

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

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

«До захисту в ЕК»

Директор інституту(декан факультету)

Наталія ГРЕГІРЧАК

(підпис)

(ім'я та прізвище)

«  » лютого 2023 р.

«До захисту допущено»

Завідувач кафедри

Віктор СТАБНІКОВ

(підпис)

(ім'я та прізвище)

«  » лютого 2023 р.

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА  
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА**

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код та назва спеціальності)

освітньо-професійної програми «Біотехнології: фармацевтична,

промислова, харчова, природоохоронна»

на тему: Одержання гентаміцину культивуванням *Micromonospora*  
*purpurea*

Виконав: здобувач 5 курсу, групи 1

КОЗУБ Валерія Костянтинівна

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Керівник УДИМОВИЧ Віктор Миколайович

(прізвище, ім'я та по батькові повністю)

(підпис)

Консультанти

(ім'я та прізвище)

(підпис)

(ім'я та прізвище)

(підпис)

(ім'я та прізвище)

(підпис)

Рецензент

(ім'я та прізвище)

(підпис)

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

Здобувач

(підпис)

Київ – 2023 р.

# НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

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

(назва)

## ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

Віктор СТАБНІКОВ

“ 01 ” листопада 20 22 року

## З А В Д А Н Н Я

### НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

КОЗУБ Валерії Костянтинівні

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Одержання гентаміцину культивуванням *Micromonospora purpurea*

керівник роботи Удимович Віктор Миколайович, ас.

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від 31 жовтня 2022 року № 781-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 31 січня 2023 р.

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Micromonospora purpurea*, ферментер об'ємом 20 м<sup>3</sup> з коефіцієнтом заповнення 0,65

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

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема виробництва – 1 аркуш формату А1. Апаратурна схема виробництва – 1 аркуш формату А2.

## 6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 01 листопада 2022 року

## КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Характеристика цільового продукту	01.11.2022 – 10.11.2022	
2	Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	11.11.2022 – 15.11.2022	
3	Техніко-економічне обґрунтування	16.11.2022 – 27.11.2022	
4	Обґрунтування вибору технологічної схеми	28.12.2022 – 02.01.2023	
5	Специфікація обладнання	02.01.2023 – 09.01.2023	
6	Опис технологічної схеми	10.01.2023 – 15.01.2023	
7	Контроль виробництва	16.01.2023 – 20.01.2023	
8	Охорона довкілля	20.01.2023 – 22.01.2023	
9	Оформлення пояснювальної записки	22.01.2023 – 23.01.2023	
10	Виконання графічної частини проекту	23.01.2023 – 31.01.2023	

Здобувач \_\_\_\_\_  
(підпис)

Керівник роботи \_\_\_\_\_  
(підпис)

Валерія КОЗУБ  
(ім'я та прізвище)

Віктор УДИМОВИЧ  
(ім'я та прізвище)

## РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячений біосинтезу гентаміцину *Micromonospora purpurea*. Робота складається зі вступу, 8 розділів, списку використаної літератури. Загальний обсяг проекту 69 сторінок друкованого тексту. Дана робота містить 8 рисунків та 13 таблиць. Також, присутня графічна частина.

У даній роботі представлено обґрунтування та надано технологічний процес біосинтезу біомаси за рахунок продуцента *M. purpurea*, який передбачає наявність допоміжних робіт (підготовка і стерилізація поживних середовищ, розчинів для підтримання рівня рН під час культивування), стадії отримання, підготовки посівного матеріалу та накопичення культури під час виробничої ферментації.

Проведено обґрунтування вибору для використання біологічного агента *M. purpurea*. За змістовним порівнянням як основний біологічний агент обрано *M. purpurea* GbKL2023 через умовну вартість гентаміцину а також швидкість його синтезу. Урахуванням складу поживного середовища запропоновано схему його підготовки та підібрано режими стерилізації.

Розраховано необхідну кількість стадій підготовки посівного матеріалу, яка становить 4 етапи. Виробниче культивування відбувається в ферментері на 20 м<sup>3</sup>.

**Ключові слова:** гентацимін, антибіотик, актиноміцет, *Micromonospora purpurea*, розчин для ін'єкцій, інфекції сечовивідних шляхів, аеробне культивування

## ЗМІСТ

<b>РЕФЕРАТ</b> .....	3
<b>ВСТУП</b> .....	6
<b>РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНТАМІЦИНУ</b> .....	8
<b>РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА</b> .....	12
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування.....	12
2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки <i>M. purpurea</i> ..	15
2.3. Таксономічний статус <i>M. purpurea</i> .....	16
<b>РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ</b> .....	17
3.1. Потреба у гентаміцині .....	17
3.2. Розрахунок потужності виробництва.....	18
3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів.....	20
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.....	20
3.5. Біосинтез гентаміцину .....	24
3.5. 1. Шляхи катаболізму крохмалю у <i>M. purpurea</i> GbKL202.....	24
3.5.2. Біотрансформація крохмалю в гентаміцин .....	25
<b>РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ</b> .....	27
4.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера.....	27
4.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря.....	28
4.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів.....	28
4.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища.....	30
<b>РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ</b> .....	33
<b>РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ</b> .....	36
<b>РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА</b> .....	48
7.1. Карта постадійного контролю доферментаційних процесів.....	48
7.2. Мікробіологічний контроль.....	53

