих ділянках, що є важливим для запобігання забрудненню продукції мікробами або іншими забруднюючими речовинами. Також, мийно-дезінфікуючі засоби містять активні компоненти, які ефективно знищують бактерії, грибки та віруси, що можуть присутні на поверхнях обладнання, посуду або виробничих приміщеннях. Це допомагає знизити рівень перехресної контамінації при виробництві антибіотиків, що може вплинути на їхню якість або ефективність.

Оптимальна площа виробничого приміщення, в якій встановлено ферментер (12,5 м<sup>3</sup>), посівний апарат (1,25 м<sup>3</sup>), інокулятор (160) і (30 л), збірники, автоклав та інше обладнання становить 280 м<sup>2</sup>. Загальний об'єм реакторів та апаратів для вирощування посівного матеріалу і виробничого біосинтезу становить 31 м<sup>3</sup>. Прийmemo висоту стін 6 м.

Для забезпечення чистоти виробничих приміщень, проводиться щоденне миття підлоги, що відповідно до кількості трудоднів становить 105 разів. Обов'язково здійснюється генеральне прибирання, з частотою 1 раз на місяць, тобто 3 рази на 105 днів. Площа підлоги цеху виробничого біосинтезу

становить 280 м<sup>2</sup> (10×28 м), тоді площа стін –  $[(10 \times 6) + (28 \times 6)] \times 2 = 456$  м<sup>2</sup>, загальна площа –  $280 + 456 = 736$  м<sup>2</sup>.

Кількість виробничих циклів для синтезу мупіроцину становить 44, враховуючи, що потрібно мити обладнання перед кожним циклом і після останнього, то кількість миття буде 45 разів. Тоді загальний об'єм миття становитиме:  $31 \times 44 = 1\,364$  м<sup>3</sup>. Узагальнені дані щодо розрахунку площі миття та/або дезінфекції за весь період виробництва наведено в табл. 5.1.

Таблиця 5.1.

**Розрахунок загальної площі миття та/або дезінфекції  
оброблюваного об'єкту за весь період виробництва мупіроцину**

<b>Об'єкт миття та/або дезінфекції</b>	<b>Площа (об'єм) оброблюваного об'єкту, м<sup>2</sup> (м<sup>3</sup>)</b>	<b>Кількість процесів миття та/або дезінфекції за весь період виробництва</b>	<b>Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м<sup>2</sup> (м<sup>3</sup>)</b>
Обладнання	31	45	1 395
Підлога	280	105	29 400
Стіни, двері, вікна	456	3	1 368

Дезактін - дезінфекційний засіб з мийним ефектом виробництва ТОВ "ДЕЛАНА" (Україна). Склад: 1,3-дихлор-5,5-диметилгідантоїн (дихлорантин) - 21,0-23,0% (діюча речовина); 5,5-диметилгідантоїн - 12,4-16,4%; диспергатор – 9,0-12,0%; аніонні ПАВ – 3,2-5,0%; інгібітор корозії – до 10,0%; наповнювач – до 100,0%.

Даний засіб дозволений для проведення очищення поверхонь приміщень та обладнань фармацевтичних підприємств. Він характеризується широким спектром антимікробної дії, що полягає в бактерицидних, спороцидних і протигрибкових властивостях. Безпосередньо він ефективно усуває різні віруси, грибки й бактерії. Змочує, емульгує і миє. З легкістю справляється з такими видами забруднень, як: білкові, жирові та механічні, кров, залишки ліків тощо. Цей засіб швидко та якісно очищує лабораторне

обладнання та спеціалізоване лікарняне устаткування і максимально дезінфікує об'єкт обробки [53;57].

Біомой - дезінфекційний засіб виробництва фірми НВ ТОВ "Фармакос"(Україна). Склад: алкілбензолсульфонат натрію (сульфанол) 5,0-8,0%; лужна протеаза 1,0-1,1%, карбонат натрію; диспергатор; наповнювач.

Даний засіб застосовують для достерилізаційного очищення виробів медичного призначення із металу, скла, гуми та полімерних матеріалів, а також для миття поверхонь приміщень, підлоги. Біомой виявляє змочувальні, мийні, емульгуючі властивості, видаляє білкові, жирові забруднення, лікарських та дезінфекційних засобів із зовнішніх, легко змивається з оброблених виробів, не залишає нальоту [54;56].

Гембар - дезінфекційний засіб виробництва фірми НВЦ "Біоцид" (Україна). Препарат має пролонговану бактерицидну, фунгіцидну, віруліцидну дію. Інактивує мікроби, в тому числі туберкульозу, грибки, віруси. Добре розчиняється у воді. Не ушкоджує об'єкти, виготовлені з металу, скла, полімерних матеріалів та гуми. Засіб належить до малонебезпечних речовин, тому не подразнює шкіру [55;58].

Таблиця 5.2.

**Узагальнена характеристика витрат миючих та дезінфікуючих засобів для виробництва мупіроцину**

Назва засобу	Об'єкт миття та/або дезінфекції	Концентрація робочого розчину, %	Вартість 1 л (кг) мийного або дез. засобу, Грн/л(кг)	Вартість 1 л робочого розчину мийного або дез.засобу, Грн/л	Витрати роб.розчину, л/м <sup>2</sup>	Ефективність використання дез.розчину, Е <sub>дз</sub> , Грн/м <sup>2</sup>
Дезактін	Поверхня приміщень та обладнання	0,2	614	1,3	0,1	6,5
Біомой	Поверхня приміщень та обладнання	0,5	295	1,5	0,1	7,5
Гембар 25	Підлога	0,4	516	2,1	0,1	10,5

Відповідно до результатів розрахунку, що наведені у Таблиці 5.2, обираємо у якості найбільш ефективного дезінфікуючого засобу «Дезактін» ТОВ "ДЕЛАНА". Важливо зазначити, що періодично потрібно змінювати типи дезінфікуючих засобів, оскільки без даних дій, дезінфікуючий засіб може втратити свою дію, через пристосування до його дії сторонньої мікробіоти.

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

Згідно до розрахунків, що були здійснені у розділі 3, виробничий біосинтез мупіроцину проходить у ферментері об'ємом 12,5 м<sup>3</sup>. Інокулянт отримують у чотири етапи: у колбах на качалці, в інокуляторах об'ємом 30, 160 л і посівному апараті об'ємом 1,25 м<sup>3</sup>.

Для виробничого біосинтезу мупіроцину *Pseudomonas fluorescens* NC1MB 10586 використовується середовище такого складу (г/л):

- Глюкоза – 60;
- Соєве борошно – 2;
- Кукурудзяний екстракт – 5;
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 1;
- KН<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1,5;
- KCl – 1;
- MgSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O – 0,5;
- CaCO<sub>3</sub> – 6,25;

Стерилізацію середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках будемо здійснювати в автоклаві, оскільки його об'єм невеликий (957 мл). Проаналізувавши склад поживного середовища, умовно ділимо його на такі композиції (залежно від режиму стерилізації компонентів):

*Композиція А:* глюкоза, кукурудзяний екстракт, соєве борошно (112-115°C, 20...30 хв. при P=0,05 МПа)

*Композиція Б:* MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, KCl (131°C, 40...60 хв. при P=0,15 МПа)

*Композиція В:* Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (131°C, 40...60 хв. при P=0,15 МПа)

*Композиція Г:* CaCO<sub>3</sub> (131°C, 40...60 хв. при P=0,15 МПа)

Глюкози, соєве борошно та кукурудзяний екстракт є термолабільними компонентами, їх буде стерилізовано в одній окремій колбі в автоклаві при температурі 112°C протягом 30 хвилин. Цей режим стерилізації є більш м'яким, ніж той, який використовується для стерилізації солей. Важливо зазначити, що перед стерилізацію соєве борошно попередньо заварюється на водяній бані. Для стерилізації солей композиції Б використовують стандартну для солей температуру, тоді як фосфати композиції В стерилізують окремо, щоб уникнути утворення нерозчинних фосфатів магнію та кальцію. Для регулювання рівня рН в середовищі використовується карбонат кальцію (Композиція Г), який завжди стерилізується окремо від інших компонентів при температурі 131°C протягом 40-60 хвилин.

#### **Особливості підготовки поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках**

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках наведений у табл. 5.3:

Таблиця 5.3.

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

<b>Компонент поживного середовища</b>	<b>Вміст, г/л</b>	<b>Кількість для приготування 957 мл середовища, г</b>	<b>Композиції</b>	<b>Об'єм композиції, V, мл</b>
Глюкоза	60	57,4	А	830
Соєве борошно	2	1,9		
Кукурудзяний екстракт	5	4,8		
Вода	≈ 766 мл			

MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,5	0,48	Б	18,6
KCl	1	0,96		
Вода	≈ 17 мл			
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1	0,96	В	30,97
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5	0,44		
Вода	≈ 30 мл			
CaCO <sub>3</sub>	6,25	5,98		
Вода	≈ 71 мл		Г	77,4

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

*Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 30 л*

Для цієї стадії необхідно 8,61 л поживного середовища. Композицію Б стерилізують при більш жорстких умовах порівняно з композицією А, так як компоненти цих композицій є солями. Композицію В стерилізують окремо до моменту ведення даного компоненту у ферментер. Соеве борошно з композиції А заварюють, а потім стерилізують разом з іншими компонентами композиції в окремому реакторі-змішувачі.

Композицію Б готують та стерилізують в інокуляторах. Після об'єднання композицій Б і В в одну (композиція Б), важливо щоб солі магнію і фосфати не утворили нерозчинний осад магній фосфату, тому перед стерилізацією необхідно довести рН до 4,5...5,0, даний результат можна отримати приготуванням та додаванням розчину 6 - % соляної кислоти. Після охолодження перед внесенням посівного матеріалу, рН треба довести до оптимального рівня для якого зазвичай використовують 6 - % розчин гідроксиду натрію. Важливо зазначити, що при стерилізації утворюється конденсат (10%). Композиція В стерилізується у реакторі- змішувачі.

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 30 л наведений у табл. 5.4.:

Таблиця 5.4.

**Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 30 л**

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 8,61 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, V, л
Глюкоза	60	516,6	А	7,47
Соєве борошно	2	17,22		
Кукурудзяний екстракт	5	43,1		
Вода	≈ 6 204 мл			
Конденсат	≈ 689 мл			
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,5	4,3	Б	0,45
KCl	1	8,6		
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1	8,6		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5	12,9		
Вода	≈ 374 мл			
Конденсат	≈ 42 мл			
CaCO <sub>3</sub>	6,25	53,8	В	0,69
Вода	≈ 572 мл			
Конденсат	≈ 64 мл			

*Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 160 л*

Для цієї стадії необхідно 78,3 л поживного середовища, склад композицій та умови їх стерилізації аналогічні пункту вирощуванню інокуляту в посівному апараті об'ємом 30 л. Соєве борошно завжди перед стерилізацією попередньо заварюється на водяній бані. Для композиції Б, важливим етапом підготовки є те щоб солі магнію і фосфати не утворили

нерозчинний осад магній фосфату, тому перед стерилізацією рН доводиться до 4,5...5,0, за допомогою приготування та додавання розчину 6 - % соляної кислоти. Після охолодження перед внесенням посівного матеріалу, рН доводять до оптимального рівня для якого зазвичай використовують 6 - % розчин гідроксиду натрію.

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 160 л наведений у табл. 5.5.:

Таблиця 5.5.

**Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 160 л**

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 78,3 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, V, л
Глюкоза	60	4 698	А	67,8
Соєве борошно	2	157		
Кукурудзяний екстракт	5	392		
Конденсат	≈ 6 255 мл			
Вода	≈ 56 298 мл			
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,5	39	Б	4,1
KCl	1	78		
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1	78		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5	118		
Конденсат	≈ 379 мл			
Вода	≈ 3 408 мл			
CaCO <sub>3</sub>	6,25	489	В	6,3
Конденсат	≈ 581 мл			
Вода	≈ 5 230 мл			

### *Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 1,25 м<sup>3</sup>*

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 1,25 м<sup>3</sup> наведений у табл. 5.6.

Таблиця 5.6.

#### **Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 1,25 м<sup>3</sup>**

<b>Компонент поживного середовища</b>	<b>Вміст, г/л</b>	<b>Кількість для приготування 710 л середовища, г</b>	<b>Композиції</b>	<b>Об'єм композиції, V, л</b>
Глюкоза	60	42 600	А	615,6
Соеве борошно	2	1 420		
Кукурудзяний екстракт	5	3 550		
Конденсат	≈ 57 л			
Вода	≈ 511 л			
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,5	355	Б	36,9
KCl	1	710		
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1	710		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5	1065		
Конденсат	≈ 3 л			
Вода	≈ 31 л			
CaCO <sub>3</sub>	6,25	4 438	В	57,5
Конденсат	≈ 5 л			
Вода	≈ 48 л			

Для цієї стадії необхідно 0,71 м<sup>3</sup> поживного середовища. Склад композицій та умови їх стерилізації аналогічні пункту вирощуванню інокуляту в посівному апараті об'ємом 30 л. Соеве борошно перед стерилізацією попередньо заварюється на водяній бані. Для того щоб солі магнію і фосфати не утворили нерозчинний осад магній фосфату, перед

стерилізацією рН доводиться до 4,5...5,0, за допомогою приготування та додавання розчину 6 - % соляної кислоти. Після охолодження перед внесенням посівного матеріалу, рН треба довести до оптимального рівня для якого зазвичай використовують 6 - % розчин гідроксиду натрію.

### **Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 12,5 м<sup>3</sup>**

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 12,5 м<sup>3</sup> наведений у табл. 5.7:

Таблиця 5.7.

#### **Склад композицій для стерилізації поживного середовища в УСБ-5**

<b>Компонент поживного середовища</b>	<b>Вміст, г/л</b>	<b>Кількість для приготування 6,48 м<sup>3</sup> середовища, кг</b>	<b>Композиції</b>	<b>Об'єм композиції, V, л</b>
Глюкоза	60	389	А	5 956
Соєве борошно	2	13		
Кукурудзяний екстракт	5	32		
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,5	3		
KCl	1	7		
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1	7		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5	10		
CaCO <sub>3</sub>				
Конденсат	≈ 550 л			
Вода	≈ 4 945 л			
CaCO <sub>3</sub>	6,25	41	Б	524
Конденсат	48			
Вода	435			

Для цієї стадії необхідно  $6,48 \text{ м}^3$  поживного середовища. Такий об'єм поживного середовища економічно доцільніше стерилізувати в установці безперервної стерилізації. Перевагою використання УБС є можливість одночасної стерилізації як термолабільних, так і термостабільних компонентів середовища, а також фосфорних солей з солями кальцію та магнію. Безпосередньо це дозволить зменшити час обробки, а також зменшити інші витрати під час стерилізації. Спочатку у цьому реакторі-змішувачі заварюються соєве борошно, після чого в нього ж подаються всі інші компоненти. Так як у поживному середовищі наявний такий компонент як  $\text{CaCO}_3$ , який використовується для регуляції рН, його ми будемо стерилізувати в окремому реакторі змішувачі.

### **Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН та стерилізація піногасника**

#### **Стерилізація піногасника**

В якості піногасника використовується синтетичний засіб Пропінол Б-400, який відразу є готовим до стерилізації. Даний вибір, обумовлений тим, що дані піногасники є найбільш перспективним фізико-хімічним методом, що допомагає в усуненні піноутворення і є кращим за природні піногасні речовини. Витрата даної речовини становить 0,1-0,5% від об'єму КР, таким чином для інокулятора на 30 л потрібно 25 мл, на 160 л – 480 мл, на  $1,25 \text{ м}^3$  – 3,75 л та для ферментера на  $12,5 \text{ м}^3$  – 37,5 л. Безпосередньо стерилізація буде проходити у збірнику за таких умов: 30 хв за температури  $120 \text{ }^\circ\text{C}$  [49, 92].

#### **Приготування та стерилізація розчинів для регуляції рН**

Для корегування рН середовища під час культивування у інокуляторах об'ємом 25, 160 л, у посівному апараті об'ємом  $1,25 \text{ м}^3$  та ферментері об'ємом  $25 \text{ м}^3$ , додають 6%  $\text{HCl}$  та  $\text{NaOH}$  загальною кількістю 0.2% від об'єму культуральної рідини. У таблиці 5.8. наведено особливості приготування і стерилізації середовища для вирощування інокуляту і виробничого

біосинтезу. Приготування відбувається у колбах та реакторах відповідного об'єму.

Таблиця 5.8.

**Розрахунок вмісту та особливості приготування деяких компонентів поживного середовища**

Об'єм середовища, л	HCl (6%)		NaOH (6%)	
	Об'єм, мл	Особливість приготування	Об'єм, мл	Особливість приготування
0,957	-	-	-	-
8,61	17,2	У колбі на 100 мл	17,2	У колбі на 100 мл
78,3	156,6	У колбі на 500 мл	156,6	У колбі на 500 мл
710	1420	У реакторі на 5 л	1420	У реакторі на 5 л
6,48 м <sup>3</sup>	12960	У реакторі на 50 л	12960	У реакторі на 50 л

Особливості приготування 6% розчину NaOH, для об'ємів середовищ 8,61 л, 78,3 л, 710 л, 6,48 м<sup>3</sup> наведено у таблиці 5.8. Після приготування даного титрувального розчину, відбувається його стерилізація, що проходить при таких умовах 120<sup>0</sup>С, 20 хв та тиску 0.1 МПа.

## РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

У таблиці 6.1 представлено специфікацію ферментаційного обладнання, наведеного у графічній частині (апаратурна схема) даного курсового проекту.

Таблиця 6.1.

### Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу мупіроцину

Позиція 1	Найменування 2	Кількість 3	Технічна характеристика (виробник) 4
ПЗ-1	Повітрязабірник	1	Повітрязабірник. Обладнений металевою сіткою для видалення механічних забруднень. Компанія: «Промтрубопроводкомплект» (Україна) [59]
Ф-2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтр комірковий ФЯУ для грубого очищення повітря. Складається з металевого каркасу, в який вставляється касета з фільтруючим матеріалом - скловолокном. Продуктивність 1540 м <sup>3</sup> /год. Стартовий опір 40 Па. Ефективність очистки 80%. Компанія: «Укрвентисистеми» (Україна) [60]
К-3	Компресор	1	Компресор INTERTOOL PT-0040. Тиск 10 бар. Продуктивність 1050 л/хв. Двигун 7,5 кВт. Компанія: «INTERTOOL» (Україна) [61]
Т-4	Теплообмінник охолоджувач	1	Канальний охолоджувач Вентс ОКВ 400x200-3. Матеріал корпусу виконаний з листової оцинкованої сталі, трубні колектори виготовлені з мідних труб, алюмінієві пластини представляють собою поверхню теплообміну. Максимальний робочий тиск 15 бар. Компанія: «VENT-MARKET» (Україна) [62]

					НУХТ БТЕК 04.02.52 КР ПЗ			
Змн.	Лист.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив	Духота Т.О.				РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевірив	Пенчук Ю.М.						51	88
Консультант						Кафедра БТМ <sup>51</sup>		
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							

Продовження табл. 6.1

P-5	Ресивер	1	Ресивер повітряний РВ900.818.01. Об'єм 900 л. Матеріал корпусу – нержавіюча сталь. Робочий тиск 10 бар. Компанія: «Лідер» (Україна) [63]
T-6	Теплообмінник нагрівач	1	Теплообмінник (нагрівач повітря водяний). Конструктивно корпус виконаний з оцинкованої сталі. Монтажний розмір 1000 x 500 (мм), довжина 200 мм. Потужність теплообмінника складає 80 кВт, при температурі теплоносія 70°C. Компанія: «Галактик» (Україна) [64].
Ф-7	Головний фільтр очистки	1	Панельні повітряні фільтри для тонкого очищення повітря, клас фільтрації F9. Кінцевий перепад тиску 450 Па, Мінімальна ефективність частки 0,4 мкм. Компанія: «Alter Air» (Україна) [65].
ІФ-8 ІФ-13 ІФ-20 ІФ-30	Індивідуальний фільтр очистки	4	НЕРА фільтр 595*595*78. Ступінь очищення H14. Виготовлені з використанням високоякісного фільтрувального матеріалу з ультратонких та мікротонких скляних волокон. Компанія: «TechnoParts» (Україна) [66].
P3-9	Реактор для стерилізації піногасника	1	Реактор з мішалкою та сорочкою нагріву. Об'єм - 125 л. Виготовлений з нержавіючої сталі. Кількість обертів: 0-3000 об/хв. Потужність: 14 кВт. Компанія: «STS Group» (Україна) [67]
P3-10	Реактор-змішувач для приготування композиції А	1	Реактор ЄМК Р-20 з мішалкою та сорочкою нагріву. Об'єм - 20 л. Виготовлений з високоякісної нержавкої сталі. Кількість обертів: 40 об/хв. Потужність: 1 кВт. Компанія: «АгроВекто» (Україна) [68].
НВ-11 НВ-14 НВ-16 НВ-18 НВ-22 НВ-26 НВ-28 НВ-35	Насос відцентровий	8	Моноблочний відцентровий насос Pentax CM 32-160 C. Продуктивність: 21 м <sup>3</sup> /год; максимальний робочий тиск: 10 бар. Компанія: «PENTAX» (Італія) [69].

Продовження табл. 6.1.

I-12	Інокулятор	1	Біореактор Techfors-S, Infors, об'ємом 30 літрів. Матеріал корпусу: нержавіюча сталь; містить сорочку, мішалку з регульованою швидкістю перемішування: 20–600об/хв; із датчиками вимірювання рН, рО <sub>2</sub> , температури, манометром; Компанія: «BiostatCplus» (Італія) [70].
P3-13	Реактор-змішувач для приготування композиції А	1	Хімічний реактор з мішалкою та сорочкою нагріву. Об'єм - 125 л. Виготовлений з нержавіючої сталі. Кількість обертів: 0-3000 об/хв. Потужність: 14 кВт. Компанія: «STS Group» (Україна) [71].
P3-15 P3-17	Реактор-змішувач для приготування композиції Б та В	2	Реактор miniPilot. Об'єм - 10, 15 літрів. Виготовлений з боросилікатного скла. Кількість обертів: 0-600 об/хв. Компанія: «miniPilot» (Україна) [72].
I-19	Інокулятор	1	Біореактор Techfors. Об'єм 160 літрів. Матеріал корпусу: нержавіюча сталь; містить сорочку, мішалку з регульованою швидкістю перемішування: 1000 – 1500 об/хв; із датчиками вимірювання рН, рО <sub>2</sub> , температури, манометром; Компанія: «Techfors» [73].
P3-21	Реактор-змішувач для приготування композиції А	1	Реактор хімічний з нержавіючої сталі з мішалкою та сорочкою 1000 літрів. Потужність: 5.5 кВт. Кількість обертів: 70 об/хв. Компанія: «STS Group» (Україна) [74].
P3-23	Реактор-змішувач для приготування 6% розчину соляної кислоти	1	Реактор miniPilot. Об'єм - 5 літрів. Виготовлений з боросилікатного скла. Кількість обертів: 0-600 об/хв. Компанія: «miniPilot» (Україна) [72].
P3-24	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації 6% розчину натрію гідроксиду	1	Реактор miniPilot. Об'єм - 5 літрів. Виготовлений з боросилікатного скла. Кількість обертів: 0-600 об/хв. Компанія: «miniPilot» (Україна) [72].
P3-25 P3-27	Реактор-змішувач для приготування композиції Б та В	1	Хімічний реактор з мішалкою та сорочкою нагріву. Об'єм - 125 л. Виготовлений з нержавіючої сталі. Кількість обертів: 0-3000 об/хв. Потужність: 14 кВт. Компанія: «STS Group» (Україна) [71].