7.3. Показники росту і синтезу гентаміцину.....	54
7.3.1. Визначення концентрації біомаси.....	54
7.3.2. Визначення концентрації гентаміцину.....	55
7.4. Визначення концентрації джерела азоту та вуглецю.....	55
7.4.1. Визначення концентрації амонійного азоту .....	55
7.4.2. Визначення концентрації вуглецю.....	55
<b>РОЗДІЛ 8. Охорона довкілля .....</b>	<b>57</b>
8.1. Аналіз технологічної схеми виробництва гентаміцину .....	56
8.2 Перспективи впровадження системи екологізації виробництва.....	58
8.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів.....	58
8.2.2. Система знешкодження твердих відходів.....	62
8.2.3. Система знешкодження газоподібних викидів.....	63
8.2.3. Заходи щодо зменшення об'ємів відходів.....	65
<b>СПИСОК ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ.....</b>	<b>69</b>

## ВСТУП

За останні десятиліття широкого застосування в лікуванні інфекційних захворювань набули антибіотики. Це допомогло зберегти сотні мільйонів життів івилікувати важкі форми хвороб. Більшість основних антибіотиків отримано з грампозитивної бактерії роду *Streptomyces*. В той же час існують антибіотики, отримані з інших грампозитивних чи грамнегативних бактерій. Як приклад, застосування пеніциліну у боротьбі з інфекційними захворюваннями (пневмонія, дифтерія, сифіліс, гонорея тощо) і запалювальними процесами стало визначним стимулом для подальшого їх дослідження та пошуку все нових і нових антибіотичних речовин [1].

Велика кількість антибіотиків, що знайшли застосування в медицині, були синтезовані актиноміцетами – *Streptomyces*, *Micromonospora*. Єдиним, нині існуючим продуцентом гентаміцину є *M. purpurea* (*M. echinospora*) [2].

Аміноглікозиди (АГ) – це антибіотики широкого спектру дії, що використовуються в лікуванні бактеріальних інфекцій. До них належать стрептоміцин, неоміцин, гентаміцин, канаміцин та інші. Глобальний ринок аміноглікозидів оцінювався в 1673,79 млн доларів США у 2020 році, і очікується, що він досягне 2125,20 млн доларів до 2026 року [3].

В сучасному становищі та поширенню COVID-19 пріоритетність препаратів, що підвищують імунітет, дуже зростає. Наприклад, згідно з дослідницькою статтею Nehru Sai Suresh Chalichem et al., опублікованою в Journal of Medical Hypotheses Journal від червня 2020 р., аміноглікозиди мають протівірусну активність, що в тому числі підвищує імунітет. Таким чином, аміноглікозиди можуть бути ефективним класом препаратів протиреспіраторних інфекцій, і ефективно підвищувати імунітет [4].

Гентаміцин займає найбільшу частку антибіотиків на світовому ринку. Його використання особливо велике в регіонах, що розвиваються та у вже розвинених.

					<i>НУХТ БТЕК 05.01.11 КР ПЗ</i>			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	<i>ВСТУП</i>	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Козуб В.К.						
Перевір.		Удимович В.М.					6	69
Реценз.						<i>Кафедра БТМ</i>		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Він є економічно вигідним та ефективним препаратом проти багатьох інфекційних захворювань. Таким чином, його попит постійно зростає, причому з деякими препаратами його використовують в комбінаціях. Відповідно до WHO кількість країн Європи, де використовується гентаміцин – 25/46, а його середня частка на ринку складає 8% [5].

На сьогодні актуальною є проблема ефективного виробництва антибіотиків з використанням біотехнологічного виробництва та забезпечення населення достатньою кількістю ефективних препаратів для лікування інфекцій. Одним з таких препаратів є гентаміцин, що продукується *Micromonospora echinospora* (*Micromonospora purpurea*) та має широкий спектр біологічної дії, в тому числі пригнічення грампозитивних і грамнегативних бактерій.

## РОЗДІЛ 1

### ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНТАМІЦИНУ

Гентаміцин — це аміноглікозидний антибіотик широкого спектру дії, який отримують шляхом ферментації *M. purpurea* або *M. echinospora*. Гентаміцин — комплекс антибіотиків, що складається з чотирьох основних (C1, C1a, C2 і C2a) і кількох мінорних компонентів. Цей агент необоротно зв'язується з рибосомальною субодиницею 30S бактерії. Зокрема, цей антибіотик знаходиться між 16S рРНК і білком S12 в субодиниці 30S. Це призводить до втручання в комплекс ініціації трансляції, неправильного зчитування мРНК, що перешкоджає синтезу білка та призводить до бактерицидного ефекту [6,7].

Хімічна формула:  $C_{21}H_{43}N_5O_7$  [7]

Молекулярна маса: 477,6 г/моль [7]

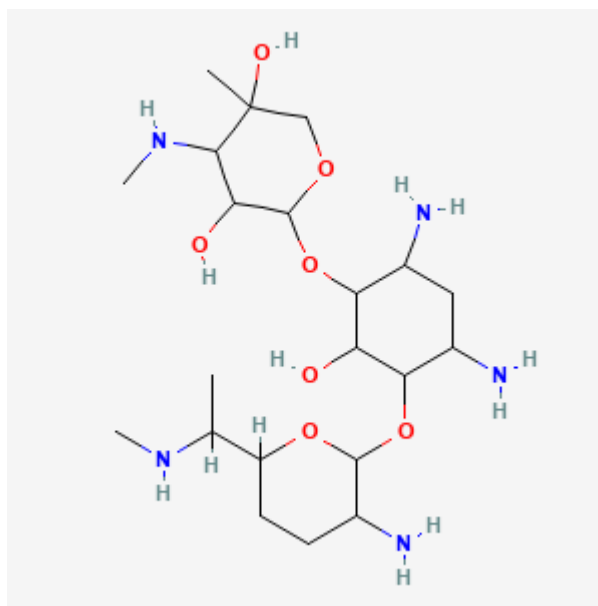


Рис. 1.1. Загальна структурна хімічна формула гентаміцину [7]

$M_m = 418,54$  Да. [8]

Точка плавлення — 105 °С [8]

$\log P$  (октанол-вода) = -1,88 [8]

					<i>НУХТ БТЕК 05.01.11 КР ПЗ</i>		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Козуб В.К.			<b>РОЗДІЛ 1 ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНТАМІЦИНУ</b>		
Перевір.		Удимович В.М.					
Реценз.							
Н. Контр.							
Затверд.		Стабніков В.П.					
					Лім.	Арк.	Аркушів
						8	69
					<i>Кафедра БТМ</i>		

За зовнішнім виглядом – зазвичай білого кольору порошок або пористоподібна маса з легким відтінком кремового кольору. Легкорозчинний в воді, практично не розчиняється в спирті [8].

Тести *in vitro* підтверджують його активність щодо різних видів грампозитивних та грамнегативних мікроорганізмів: *Escherichia coli*, *Proteus* spp. (індолпозитивних та індолнегативних), *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp. та *Staphylococcus* spp. (включаючи пеніцилін-і метицилінстійкі штами). Нижче зазначені мікроорганізми (біологічні агенти), як доволі часто, стійкі саме до гентаміцину: *Streptococcus pneumoniae*, більшість інших видів стрептококів, ентерококів, *Neisseria meningitidis*, *Treponema pallidum* та анаеробні мікроорганізми, такі як *Bacteroides* spp. або *Clostridium* spp [6].

Гентаміцин — це аміноглікозидний антибіотик широкого спектру дії для парентерального введення, який зазвичай використовується при помірних і важких грамнегативних інфекціях. Незважаючи на його широке застосування, гентаміцин не був остаточно пов'язаний з випадками клінічно вираженого ураження печінки. Це один з найбільш часто призначених аміноглікозидів через його спектр дії, низьку вартість і доступність [7].

Існує додаткова перевага синергії, коли гентаміцин застосовують разом з іншими антибактеріальними засобами, такими як бета-лактами. Ця синергетична активність важлива не тільки для лікування складних інфекцій, але також може сприяти оптимізації дози та зниженню побічних ефектів. Бета-лактами руйнують клітинну стінку бактерій і дозволяють гентаміцину проникати в бактеріальну цитоплазму, де він може отримати доступ до рибосомної мішені, пояснюючи, чому ця комбінація може бути корисною проти грампозитивних бактеріальних інфекцій [7,9].

Хоча гентаміцин добре зарекомендував себе і може використовуватися в різних клінічних цілях, він також пов'язаний із серйозними побічними ефектами, включаючи нефротоксичність та ототоксичність, що може обмежити його використання [7].