Продовження табл. 6.1.

I-29	Інокулятор	1	Інокулятор фірми «Solaris» об'ємом 1,25 м <sup>3</sup> серії S-I (Standard industrial equipment) Матеріал: нержавіюча сталі, апарат має широкий діапазон вимірювань і параметрів контролю, включаючи датчиками температури, кисню, оптичної густини. Оснащений мішалкою. Компанія: «Solaris» (Італія) [75].
P3-31	Реактор-змішувач для приготування 6% розчину соляної кислоти	1	Реактор Р-50, 50 л. Установлення обладнане дворівневою мішалкою закритого типу, з постійною швидкістю обертання 140 обертів на хвилину. Компанія: «Агровектор» (Україна) [76].
P3-32	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації 6% розчину натрію гідроксиду	1	Реактор Р-50, 50 л. Установлення обладнане дворівневою мішалкою закритого типу, з постійною швидкістю обертання 140 обертів на хвилину. Компанія: «Агровектор» (Україна) [76].
P3-33	Реактор-змішувач для приготування композиції А	1	Реактор для змішування продуктів. Ємність оснащена сорочками (підігрівом), мішалками. Матеріал: нержавіюча сталь. Об'єм 15 м <sup>3</sup> . Компанія: «Ємкості» (Україна) [77].
P3-34	Реактор-змішувач для приготування композиції Б	1	Реактор хімічний з нержавіючої сталі з мішалкою та сорочкою 1000 літрів. Потужність: 5.5 кВт. Кількість обертів: 70 об/хв. Компанія: «STS Group» (Україна) [74].
Д-36	Об'ємно – ваговий дозатор	1	Бункерний дозатор СБ-150. Ваговий дозатор сипучих матеріалів. Вага однієї порції, до 625 кг. Компанія: «Ваговимірювальні системи» [78].
НВ-37	Насос відцентровий для перекачування композиції А від P3-32 до УБС-35	1	Моноблочний відцентровий насос Pentax CM 32-160 С. Продуктивність: 21 м <sup>3</sup> /год; максимальний робочий тиск: 10 бар. Компанія: «PENTAX» (Італія) [69].
УБС-38	Установка безперервної стерилізації	1	Установка безперервної стерилізації, продуктивність 5 м <sup>3</sup> /год. Установка складається із реактора-змішувача, колонки для нагрівання поживного середовища та теплообмінника труба у трубі.

Закінчення табл. 6.1.

НП-39	Насос відцентровий для перекачування композиції А від УБС-35 до ферментера	1	Відцентровий насос Pentax CM 32-160С. Продуктивність: 21 м <sup>3</sup> /год; Максимальний робочий тиск: 10 бар. Компанія: «PENTAX» (Італія) [79].
Ф-40	Ферментер	1	Ферментер фірми «Solaris» об'ємом 12,5 м3 серії S-I (Standard industrial equipment) Матеріал: нержавіюча сталі, апарат має широкий діапазон вимірювань і параметрів контролю, включаючи датчиками температури, кисню, оптичної густини. Компанія: «Solaris» (Італія) [80].

## РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

### ДР 1. Підготовка аераційного повітря

#### ДР 1.1. Забір атмосферного повітря

Для забору повітря використовується повітрозабірник (ПЗ-1), розташований на висоті 30 метрів. При визначенні місця для забору зовнішнього повітря необхідно враховувати наявні та можливі джерела забруднень у вигляді аерозолів та газів.

#### ДР 1.2. Очищення від грубих домішок

На цьому етапі проводиться попередня очистка повітря, що включає в себе затримку великих частин пилу, за допомогою фільтра грубої очистки типу ФЯУ (Ф-2) з ефективністю очищення на рівні 80%. Після проходження даного етапу очищення чисте повітря подається до компресора.

#### ДР 1.3. Компресювання повітря

Під час даного етапу повітря піддається стисненню у компресорі (К-3). Під час цього процесу відбувається підігрів повітря до температури 120-200 °С при тиску 0,35 МПа.

#### ДР 1.4. Охолодження повітря та видалення вологи

Отримане стиснене повітря (ДР.1.3.), піддається охолодженню за допомогою теплообмінника-охолоджувача (Т-4) до температури в межах 25-30 °С з метою видалення надмірної вологості. Надлишкову вологу видаляють за допомогою ресивера (Р-5).

#### ДР 1.5. Нагрівання повітря

Для подальшої ефективної роботи головного і індивідуального фільтрів, повітря нагрівають до температури до 60°С в теплообміннику-нагрівачі (Т-6).

#### ДР 1.6. Очищення повітря в головному фільтрі

Подальше очищення повітря відбувається у головному фільтрі (Ф-7).

					НУХТ БТЕК 04.02.52 КР ПЗ			
Змн.	Лист.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив		Духота Т.О.			РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевірив		Пенчук Ю.М.					56	88
Консультант						Кафедра БТМ <sup>56</sup>		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Для головних фільтрів використовується панельні повітряні фільтри для тонкого очищення повітря, клас фільтрації F9.

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

Завершаючий етап очищення повітря від забруднення здійснюється в індивідуальному фільтрі (ІФ-8), вони наявні над кожним ферментером для подачі стерильного повітря. Фільтруючий матеріал являє собою ультратонкі та мікротонких скляні волокна. Ступінь очищення становить Н14.

### **ДР 4. Приготування та стерилізація поживних середовищ**

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

На початковій стадії потрібно підготувати 957 мл поживного середовища, яке є важливою складовою частиною культивування бактерій для синтезу мупіроцину. Вміст компонентів для цієї стадії наведено у табл. 5.3 (розділ 5). Дані розрахунків заокруглено для практичної зручності.

#### *ДР 4.1.1. Приготування та стерилізація композиції А*

На технічних вагах зважують 1,9 г соєвого борошна та поміщають у колбу об'ємом 2 л, після чого додають 766 мл води, премішують та проводять розварювання на водяній бані, з магнітною мішалкою при температурі 80°C протягом 40 хв. Далі за допомогою технічних ваг зважують 57,4 г глюкози та 4,8 г кукурудзяного екстракту, наважки поміщають у колбу до соєвого борошна та перемішують, після чого колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112°C (30 хв, тиск 0,05 МПа).

#### *ДР 4.1.2. Приготування та стерилізація композиції Б*

На технічних терезах зважують 0,48 г  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  і 0,96 г  $\text{KCl}$ . Наважки поміщають у колбу об'ємом 100 мл, додають 17 мл води питної, перемішують, закривають ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °C (40 хв, тиск 0,15 МПа).

#### *ДР 4.1.3. Приготування та стерилізація композиції В*

На технічних терезах зважують 0,44 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  та 0,96 г  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , поміщаємо у колбу об'ємом 150 мл і розчиняють у 30 мл дистильованої води, закривають ватно-марлевым корком та стерилізують в автоклаві при  $131^\circ\text{C}$  (40 хв тиск - 0,15 МПа).

#### *ДР 4.1.4. Приготування та стерилізація композиції Г*

На технічних терезах зважують 5,98 г  $\text{CaCO}_3$ . Наважку поміщають у колбу об'ємом 250 мл та додають 71 мл води. Далі композицію перемішують, колбу закривають ватно-марлевым корком та стерилізують у в автоклаві при  $131^\circ\text{C}$  (40 хв тиск - 0,15 МПа).

*ДР 4.2. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокулянту в посівному апараті об'ємом 30 л.*

Для отримання інокулянту необхідно приготувати 8,61 л поживного середовища. Враховуючи, що при стерилізації утворюється конденсат (10%), загальна кількість води, яку потрібно додати для приготування середовища становить 7,2 л. Вміст компонентів для приготування такої кількості поживного середовища наведено у табл. 5.4. (Розділ 5)

#### *ДР 4.2.1. Приготування та стерилізація композиції А*

На технічних вагах зважують 17,22 г соєвого борошна. Далі його поміщають у реактор-змішувач (РЗ-10), добавляють 6,2 л води та перемішують. Після чого поступово нагрівають вміст реактора до температури  $80^\circ\text{C}$  за рахунок подачі пари у сорочку апарату і витримуючи при такій температурі упродовж 40 хв., таким чином проводять розварювання. Далі на технічних вагах зважують 516,6 г глюкози та 43,1 г кукурудзяного екстракту та додають до соєвого борошна. Розчин перемішують та стерилізують в автоклаві при температурі  $112^\circ\text{C}$  упродовж 30 хв.

#### *ДР 4.2.2. Приготування та стерилізація композиції Б*

На технічних вагах зважують 4,3 г  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 12,9 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 8,6 г  $\text{KCl}$  та  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , та поміщають у колбу об'ємом 2000 мл. До композиції додають 374 мл води та перемішують. Стерилізуємо у автоклаві при  $131^\circ\text{C}$

протягом 40 хв (тиск - 0,15 МПа). Для запобігання випадіння фосфатів магнію в осад, до композиції додають 6% розчин соляної кислоти (НСІ).

#### *ДР 4.2.3. Приготування та стерилізація композиції В*

На технічних терезах зважують 53,8 г  $\text{CaCO}_3$ . Поміщаємо у колбу об'ємом 2 л та додаємо 572 мл води. Далі композицію перемішують, колбу закривають ватно-марлевым корком та стерилізують в автоклаві при 131°C (40 хв тиск - 0,15 МПа).

#### *ДР 4.3. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 160 л*

Необхідно приготувати 78,3 л стерильного поживного середовища. Розрахунок кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 160 л наведений у таблиці 5.5. (Розділ 5).

##### *ДР 4.3.1. Приготування та стерилізація композиції А*

На технічних вагах зважують 157 г соєвого борошна. Наважку поміщають у реактор-змішувач (РЗ-14), до якого добавляють 56,3 л води та обов'язково перемішують. Далі поступово нагрівають вміст реактора до температури 80°C, даний процес забезпечується подачею пари у сорочку апарату, де соєве борошно витримують при такій температурі упродовж 40 хв., безпосередньо проводячи розварювання. Після цього на технічних вагах зважують 4 698 г глюкози та 398 г кукурудзяного екстракту та додають до соєвого борошна. Розчин перемішують та стерилізують в автоклаві при температурі 112 °С упродовж 30 хв.

##### *ДР 4.3.2. Приготування та стерилізація композиції Б*

На технічних вагах зважують 39 г  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 118 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 78 г  $\text{KCl}$  та  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . Наважку поміщають у реактор-змішувач (РЗ-15) та додають 3,4 л питної води, перемішують. Для запобігання випадіння солей в осад, до композиції додаємо 6% розчин соляної кислоти. Потім закривають і стерилізують при температурі 131 °С упродовж 30 хв.

#### *ДР 4.3.3. Приготування та стерилізація композиції В*

На технічних терезах зважують 489 г  $\text{CaCO}_3$ . Поміщають у реактор-змішувач (РЗ-17), додають 5,2 л питної води. Далі композицію перемішують, закривають та стерилізують при  $131^\circ\text{C}$  протягом 40 хв, тиск - 0,15 МПа.

*ДР 4.4. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом  $1,25 \text{ м}^3$*

Для ефективного вирощування інокуляту було розраховано, що необхідно приготувати 710 літрів поживного середовища. У таблиці 5.6. (Розділ 5) наведено вміст компонентів, необхідних для приготування такого обсягу середовища.

#### *ДР 4.4.1. Приготування та стерилізація композиції А*

На технічних вагах зважують 1,4 кг соєвого борошна. Далі наважку поміщають у реактор-змішувач (РЗ-21), добавляють 511 л води та перемішують. Після чого починають проводити заварювання даного компоненту, для цього поступово нагрівають вміст реактора до температури  $80^\circ\text{C}$  подачею пари у сорочку апарату і витримуючи при такій температурі упродовж 40 хв. Далі на технічних вагах зважують 42,6 кг глюкози та 3,5 кг кукурудзяного екстракту та поміщають наважки до соєвого борошна. Розчин перемішують та стерилізують в автоклаві при температурі  $112^\circ\text{C}$  упродовж 30 хв.

#### *ДР 4.4.2. Приготування та стерилізація композиції Б*

На технічних вагах зважують 355 г  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1,1 кг  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 710 г  $\text{KCl}$  та  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . Наважку поміщають у реактор-змішувач (РЗ-25) та додають 31 л питної води, перемішують. Для запобігання випадіння солей в осад, до композиції додаємо 6% розчин соляної кислоти. Потім закривають і стерилізують при температурі  $131^\circ\text{C}$  упродовж 30 хв.

#### *ДР 4.4.3. Приготування та стерилізація композиції В*

На технічних терезах зважують 4,4 кг  $\text{CaCO}_3$ . Поміщають у реактор-змішувач (РЗ-27), додають 48 л води. Композицію перемішують, закривають та стерилізують при  $131^\circ\text{C}$  протягом 40 хв.

*ДР 4.5. Приготування та стерилізація поживного середовища для ферментера 12,5 м<sup>3</sup>.*

*ДР.4.5.1. Приготування та стерилізація композиції А*

Через об'ємно – ваговий дозатор (Д-36) зважують 13 кг соєвого борошна. Наважку поміщають у реактор – змішувач (РЗ-33). Наливають 5 380 л води та перемішують. Соєве борошно попередньо заварюють за допомогою подачі пари в сорочку збірника при постійному перемішуванні, щоб не допустити утворення великих грудок при температурі 80 °С упродовж 40 хв. Через об'ємно – ваговий дозатор (Д-36) зважують 389 кг глюкози, 32 кг кукурудзяного екстракту, 3 кг MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 10 кг КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub>, 7 кг КСІ та Na<sub>2</sub>НРО<sub>4</sub>. Стерилізувати готову композицію будемо в УБС-5 (УБС-38), температура стерилізації – 130°С, тривалість витримування – 40 хв, тиск 0.3 – 0.6МПа.

*ДР.4.5.2. Приготування та стерилізація композиції Б*

Через об'ємно – ваговий дозатор (Д-34) зважують 41 кг СаСО<sub>3</sub>, та поміщають у реактор змішувач, додають 435 л води. Композицію перемішують, закривають та стерилізують при 131°С протягом 40 хв.

## **ТП 5. Підготовка посівного матеріалу**

*ТП 5.1. Підтримання колекційної культури*

Колекційну культуру *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 10586 зберігають у пробірках з поживним агаром. Пересіви здійснюють 1-2 рази на місяць. Всі роботи з колекційною культурою проводяться строго в асептичних умовах.

*ТП 5.2. Одержання робочої культури*

Колекційну культуру, що зберігається в пробірках з поживним агаром, розсівають петлею до ізольованих колоній на чашки Петрі із поживним агаром і вирощують при температурі 30 °С упродовж 24 год.

*ТП 5.3. Вирощування культури на агаризованих поживних середовищах*

Отримані ізолювані колонії (від *ТП 3.2*) пересівають петлею в пробірки із поживним агаром (одна ізолювана колонія використовується для засіву однієї пробірки). В пробірки пересівають ізолювані колонії, що знаходяться на відстані не менше 1 см. Тривалість вирощування – 24 год.

#### *ТП 5.4. Вирощування інокуляту в колбах на качалках*

Для вирощування рідкого посівного матеріалу у колбу об'ємом 2 л в асептичних умовах вносять 830 мл розчину композиції А (від *ДР 4.1.1*), 19 мл розчину композиції Б (від *ДР 4.1.2*), 31 мл композиції В (від *ДР 4.1.3*) 77 мл композиції Г (від *ДР 4.1.4*). Перемішують і розливають по 135 мл в 7 стерильні колби об'ємом 750 мл.

У пробірку з робочою культурою *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 10586 (від *ТП 5.3.*), вносять 5 мл фізіологічного розчину. Потім використовуючи піпетку, відбирають отриману бактеріальну суспензію і додають її до кожної з колб з поживним середовищем. Для засіву однієї колби використовують бактеріальну суспензію, отриману з однієї пробірки. Культивують ці колби на качалці протягом 24 годин при температурі 30°C при перемішуванні 200 об/хв.

#### *ТП 5.5. Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 30 л*

У простерилізований інокулятор, який має об'єм 30 л, додаються наступні об'єми розчинів композицій: 7,5 л розчину композиції А (від *ДР 4.2.1*), 450 мл розчину композиції Б (від *ДР 4.2.2*), 690 мл розчину композиції В (від *ДР 4.2.3*). Вмикають перемішуючий пристрій та барботер і доводять 6%-м розчином NaOH (від *ДР 2.2.*) рН середовища до 7,0. Потім додають 957 мл посівного матеріалу від *ТП 5.4*. Культивують при  $t = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$  з частотою обертів 200 об/хв і постійною аерацією впродовж 24 год.

#### *ТП 5.6. Вирощування інокуляту в інокуляторі 160 л*

В простерилізований інокулятор об'ємом 160 л додають 68 л розчину композиції А (*ДР 4.3.1*), 4 л розчину композиції Б (*ДР 4.3.2*), 6 л розчину композиції В (*ДР 4.3.3*). Потім вмикають перемішуючий пристрій та барботер і налаштовують рН середовища на значення 7,0 і доводять до нього

застосовуюючи 6%-й розчин NaOH. Потім додають 8,61 л посівного матеріалу, з попередньої стадії вирощування від *ТП 5.4*. Культивування відбувається при температурі 30 °С зі швидкістю обертання 200 об/хв протягом 24 годин з постійною аерацією.

#### *ТП 5.7. Вирощування інокуляту в інокуляторі 1,25 м<sup>3</sup>.*

У стерильний інокулятор, об'ємом 1,25 м<sup>3</sup>, вносять 616 л розчину композиції А (*ДР 4.4.1*), 37 л розчину композиції Б (*ДР 4.4.2*), 58 л розчину композиції В (*ДР 2.4.3*). Після додають 6%- розчин NaOH для доведення рН середовища до 7,0. Потім додають 34,4 л посівного матеріалу, від *ТП 5.4*. Далі вмикають перемішувач та барботер, що далі культивують при таких умовах: швидкість перемішування 200 об/хв, при температурі 30 °С впродовж 24 годин.

### **ТП 6. Виробничий біосинтез**

#### *ТП 6.1. Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 12,5 м<sup>3</sup>*

Простерилізований ферментер об'ємом 12,5 м<sup>3</sup> заповнюють поживним середовищем від *ДР 4.5*, що включає в себе 5 956 л розчину композиції А (*ДР 4.5.1*), 524 л розчину композиції Б (*ДР 4.5.2*). Вмикають перемішувач та барботер для підтримки постійної аерації, і доводять 6 %-м розчином NaOH від *ДР 2.2.*, рН середовища до 7,0. Через трубу перетискування перекачують з інокулятора інокулят від *ТП 5.6*. Культивування триває 48 год при температурі 28 °С з постійною аерацією, швидкість обертання 500 об/хв. Виробниче культивування припиняється при досягненні концентрації мупіроцину – 0,011 г/л [81].

## РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

### Визначення концентрації мупіроцину

Для визначення концентрації мупіроцину оптимальним вибором є використання високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) [82].

**Принцип методу.** Метод ВЕРХ розділяє зразок на його складові шляхом розподілу між рухомою фазою і нерухомою фазою. Залежно від хімічної структури аналіту, його молекули затримуються в нерухомій фазі на різний час. Це стає можливим завдяки специфічним взаємодіям між молекулами зразка та матеріалом упаковки колонки. Внаслідок цього, різні компоненти зразка виходять з колонки в різний час, що дозволяє їх розділити.

Після виходу з колонки УФ-детектор реєструє аналіти. Сигнали від детектора перетворюються на числові дані та записуються системою керування даними. Після обробки, ці дані відображаються на хроматограмі, що дозволяє аналізувати інгредієнти проби та їх кількісне визначення [83].

**Підготовка культуральної рідини.** Культури мупіроцину інкубують протягом 40 годин при 25 °С та швидкості обертання 200 об/хв. Далі вони були розведені у співвідношенні 20 разів в 25 мл середовища та інкубовані протягом 40 годин при 22 °С та швидкості обертання 200 об/хв. Проби об'ємом 1 мл були центрифуговані при 15,000 об/хв протягом 10 хвилин. Супернатант було збережено при температурі – 20 °С. Зразки були фільтровані за допомогою фільтра з пором 0.2 мкм [84].

**Підготовка зразків мупіроцину.** 100 мл культуральної рідини фільтрують на фільтрі 0,22 мкм. До фільтра додають 0,5 %-ву трихлороцтову кислоту для осадження баластних білків. Суміш фільтрують на фільтрі з діаметром пор 0.45 мкм. 1 мл цього розчину розбавляли 10 мл рухомої фази для отримання кінцевої концентрації 100 мкг/мл мупіроцину [50].

**Умови проведення та апаратура.** Аналіз проводився методом ВЕРХ

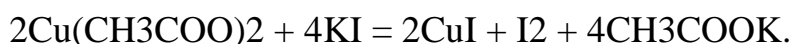
					НУХТ БТЕК 04.02.52 КР ПЗ			
Змн.	Лист.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив	Духота Т.О.				РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевірив	Пенчук Ю.М.						64	88
Консультант								84
Н. Контр.						Кафедра БТМ		
Затверд.	Стабніков В.П.							

за допомогою Gilson 712 або Unipoint LC системного програмного забезпечення. Використовувалася зворотна фаза C18 колонка розміром 15 см х 4.6 мм. УФ-детектування відбувалося при довжині хвилі 233 нм. Рухома фаза складалася з градієнта води/ацетонітрилу (від 5% до 70% ацетонітрилу з 0.01% трифлуоруксусною кислотою). Аналіз проводився протягом 30 хвилин при швидкості потоку 1 мл/хв [84].

### **Визначення концентрації амінного азоту**

Згідно до інформації зі статті [86], джерелом азотного живлення для *Pseudomonas fluorescens* є аміний азот, що міститься у вигляді азот амінокислот, що безпосередньо входять до складу соєвого борошна. Для визначення концентрації використовують мідний метод [87]. Даний метод ґрунтується на взаємодії амінного азоту з реагентом, що містить мідь, утворенням комплексної сполуки. Потім концентрація амінного азоту визначається шляхом вимірювання інтенсивності кольору утвореного комплексу, використовуючи йодометричний метод.

Суть даного методу полягає у тому, що до певної кількості досліджуваного розчину, що містить амінокислоти та пептиди, додають надлишок суспензії фосфорнокислої міді у боратному буфері при слаболужній реакції. Дана дія спричиняє утворення мідних солей більшості амінокислот. Потім надлишок фосфату міді відфільтровують, а до отриманого прозорого розчину додають оцтову кислоту та йодид калію. У результаті відбувається наступна реакція:



Виділений йод титрують слабким розчином гіпосульфїту. Кожен мілілітр 0,01 н.  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  відповідає 0,28 мг амінного азоту [88].

**Визначення концентрації амінного азоту у культуральній рідині [88-90].** Беруть мірну колбу об'ємом 50 мл, та поміщають у неї 10 мл фільтрату культуральної рідини – супернатанту за допомогою піпетки. Далі додають 3-4 краплини тимолфталейну і по краплях розчин гідроксиду натрію

до появи блідо-синього забарвлення. Після, у колбу поміщають 30 мл суспензії фосфату міді, а далі за допомогою дистильованої води доводять вміст колби до мітки. Перемішують і починають фільтрацію, через складчастий фільтр. Важливо зазначити, що фільтрат має бути абсолютно прозорим, так як части осадку можуть дати хибний кінцевий результат.

10 мл фільтрату в конічну колбу, до нього додають 0,5 мл оцтової кислоти та 10 мл йодиду калію. У результаті, виділяється йод. Його титрують 0,01 н. розчином тіосульфату натрію та наприкінці додають 1-4 краплі крохмалю, що має призвести до зникнення синього забарвлення. 1 мл 0,01 н розчину тіосульфату натрію відповідає 0,28 мг амінного азоту.

### **Визначення концентрації глюкози**

Згідно до інформації зі статті [86], джерелом вуглецевого живлення для *Pseudomonas fluorescens* є глюкоза. Для визначення концентрації глюкози в зразках використовують різні методи, одним із них є ензимний метод Glucose GO-PAD від Sigma Aldrich [90].

Метод Glucose GO-PAD від Sigma Aldrich – це ензимний метод визначення концентрації глюкози в різних зразках. Принцип цього методу полягає у використуванні двох ензимів – глюкозоксидаза та пероксидаза. Глюкозоксидаза окислює глюкозу, утворюючи глюконову кислоту і перекис водню. Перекис водню реагує з о-діанізидином у присутності пероксидази з утворенням забарвленого продукту. Потім окислений о-діанізидин реагує з сірчаною кислотою з утворенням більш стабільного кольорового продукту. Коли глюкоза присутня в зразку, глюкозоксидаза окислює її, що в свою чергу активує пероксидазу, яка приводить до зміни кольору хромогенного субстрату. Зміна кольору залежить від концентрації глюкози в зразку. Цей метод є досить швидким та чутливим, і дозволяє визначати концентрацію глюкози в широкому діапазоні, що робить його корисним інструментом для досліджень в різних галузях науки [88].

**Визначення концентрації глюкози у культуральній рідині [90].** Для цього взяли 10 мкл фільтрату культуральної рідини та 1 мл реагенту, а для зразків з високою оптичною щільністю зробили розведення. Зразки були змішані та інкубовані протягом 10 хвилин при температурі  $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Після цього було проведено вимірювання зразків та стандарту (1 г / л) порівняно з пустою пробою реагенту. Концентрацію глюкози було обчислено за допомогою рівняння:

$$\text{Глюкоза} = \frac{\text{зразок}}{\text{стандарт}}$$

Таблиця 8.1.

### Карта постадійного контролю біосинтезу мупіроцину

<i>Номер контрольної точки та назва стадії</i>	<i>Об'єкт контролю та показник, що визначається</i>	<i>Засоби та методи контролю</i>	<i>Періодичність перевірки та відбору проб</i>	<i>Нормативні значення показника</i>
<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
Кт 1.1 Забір атмосферного повітря	Висота забору	Висота труби	При установці труби	H=30 м
Кт 1.2 Очищення від грубих домішок	Ступінь очищення повітря на виході з фільтру грубого очищення, перепад тисків	Перевірка ступеню очищення повітря згідно паспорту фільтра	Під час очищення повітря у фільтрі	E=80%
Кт 1.3 Компресування повітря	Стиснене повітря, тиск, температура	Термометр технічний, манометр	Після компресування повітря	P = 0,35 – 0,5 Мпа t = 220-250 °C
Кт 1.4 Охолодження повітря та видалення вологи	Температура повітря, частка вологи	Термометр технічний	Після охолодження повітря і видалення вологи	t=25-30 °C W=60%
Кт 1.5 Нагрівання повітря	Температура повітря, частка вологи	Термометр технічний	Після нагріву повітря	t = 60°C
Кт 1.6 Очищення повітря в головному фільтрі	Ступінь очищення	Перевірка ступеню очищення повітря згідно паспорту фільтра	Під час очищення повітря у фільтрі	E=95%

Продовження табл. 8.1.

Кт 1.7 Очищення повітря на індивідуальному фільтрі	Ступінь очищення	Перевірка ступеню очищення повітря згідно паспорту фільтра	Під час очищення повітря у фільтрі	E=99,99998 %
Кт,Км ДР.2.2. Приготування та стерилізація 6% розчину NaOH	<b>Розчин гідроксиду натрію</b> Тиск, температура, час, концентрація, відсутність мікробіоти	Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 120°C, τ = 20 хв, p = 0,1 МПа. Відсутність мікробіоти
Кт,Км ДР.3. Стерилізація піногасника Пропінол Б-400	<b>Пропінол Б-400</b> Температура, час, відсутність мікробіоти	термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 120°C, τ = 20 хв, Відсутність мікробіоти
Кт,Км.4.1.1, 4.2.1., 4.3.1, 4.4.1,4.5.1 Приготування та стерилізація композиції А в колбах та інокуляторах	<b>Композиція А</b> Тиск, температура, час, стерильність	Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації.	t = 112°C, τ = 40хв, p = 0,05МПа. Відсутність мікробіоти
Кт, Км. 4.1.2, Приготування та стерилізація композиції Б в колбах	<b>Композиція Б</b> Тиск, температура, час, стерильність	Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації.	t = 131°C, τ = 40хв, p = 0,15МПа. Відсутність мікробіоти
Кт, Км. 4.2.2, 4.3.2, 4.4.2, 4.5.2 Приготування та стерилізація композиції Б в інокуляторах	<b>Композиція Б</b> Тиск, температура, час, стерильність	Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації.	t = 131°C, τ = 40хв, p = 0,15МПа. Відсутність мікробіоти
Кт, Км. 4.1.3, Приготування та стерилізація композиції В в колбах	<b>Композиція В</b> Тиск, температура, час, стерильність	Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації.	t = 131°C, τ = 40хв, p = 0,15МПа. Відсутність мікробіоти

Продовження табл. 8.1.

Кт, Км. 4.2.3, 4.3.3, 4.4.3 Приготування та стерилізація композиції В в інокуляторах	<b>Композиція В</b> Тиск, температура, час, стерильність	Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації.	$t = 131^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 40\text{хв}$ , $p = 0,15\text{МПа}$ . Відсутність мікробіоти
Кт, Км 5.2 Вирощування культури на агаризованому середовищі	<b><i>Pseudomonas fluorescens</i> NCIMB 10586</b> Морфологічна однорідність, відсутність сторонньої мікробіоти, відсутність неконтрольованих мутацій	Термометр, годинник мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль кожні 8 годин	$t = 30^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 24$ год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 5.4. Вирощування інокуляту в колбах на качалках	<b>Посівний матеріал</b> Температура, тривалість вирощування, частота обертів качалки, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, технічний тахометр, мікробіологічний контроль	Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично протягом всього часу вирощування, мікроскопіювання кожні 8 годин	$t = 30^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 24$ год, $\omega = 200$ об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 5.5. Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 6,3 л	<b>Посівний матеріал</b> Температура, тривалість вирощування, частота обертів качалки, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, рН-метр, мікробіологічний контроль	Температура, рН і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування, мікроскопіювання кожні 8 годин	$t = 30^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 24$ год, $\omega = 200$ об/хв, $\text{pH} = 7$ відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 5.6. Вирощування інокуляту в інокуляторі 63 л	<b>Посівний матеріал</b> Температура, тривалість вирощування, частота обертів качалки, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, рН-метр, мікробіологічний контроль	Температура, рН і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування, мікроскопіювання кожні 8 годин	$t = 30^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 24$ год, $\omega = 200$ об/хв, $\text{pH} = 7$ відсутність сторонньої мікробіоти

Закінчення табл. 8.1.

Кт, Км 5.7. Вирощування інокуляту в інокуляторі 630 л	<b>Посівний матеріал</b> Температура, тривалість вирощування, частота обертів качалки, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, рН-метр, мікробіологічний контроль	Температура, рН і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування, мікроскопіювання кожні 8 годин	t = 30 °С, τ = 24 год, ω = 200 об/хв, рН = 7 відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Кх, Км 6.1 Виробниче культивування у ферментері об'ємом 6,3 м <sup>3</sup>	<b>Культуральна рідина</b> Температура, тривалість культивування, частота обертів мішалки, рівень рН, мікробіологічна чистота культури, концентрація мупіроцину	Годинник, термометр технічний, технічний тахометр, датчик рН, мікроскоп	Температура, швидкість обертання мішалки, рівень рН контролюються і підтримуються автоматично весь час культивування; мікроскопіювання кожні 8 годин	t = 28 °С, τ = 48 год, ω = 500 об/хв, рН = 7 відсутність сторонньої мікробіоти

## РОЗДІЛ 9. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ

### 9.1. Перспективи впровадження системи екологізації виробництва

#### Системи знешкодження рідких відходів

##### *Залишки мийно-дезінфікуючих засобів*

Для зменшення витрат мийно-дезінфікуючого розчину, а також підвищення якості миття апаратури доцільно використовувати СІР-мийки. Таким чином об'єм мийного засобу для одного циклу буде становить 20%...30% від кожного з об'ємів обладнання. Згідно з специфікацією обладнання курсового проекту маємо такі ємності об'ємом:

$$V_{\text{ємностей}} = 30 \text{ л} + 160 \text{ л} + 1250 \text{ л} + 12\,500 \text{ л} + 20 \text{ л} + 125 \text{ л} + 125 \text{ л} + 125 \text{ л} + 125 \text{ л} + 10 \text{ л} + 15 \text{ л} + 1000 \text{ л} + 5 \text{ л} + 5 \text{ л} + 50 \text{ л} + 50 \text{ л} + 10\,000 \text{ л} + 1000 \text{ л} = 26\,595 \text{ л}$$

Відповідно до розрахунків приблизний об'єм мийно-дезінфікуючих засобів буде становить:

$$V_{\text{засобів}} = 26\,595 * 0,2 = 5\,319 \text{ л}$$

$$V_{\text{засобів}} = 26\,595 * 0,3 = 7\,979 \text{ л}$$

Прийmemo, що об'єм відпрацьованих залишків засобів дорівнює об'єму цих засобів, а також об'єм води для ополіскування приблизно дорівнює кількості мийно-дезінфікуючих засобів. Таким чином об'єм стічних вод становить: 15 958 л за один цикл.

##### *Орієнтовний об'єм стічних вод на 1 м<sup>3</sup> супернатанту*

На початковому етапі потрібно визначити приблизну кількість супернатанту одержувану за один цикл виробництва. Відповідно до розрахунків за один цикл отримаємо 6 550 л культуральної рідини, з концентрацією біомаси 24 г/л. Відповідно до цього можна визначити, яка кількість біомаси міститься у даному об'ємі культуральної рідини, а саме 157.2 кг біомаси. За рахунок того, що основою культуральної рідини є вода,

					НУХТ БТЕК 04.02.52 КР ПЗ			
Змн.	Лист.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив		<i>Духота Т.О.</i>			РОЗДІЛ 9. Охорона довкілля	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушів</i>
Перевірив		<i>Пенчук Ю.М.</i>					71	88
Консультант						Кафедра БТМ 71		
Н. Контр.								
Затверд.		<i>Стабніков В.П.</i>						

маємо  $6550 - 157,2 = 6393$  кг або 6393 л.

Отже, за один виробничий цикл отримаємо 6393 л супернатанту та 15958 л стічних вод. Тоді на 1 м<sup>3</sup> супернатанту припадає 2496 л стічних вод (2,5 м<sup>3</sup>)

*Визначення середніх витрат стічних вод від промислових підприємств*

Відповідно до розрахунків ТЕО, річна потужність виробництва становить 2 060 г мупіроцину на рік. Враховуючи що антибіотик синтезується у кількості 11 мг/л, кількість культуральної рідини за рік буде становить 244 000 л. Тоді відповідно до попередніх розрахунків, кількість супернатанту на рік буде дорівнювати 241,5 м<sup>3</sup>. Кількість робочих трудоднів 105, згідно з цим можемо отримати 2,3 м<sup>3</sup> супернатанту на добу.

*Середні за зміну витрати виробничих стічних вод*

$$Q_B = q_B \times n$$

Де  $q_B$  - норма водовідведення в м<sup>3</sup> на одиницю продукції, яку випускає підприємство (2,5 м<sup>3</sup>);  $n$  - кількість одиниць продукції, що виробляється за зміну (2,3 м<sup>3</sup>).

$$Q_B = 2,5 \times 2,3 = 5,75 \text{ м}^3 \text{ за добу}$$

*Середні за зміну витрати побутових стічних вод*

$$Q_n = q_n \times N$$

де  $q_n$  - норма відведення побутових стічних вод в м<sup>3</sup> /зм на одного робітника, яку приймають для гарячих цехів 0,045 м<sup>3</sup> /(зм люд), для холодних - 0,025 м<sup>3</sup> /(зм люд);  $N$  - кількість робітників, що працюють в зміну (припустимо, що  $N=7$ ). Для перерахунку даного показника на добу необхідно помножити на кількість змін на добу та на 24 і поділити на тривалість однієї зміни.

$$Q_n = 0,025 \times 7 = 0,18 \text{ м}^3/\text{зм}$$

*Загальні витрати стічних вод, що утворюються на підприємстві*

$$Q = Q_B + Q_n + Q_a$$

Де  $Q_B$  – середні за добу витрати виробничих стічних вод, м<sup>3</sup> /добу;  $Q_n$  – середні за добу витрати побутових стічних вод на підприємстві, м<sup>3</sup> /добу;  $Q_a$

– середні за добу витрати атмосферних стічних вод, м<sup>3</sup>/добу (орієнтовно 0,04 м<sup>3</sup>/добу).

$$Q = 5,75 + 0,18 + 0,04 = 5,97 \text{ м}^3/\text{добу}$$

#### *Система очищення стічних вод*

Так як згідно до вищенаведених розрахунків витрати стічних вод становлять менше 100 м<sup>3</sup>/добу, доцільно для очищення буде використовувати періодичну систему очищення. Для даних цілей можна застосувати модульну станція СПБО-6 [91], що являє собою металеву ємність зі спеціальним захисним покриттям та призначена для повної біологічної очистки стічних вод до 6 м<sup>3</sup>/добу.

#### *Опис технологічного процесу біологічної очистки стічних вод на установці*

1. Вузол регулювання подачі стічної рідини, яка надходить в модульну станцію (1 ступінь)

Вода з розподільної чаші протікає через трубопровід до "СПБО-6" і потрапляє безпосередньо в камеру згасання напору. Тут за допомогою шибера регулюється потік води, яка потрібна для очищення в модулі. Надлишок води повертається у резервуар, в якому відбувається додаткова аерація та перемішування, що запобігає загниванню рідини і підвищує ефективність очищення.

2. Механічне очищення (2 ступінь)

Механічне очищення стічних вод включає в себе процес, під час якого стічні води, що текли самопливом, потрапляють до вузла механічного очищення. У цьому вузлі механічні домішки розміром більше 5 мм залишаються на сітці і затримуються. Щоб очистити сітку від накопичених забруднень, проводиться ручне видалення цих домішок.

3. Аерація стічних вод і перемішування їх з активним мулом (3 ступінь)

Стічні води, коли вони потрапляють до зони аерації, піддаються повному окисленню забруднень за допомогою активного мулу та кисню, що насичується в рідині. Використовуючи електромеханічний аератор типу "ВМ",

забезпечується перемішування цих компонентів, щоб підтримувати високу концентрацію активного мулу, без потреби в системах подачі та розподілу повітря.

#### 4. Освітлення стічних вод (4 і 5 ступені)

Стічні води проходять освітлення в двох камерах. Перша камера має інтегровану зону аерації. Самопливом стічна рідина переходить через обидві секції освітлення, водночас мул з першої камери повертається до зони аерації за допомогою гідродинамічних сил. У другій камері, яка має 5 ступінь очищення, активний мул повертається до зони аерації за допомогою аератора.

#### 5. Попередня доочищення стічних вод (6 ступінь)

Вода, очищена у другій камері освітлення, природним рухом поступає на фільтр для подальшого очищення. Цей фільтр, що має зернисте завантаження, автоматично промивається. Потім очищена вода виходить з модуля.

При відключенні електроенергії модуль «СПБО-6» працює як багатоступінчастий відстійник, забезпечуючи очищення стічних вод від зважених речовин, жирів і плаваючих забруднень приблизно на 50%.

### **Системи знешкодження газоподібних відходів**

Безпосередньо утворення газоподібних відходів відбувається на різних етапах біосинтезу, а саме :

1. Інокулятор 30 л : робочий об'єм 18 л, відповідно до цього кількість аераційного повітря становить 36 л/хв або 2160 л/год. Враховуючи що процес отримання посівного матеріалу становить 24 години, кількість аераційного повітря дорівнює 51 840 л.

2. Інокулятор 160 л : робочий об'єм 96 л, відповідно до цього кількість аераційного повітря становить 192 л/хв або 11 520 л/год. Враховуючи що процес отримання посівного матеріалу становить 24 години, кількість аераційного повітря дорівнює 276 480 л.

3. Інокулятор 1250 л : робочий об'єм 750 л, відповідно до цього кількість аераційного повітря становить 1500 л/хв або 90 000 л/год. Враховуючи що процес отримання посівного матеріалу становить 24 години, кількість аераційного повітря дорівнює 2 160 000 л.

4. Ферментер 12 500 л : робочий об'єм 7 500 л, відповідно до цього кількість аераційного повітря становить 15 000 л/хв або 900 000 л/год. Враховуючи що процес виробничого біосинтезу становить 48 години, кількість аераційного повітря дорівнює 23 000 000 л.

Отже, загальне число відпрацьованого повітря дорівнює:  $51,8 \text{ м}^3 + 276,5 \text{ м}^3 + 2160 \text{ м}^3 + 23000 \text{ м}^3 = 25 488,3 \text{ м}^3$ . Таку кількість повітря можна очищати за допомогу встановлених на ферментері фільтрів для очищення.

### **Система знешкодження та утилізації твердих відходів**

Пластикові та пакувальних матеріалі, що були використані при виробництві мупіроцину, а також туби що мають певні деформації, можуть мати характерні відхилення маси вмісту, вважаються браком. Дані тверді відходи відправляються на вторинну переробку.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ:

1. Tanvir Mahtab Uddin, Arka Jyoti Chakraborty, Ameer Khusro, BM Redwan Matin Zidan, Saikat Mitra, Talha Bin Emran, Kuldeep Dhama, Md. Kamal Hossain Ripon, Márió Gajdács, Muhammad Umar Khayam Sahibzada, Md. Jamal Hossain, Niranjan Koirala. Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects // *Journal of Infection and Public Health*. – 2021. – Bangladesh. – V. 14. – P. 1750-1766. - [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1876034121003403>
2. Mupirocin - Drug Summary. - [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.pdr.net/drug-summary/Bactroban-Ointment-mupirocin-2209>
3. Mupirocin. - [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.acs.org/molecule-of-the-week/archive/m/mupirocin.html>
4. Christopher M. Thomas, Joanne Hothersall, Christine L. Willis and Thomas J. Simpson. Resistance to and synthesis of the antibiotic mupirocin// *Nature Reviews Microbiology*. – 2010. – UK. – V.8(4). – P.281-289. - [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2278>
5. Дисертація на здобуття ступеня доктора філософії з галузі знань 22 «Охорона здоров'я» за спеціальністю 222 «Медицина». – Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова МОЗ України, Вінниця, 2021. - [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://dspace.vnmu.edu.ua/bitstream/handle/123456789/5586/%D0%94%D0%B8%D1%81.%20%D0%A1%D1%96%D0%B4%D1%8C%D0%BA%D0%BE%20%D0%86.%20%D0%AE..pdf?sequence=1&isAllowed=y>
6. Alexandra Tucaliuc, Alexandra Cristina Blaga, Anca Irina Galaction, Dan Cascaval. Mupirocin: applications and production // *Biotechnol Lett*. – 2019. – Romania. – P. 495–502. – [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://doi.org/10.1007/s10529-019-02670-w>
7. Mupirocin. - [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Mupirocin>

8. Mupirocin. - [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://medlineplus.gov/druginfo/meds/a688004.html>
9. Saeed Khoshnooda, Mohsen Heidaryc, Arezoo Asadic, Saleh Soleimanid, Moloudsadat Motahara , Mohammad Savaria , Morteza Sakia,, Mahtab Abdi. A review on mechanism of action, resistance, synergism, and clinical implications of mupirocin against *Staphylococcus aureus* // Biomedicine and Pharmacothera. – 2019. – Iran. – P. 1809-1818. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.10.131>
10. Showing metabocard for Mupirocin (HMDB0014554). - [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0014554>
11. Mupirocin. - [Электронный ресурс] Режим доступа: [https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_CB0689829.htm](https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB0689829.htm)
12. Mupirocin. - [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00410>
13. Sheba Rani Nakka David; Rajan Rajabalaya. Medicated patch for preventing exit site infections during peritoneal dialysis. – 2017. – Gadong. - [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://innovation.ubd.edu.bn/media/kyont1uh/u44-p-us.pdf>
14. Françoise van Bambeke, Marie-Paule Mingeot-Leclercq, Youri Glupczynski, Paul M. Tulkens. Mechanisms of Action // Infectious Diseases. – 2017. – Belgium. – V. 2. – P. 1162 – 1180. - [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-6285-8.00137-4>
15. Бактробан™ крем/мазь (Vactroban cream/ointment). - [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://compendium.com.ua/dec/268688/>
16. Fabrizio Spagnoloa, Monica Trujillo, John J. Dennehy. Why Do Antibiotics Exist?// American Society for Microbiology. – 2021. – USA. - V.12. – [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://doi.org/10.1128/mBio.01966-21>

17. Brittan S. Scalesa,b, Robert P. Dicksona, John J. LiPumac, and Gary B. Huffnagle. Microbiology, Genomics, and Clinical Significance of the *Pseudomonas fluorescens* Species Complex, an Unappreciated Colonizer of Humans//American Society for Microbiology. – USA. – 2014. – V.27. – P. 927-948. - [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://journals.asm.org/doi/epub/10.1128/CMR.00044-14>
18. Loekas Soesanto, Endang Mugiastuti, and Ruth Feti Rahayuniati. MORPHOLOGICAL AND PHYSIOLOGICAL FEATURES OF *Pseudomonas fluorescens* P60//Research gate. – Purwokerto. – 2011. - [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://cutt.ly/A1dLkZg>
19. *Pseudomonas fluorescens*: Motility, Group & Characteristics. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://study.com/academy/lesson/pseudomonas-fluorescens-characteristics-motility-habitat.html>
20. Rodríguez-Romero VM, Villanueva-Arce R, Trejo-Raya AB and Bautista-Baños S. Chitosan and *Pseudomonas fluorescens* extracts for *Alternaria alternata* control in tomato (*Solanum lycopersicum*)// Mexican Journal of Phytopathology. – México. – 2019. – V. 37(2). – P. 202-219. - [Электронный ресурс]. Режим доступа: [https://www.researchgate.net/figure/Figura-1-Characterísticas-culturales-de-P-fluorescens-Colonias-en-medio-YDC-A\\_fig1\\_331378188](https://www.researchgate.net/figure/Figura-1-Characterísticas-culturales-de-P-fluorescens-Colonias-en-medio-YDC-A_fig1_331378188)
21. *Pseudomonas fluorescens*. - [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://microbe-canvas.com/Bacteria.php?p=684>
22. Thalhun L. Kipgen and L.C. Bora. Biochemical Differentiation of *Pseudomonas fluorescens* of Assam Soil and their Utility in Management of Bacterial Wilt of Solanaceous Crops//International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. – India. – 2017. – V. 6(6). – P. 2796-2806. - [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.606.333>
23. Pedro Manuel Martínez-García, David Ruano-Rosa, Elisabetta Schilirò, Pilar Prieto, Cayo Ramos, Pablo Rodríguez-Palenzuela and Jesús Mercado-Blanco. Complete genome sequence of *Pseudomonas fluorescens* strain PICF7, an indigenous root endophyte from olive (*Olea europaea* L.) and effective biocontrol

- agent against *Verticillium dahlia*//Standards in Genomic Sciences. – Spain. – 2015. – V. 10. – P. 7. - [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4322347/pdf/1944-3277-10-10.pdf>
24. Aditi Bhattacharya. Siderophore mediated metal uptake by *Pseudomonas fluorescens* and its comparison to iron (iii) chelation // Ceylon Journal of Science. – India. – 2010. – V. 39(2). – P. 147-155. - [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://pdfs.semanticscholar.org/1ccd/38e498cf3f0846fa673a5061293469dce0a0.pdf?\\_ga=2.199572846.1152098353.1669909308-273215932.1667550474](https://pdfs.semanticscholar.org/1ccd/38e498cf3f0846fa673a5061293469dce0a0.pdf?_ga=2.199572846.1152098353.1669909308-273215932.1667550474)
25. Muhammad Khalid Khan, Barkat Ali Khan, Bushra Uzair, Shah Iram Niaz, Haroon Khan, Khaled Mohamed Hosny, Farid Mena. Development of Chitosan-Based Nanoemulsion Gel Containing Microbial Secondary Metabolite with Effective Antifungal Activity: In vitro and in vivo Characterizations//International Journal of Nanomedicine. – USA. – 2021. – V.16. – P. 8203–8219. - [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://www.researchgate.net/publication/357086268\\_Development\\_of\\_Chitosan-Based\\_Nanoemulsion\\_Gel\\_Containing\\_Microbial\\_Secondary\\_Metabolite\\_with\\_Effective\\_Antifungal\\_Activity\\_In\\_vitro\\_and\\_in\\_vivo\\_Characterizations/download](https://www.researchgate.net/publication/357086268_Development_of_Chitosan-Based_Nanoemulsion_Gel_Containing_Microbial_Secondary_Metabolite_with_Effective_Antifungal_Activity_In_vitro_and_in_vivo_Characterizations/download)
26. Ірина Берлім, Володимир Макаренко. Вивчення комплексної дії фото- та мікрострумової терапії на шкіру вражену псоріазом // Збірник наукових праць викладачів, аспірантів, магістрантів і студентів факультету комп'ютерних наук, математики, фізики та економіки – 2023. – Україна. – С. 70. - [Електронний ресурс] Режим доступу: <http://dspace.pnpu.edu.ua/bitstream/123456789/21619/1/%D0%97%D0%B1%D1%96%D1%80%D0%BD%D0%B8%D0%BA%20%D0%A4%D0%9C%D0%A4%202023.pdf#page=70>

- 27.Л. О. Пучкан, О. О. Салій, Л. А. Фуклева, М. М. Малецький. Розроблення та дослідження мазі з ефірною олією чебрецю для лікування шкіри голови та її волосяної частини // Фармацевтичний журнал. – 2023. - Т. 78. - № 2. - [Електронний ресурс] Режим доступу: <http://dspace.zsmu.edu.ua/bitstream/123456789/19340/1/%d1%8131-40.pdf>
- 28.Оприлюднено результати оцінки чисельності наявного населення України. - [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.kmu.gov.ua/news/oprilyudneno-rezultati-ocinki-chiselnosti-nayavnogo-naselennya-ukrayini>
- 29.Кількість українців та їх міграція за кордон через війну. - [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.ukrinform.ua/rubric-ato/3732355-kilkist-ukrainsiv-ta-ih-migracia-za-kordon-cerez-vijnu.html>
- 30.Бактробан. - [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://mozdocs.kiev.ua/likiwiew.php?id=48672>
- 31.Бактробан™ - аналоги за діючою речовиною. - [Електронний ресурс] Режим доступу: [https://likicontrol.com.ua/%D0%B0%D0%BD%D0%B0%D0%BB%D0%BE%D0%B3%D0%B8/?\[13200\]](https://likicontrol.com.ua/%D0%B0%D0%BD%D0%B0%D0%BB%D0%BE%D0%B3%D0%B8/?[13200])
- 32.Metabolic pathways - Pseudomonas fluorescens SBW25. – [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.genome.jp/pathway/pfs01100>
- 33.Peng Huang, Sheng-Jie Yue, Yu-Yuan Cai, Song Li, Hong-Bo Hu, Wei Wang & Xue-Hong Zhang. - rpeA, a global regulator involved in mupirocin biosynthesis in Pseudomonas fluorescens NCIMB 10586 // Appl Microbiol Biotechnol. – 2021. – V. 105. – P. 9309–9319. - [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-021-11683-3>
- 34.France Landry, Chi-Chung Chan, Zheng Huang, Gregoire Leclair, Chun Sing Li, Renata Oballa, Lei Zhang, and Kevin Bateman. Plasma-based approach to measure target engagement for liver-targeting stearoyl-CoA desaturase 1 inhibitors // Journal of Lipid Research. – 2011. – Canada. – V. 52. – P. 1494-

1499. – [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.jlr.org/action/showPdf?pii=S0022-2275%2820%2936924-8>
35. Hyun-Ju Lee, Young-Seo Kang, Chae-Yun Kim, Eun-Ji Seo, Sang-Hyun Pyo and Jin-Byung Park. Multi-Step Enzymatic Synthesis of 1,9-Nonanedioic Acid from a Renewable Fatty Acid and Its Application for the Enzymatic Production of Biopolyesters // *Microbial Production and Application of Biopolymers*. – 2019. – Korea. – V. 11(10). – P. 1690. - [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.mdpi.com/2073-4360/11/10/1690>
36. Timothy C. Feline, Robert B. Jones, Graham Mellows and Lawrence Phillips. Pseudomonic acid. Part 2. Biosynthesis of pseudomonic acid A // *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*. – 1999. – P. 3537 – 3733. - [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://scihub.se/https://doi.org/10.1039/P19770000309>
37. Ethan E. Mann and Daniel J. Wozniak. Pseudomonas biofilm matrix composition and niche biology // *FEMS Microbiology Reviews*. – 2012. – USA. – V.36(4). – P. 893–916. - [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4409827/pdf/nihms-536393.pdf>
38. Пирог, Т.П. Загальна мікробіологія: підручник, 2-е вид., доп. і перероб. / Т.П. Пирог. – К. :НУХТ, 2010. – 632 с.
39. Brittan S. Scalesa,b, Robert P. Dicksona, John J. LiPumac, and Gary B. Huffnagle. Microbiology, Genomics, and Clinical Significance of the Pseudomonas fluorescens Species Complex, an Unappreciated Colonizer of Humans//*American Society for Microbiology*. – USA. – 2014. – V.27. – P. 927-948. - [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://journals.asm.org/doi/epub/10.1128/CMR.00044-14>
40. Loekas Soesanto, Endang Mugiastuti, and Ruth Feti Rahayuniati. Morphological and physiological features of Pseudomonas fluorescens P60//*Research gate*. – Purwokerto. – 2011. - [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://cutt.ly/A1dLkZg>

41. В.О. Сербов, В.В. Мотроненко. Аналіз впливу механічних чинників при глибинному культивуванні мікроорганізмів // Innov Biosyst Bioeng. – 2019. – Україна. – V.3. - № 1. – P. 45-51. - [Електронний ресурс]. Режим доступу: [http://ibb.kpi.ua/article/view/146895/pdf\\_45](http://ibb.kpi.ua/article/view/146895/pdf_45)
42. Erin R. Sanders. Aseptic Laboratory Techniques: Plating Methods// Journal of Visualized Experiments. – 2012. – USA. – V. 63. – P. 18. - [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4846335/pdf/jove-63-3064.pdf>
43. James J. Gallagher, Natalie Williams-Bouyer, Cynthia Villarreal, John P. Heggors, and David N. Herndon. Treatment of infection in burns// Total Burn Care. – 2007. – USA. – P. 136-176. - [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-3274-8.50015-5>
44. Piter G. Mantle, Matthijs de Langen and Vei Kim Teo. Differentiating the Biosynthesis of Pseudomonic Acids A and B//The Journal Of Antibiotics. – 2001. UK. – V.54. - №2. – P. 166 – 174. - [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://www.jstage.jst.go.jp/article/antibiotics1968/54/2/54\\_2\\_166/\\_pdf/-char/en](https://www.jstage.jst.go.jp/article/antibiotics1968/54/2/54_2_166/_pdf/-char/en)
45. S. Siddiquee. The Basic Concept of Microbiology//Practical Handbook of the Biology and Molecular Diversity of Trichoderma Species from Tropical Regions. – 2017. – Malaysia. – P. 15. - [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7123386/pdf/978-3-319-64946-7\\_Chapter\\_1.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7123386/pdf/978-3-319-64946-7_Chapter_1.pdf)
46. Yong Zhou, Li-Rong Han, Hong-Wei He, Bu Sang, Dai-Lin Yu, Jun-Tao Feng and Xing Zhang. Effects of Agitation, Aeration and Temperature on Production of a Novel Glycoprotein GP-1 by Streptomyces kanasensis ZX01 and Scale-Up Based on Volumetric Oxygen Transfer Coefficient// Molecules. – 2018. – China. – V.23. – P. 14. - [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6017179/pdf/molecules-23-00125.pdf>

47. Optimizing Growth Conditions for Sensitive Cell Cultures. – 2021. - [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.labcompare.com/10-Featured-Articles/572995-Optimizing-Growth-Conditions-for-Sensitive-Cell-Cultures/>
48. Nicholas P. Money. The industrial significance of fungi// Fungi and Biotechnology. – 2016. – USA. – P. 401-429. - [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382034-1.00012-8>
49. Карлаш Ю.В., Красінько В.О. Основи проєктування біотехнологічних виробництв Електронний ресурс : Навч. посібник. –К.:НУХТ, 2022. –373 с.
50. Solaris Industrial. - [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.solarisbiotech.com/en/fermenters-bioreactors-pilot-industrial-customizable>
51. Вентиляційні повітряні фільтри HEPA. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://teko-ua.com/ua/filtryi-nera.html>
52. Конспект лекцій з дисципліни «Асептика біотехнологічних виробництв» освітньо-професійної програми другого (магістерського) рівня вищої освіти зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» усіх форм навчання / Укл.: Головей О.П. , Гуляєв В.М. – Кам'янське, ДДТУ, 2017 р., 140 с. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.dstu.dp.ua/Portal/Data/5/8/5-8-kl1.pdf>
53. Дезактін. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.systopt.com.ua/item-dezaktyn>
54. Біомой методичні вказівки (інструкція по застосуванню). [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://dezmed.com.ua/instruktsiia/item/biomoj-metodicheskie-rekomendatsii-instruktsiya-po-primeneniyu/>
55. Гембар. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.datonal.org/?m0prm=3&m1prm=4&showItem=25>
56. Біомой 1 кг - миючий, дезінфікуючий засіб. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://lavernamarket.com.ua/ua/p3538341-biomoj-moyuschee-dezinfitsiruyuschee.html>

57. Дезактин порошок банка 1 кг. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://anc.ua/item/dezaktin-poroshok-banka-1-kg-6223>
58. Дезінфікувальний засіб Гембар 25,0 (5 л) . [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://spilna-meta.com.ua/ua/p257133961-dezinfitsiruyuschee-sredstvo-gembar.html>
59. Повітрозбірники горизонтальні та вертикальні типу АІІ серії 5.903-20 і 5.903-2. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://ptpk.prom.ua/ua/p3866044-vozduhosborniki-gorizontalnye-vertikalnye.html>
60. ФЯУ-Повітряний фільтр грубої очистки ФЯУБ-Модернізований повітряний фільтр. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://ukrvent.com/fyay-html/>
61. Компресор 200 л, 7,5 кВт, 380 В, 10 атм, 1050 л/хв., 3 циліндри INTERTOOL PT-0040. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://intertool.ua/catalog/kompressori/kompressori-porshnevie/intertool-pt-0040.html>
62. Канальний охолоджувач Вентс ОКВ 400x200-3. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://vent-market.com.ua/ua/product/vents-okv-400x200-3/>
63. Ресивер Повітряний Лідер 10 бар 900 к. с. РВ900.818.01 для компресора. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://tusk.ua/ua/product/resiver-vozdushnyij-lider-10-bar-900-1-rv90081801-dlya-kompressora/>
64. Теплообмінник (нагрівач повітря водяний). [Електронний ресурс] – режим доступу: [https://www.galactic.kiev.ua/pages/painting\\_cameras\\_equipment/air\\_heating\\_system.php](https://www.galactic.kiev.ua/pages/painting_cameras_equipment/air_heating_system.php)
65. Панельні повітряні фільтри для тонкого очищення повітря. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://shop.alterair.ua/product/panelnyye-vozdushnyye-filtry-dlya-tonkoy-ochistki-vozdukha-%28f7-f9%29/>
66. НЕРА фільтр 595\*595\*78 Н14. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://tehno-parts.com.ua/ua/hepa-filtr-59559578-h14>

- 67.Хімічний реактор об'ємом 125 л з мішалкою, сорочкою, механізмом нахилу, гомогенізатором, механізмом підйому кришки. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://stprom.com.ua/ua/p1720154888-himicheskij-reaktor-125.html>
- 68.Реактор ЄМК Р-20 с мішалкою та сорочкою нагріву, 20 л. [Електронний ресурс] – режим доступу: [https://agrovektor.com.ua/physical\\_product/1325828-reaktor-emk-r-20-s-meshalkoy-i-rubashkoy-podogreva-20-l.html](https://agrovektor.com.ua/physical_product/1325828-reaktor-emk-r-20-s-meshalkoy-i-rubashkoy-podogreva-20-l.html)
- 69.Моноблочний відцентровий насос Pentax CM 32-160 С. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://nep.ua/monoblochnyye/monoblochnyy-tsentrobezchnyy-nasos-pentax-cm-32-160>  
c?gad\_source=1&gclid=Cj0KCQiAsburBhCIARIsAEхmsu7s7ZACGeAk9nsL5CpoGMq7L3WUSGGsMKT8SxialqNqEriG-wRHZHMаAv8nEALw\_wcB
- 70.BiostatCplus. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://sartorius.com.ua/fermenteri-i-bioreaktori/sterilizuyemi-na-misczi-fermenteri-bioreaktori-cip/biostat-cplus/>
- 71.Хімічний реактор 125 л. з мішалкою, сорочкою, механізмом нахилу, гомогенізатором, механізмом підйому кришки. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://stprom.com.ua/ua/p1720154888-himicheskij-reaktor-125.html>
- 72.Реактор miniPilot. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://dlu.com.ua/%D0%A0%D0%B5%D0%B0%D0%BA%D1%82%D0%BE%D1%80-miniPilot-1>
- 73.Ферментери (біореактор) Techfors, Infors. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://unilab.kiev.ua/catalog/fermentery-i-bioreaktory/FermenteryTechforsInfors/>
- 74.Реактор хімічний з нержавіючої сталі з мішалкою та сорочкою 1000 літрів. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://stprom.com.ua/ua/p1723667546-reaktor-himicheskij-nerzhaveyuschej.html>

75. Solaris S - I SERIES. [Електронний ресурс] – режим доступу:  
<https://www.solarisbiotech.com/en/fermenters-bioreactors-pilot-industrial-customizable>
76. Реактор Р-50, 50 л. [Електронний ресурс] – режим доступу:  
[https://agrovektor.com/ua/physical\\_product/1325735-reaktor-r-50-50-1.html](https://agrovektor.com/ua/physical_product/1325735-reaktor-r-50-50-1.html)
77. Реактори для змішування. [Електронний ресурс] – режим доступу:  
<https://emkosty.com.ua/>
78. Ваговий дозатор сипучих матеріалів продуктивністю 150 т/год. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://vis.ua/product/vesovoj-doзатор-sypuchih-materialov-proizvoditelnostyu-150-t-ch/>
79. Перистальтичний насос МР-8086.16, 364 l/h, 0,09 kW. [Електронний ресурс] – режим доступу: [https://prom-nasos.com.ua/ua/catalog/pumps-by-type/peristaltic\\_pumps/peristaltichniy-nasos-mp-808616-364-l-h-0-09-kw/](https://prom-nasos.com.ua/ua/catalog/pumps-by-type/peristaltic_pumps/peristaltichniy-nasos-mp-808616-364-l-h-0-09-kw/)
80. Solaris Industrial S-I SERIES. [Електронний ресурс] – режим доступу:  
<https://www.solarisbiotech.com/en/fermenters-bioreactors-pilot-industrial-customizable>
81. Peter G. Mantle, Matthijs de Langen and Vei Kim Teo. Differentiating the Biosynthesis of Pseudomonic Acids A and B // The Journal Of Antibiotic. – 2000. – UK. – V. 54. – No 2. – P. 166 – 174. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://doi.org/10.7164/antibiotics.54.166>
82. Sian M Cooper, Wanpen Laosripaiboon, Ayesha S Rahman, Joanne Hothersall, A Kassem El-Sayed, Christopher Winfield, John Crosby, Russell J Cox, Thomas J Simpson, Christopher M Thomas. Shift to Pseudomonic acid B production in *P. fluorescens* NCIMB10586 by mutation of mupirocin tailoring genes mupO, mupU, mupV, and macpE // Chemistry & Biology. – 2005. – UK. – V.12. – P. 825-833. - [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2005.05.015>
83. Juliane Böttcher, Mareike Margraf, Kate Monks. HPLC basics – Principles and parameters // KNAUER. – Germany. - [Електронний ресурс] Режим доступу:

[https://www.knauer.net/Application/application\\_notes/VSP0019\\_HPLC%20Basics%20-%20principles%20and%20parameters\\_final%20-web-.pdf](https://www.knauer.net/Application/application_notes/VSP0019_HPLC%20Basics%20-%20principles%20and%20parameters_final%20-web-.pdf)

84. Joanne Hothersall , Ji'en Wu, Ayesha S. Rahman , Jennifer A. Shields, James Haddock, Nicola Johnson, Sian M. Cooper, Elton R. Stephens, Russell J. Cox, John Crosby, Christine L. Willis, Thomas J. Simpson, Christopher M. Thomas. Region Genes Are Required for Production of Polyketide Antibiotic Mupirocin by *Pseudomonas fluorescens*: PSEUDOMONIC ACID B BIOSYNTHESIS PRECEDES PSEUDOMONIC ACID A // The journal of biological chemistry. – 2007. – UK. – V.282. – No 21. – P. 15451–15461. - [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://doi.org/10.1074/jbc.M701490200>
85. Rupali KALE, Pratiksha SHETE, Dattatray DOIFODE, Sohan Chitlange. Analytical Method Development and Validation for Simultaneous Determination of Simvastatin and Mupirocin Using Reverse-Phase High-pressure Liquid Chromatographic Method // Turkish Journal Of Pharmaceutical Sciences. – 2021. – India. – V. 18(4). – P. 438 – 444. - [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8430408/pdf/TJPS-18-438.pdf>
86. Alexandra Tucaliuc, Alexandra Cristina Blaga, Anca Irina Galaction, Dan Cascaval. Mupirocin: applications and production // Biotechnol Lett. – 2019. – Romania. – P. 495–502. – [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://doi.org/10.1007/s10529-019-02670-w>
87. Технології мікробного синтезу лікарських засобів: Лабор. практикум для студ. напряму 6.051401 "Біотехнологія" ден. та заоч. форм навчання /Уклад.: Л.М. Буценко, В.О.Красінько. – К.: НУХТ, 2011. – 82 с. [Електронний ресурс] Режим доступу: [https://www.studmed.ru/bucenko-lm-krasnko-vo-tehnologyi-mkrobnogo-sintezu-lkarskih-zasobv-labor-praktikum\\_8f42e8e4165.html](https://www.studmed.ru/bucenko-lm-krasnko-vo-tehnologyi-mkrobnogo-sintezu-lkarskih-zasobv-labor-praktikum_8f42e8e4165.html)
88. Technical bulletin. - [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/document/s/516/298/gago20bul.pdf>

89. Дослідження вмісту амінного азоту. - [Електронний ресурс] Режим доступу: [http://ni.biz.ua/5/5\\_14/5\\_149121\\_issledovanie-soderzhaniya-aminного-azota.html](http://ni.biz.ua/5/5_14/5_149121_issledovanie-soderzhaniya-aminного-azota.html)
90. Francia Elena Valencia-García, Karina Edith Motato-Rocha, Madalyd Yurani Vera-Peña a & Martha Liliana Sepúlveda-Lindarte. Kinetic parameters of lactic acid bacterial isolated from fermented milk “Suero Costeño”// DYNA. – 2018. – Colombia. – V.85(206). – P. 155-161. - [Електронний ресурс] Режим доступу: <http://www.scielo.org.co/pdf/dyna/v85n206/0012-7353-dyna-85-206-00155.pdf>
91. Установка повної біологічної очистки стічних вод СПБО-6, до 6 м<sup>3</sup>/добу. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://promtehvod.kiev.ua/ua/p357660988-ustanovka-polnoj-biologicheskoy.html>
92. Радченко М.М., Тігунова О.О., Андріяш Г.С., Шульга С.М., Блюм Я.Б. Особливості культивування штаму-продуцента рибофлавіну *Bacillus subtilis* IFBG МК-1А у біореакторі з підживленням. Допов. Нац. акад. наук Укр. - 2022. - № 6. - С. 79—84. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://doi.org/10.15407/dopovidi2022.06.079>