Відповідно до вказівок Управління з контролю за якістю харчових продуктів і медикаментів (FDA), гентаміцин слід використовувати, коли це можливо, підтверджено культурою та інформацією про чутливість. Проте варіант гентаміцину також доречний, якщо базуватися на епідеміологічних даних. Таким чином, він має застосування в кількох клінічних сценаріях, таких як бактеріальна септицемія, менінгіт, інфекції сечовивідних шляхів, шлунково-кишкового тракту (включаючи перитоніт) та інфекції м'яких тканин, але завжди з використанням додаткової інформації (наприклад, вік пацієнта, симптоми та ознаки під час звернення, моделі місцевої антимікробної резистентності), щоб підвищити ймовірність використання гентаміцину проти чутливих мікробів [9].

Гентаміцин зазвичай доступний у вигляді препаратів для парентерального, офтальмологічного та місцевого застосування [9].

Очні препарати гентаміцину випускаються у вигляді мазі та розчину 0,3% концентрації. Зазвичай вони використовуються при бактеріальних очних інфекціях, таких як кератит і кон'юнктивіт [9].

Мазь і крем гентаміцину для місцевого застосування мають концентрацію 0,1% і призначені лише для специфічних інфекцій шкіри та підшкірної клітковини, які зазвичай є вторинними після садна, порізів та опіків [9].

Парентеральний шлях головним чином включає внутрішньом'язове та внутрішньовенне введення, де дози обох розраховуються на основі ваги пацієнта. Для пацієнтів із помірним та патологічним ожирінням вага для розрахунку дози дорівнює 0,4, помноженому на надлишкову масу тіла плюс оцінену ідеальну масу тіла [9].

Доза від 5 до 7 мг/кг щодня внутрішньовенно (інфузія протягом 30-120 хвилин) є кращим способом застосування гентаміцину при більшості системних інфекцій, викликаних чутливими мікробами, навіть незважаючи на те, що традиційна доза від 3 до 5 мг/кг/добу розділена на у дозах кожні 8 годин все ще є варіантом у певних сценаріях [9].

Добову дозу можна вводити внутрішньом'язово при деяких несерйозних інфекціях, таких як запальні захворювання органів малого таза без сепсису [9].

Інфекційний ендокардит, викликаний стафілококами або ентерококами, раніше лікували гентаміцином і бета-лактамами, хоча від цієї терапії відмовилися після підвищення рівня резистентності бактерій [9].

Зазвичай у поєднанні з анаеробними антибіотиками гентаміцин можна вводити одноразово в дозі 5 мг/кг за 60 хвилин до хірургічного розрізу під час шлунково-кишкових, урологічних та гінекологічних процедур для профілактики хірургічних інфекцій [9].

В Україні гентаміцин випускається лише у вигляді ін'єкційного розчину в ампулах. До вітчизняних виробників відноситься «ФФ «Дарниця»», «Корпорація Артеріум» (раніше цей препарат ще випускав АТ «Галичфарм та ПАТ «Київмедпрепарат», але термін реєстрації простроковано) та "Фармацевтична компанія "Здоров'я" [8,10].



Рис. 1.2. Українські лікарські препарати гентаміцину [8]

Раніше також АТ «Фармак» випускав мазь для зовнішнього застосування, проте термін реєстрації закінчився ще в 2009 році [11].

**РОЗДІЛ 2**  
**ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА**  
**БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА**

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

Гентаміцин є важливим засобом для лікування важких бактеріальні інфекції.

Даний антибіотик синтезується *M. purpurea* або *echinospora* [12].

Пропонується порівняти мікроорганізми-продуценти гентаміцину в таблиці 2.1.

*Таблиця 2.1*

**Порівняння різних біологічних агентів, що синтезують гентаміцин**

Продуцент	Склад поживного середовища, г/л	Концентрація гентаміцину, мг/л	Умови біосинтезу	Література
<i>Micromonospora purpurea</i> SPU503	Крохмаль – 50; Соеве борошно – 35; Глюкоза – 15; Пептон – 2; (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> – 0,5; KNO <sub>3</sub> – 0,5; CaCO <sub>3</sub> – 6; CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O 0,01.	1,089	120 год, 34 °С, рН 7,5	[12]
<i>Micromonospora echinospora</i> MTCC 708	Крохмаль – 12,7252; Соева макуха – 10,593; Декстроза – 5; Кукурудзяний екстракт – 5; ZnSO <sub>4</sub> – 0,2714; (NH <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> – 5,4032. CaCO <sub>3</sub> – 7;	408,88	96 год, 30 °С, рН 7,0	[13]
<i>Micromonospora purpurea</i> GbKL202	Крохмаль – 40; Соева макуха – 25; Кукурудзяний крохмаль – 10; Пептон – 5; CoCl <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O – 0,01; (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> – 1; CaCO <sub>3</sub> – 5.	780,39	124 год, 33 °С, рН 7,5	[14]

<b>НУХТ БТЕК 05.01.11 КР ПЗ</b>				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.	Козуб В.К.			
Перевір.	Удимович В.М.			
Реценз.				
Н. Контр.				
Затверд.	Стабніков В.П.			
<b>РОЗДІЛ 2</b> <b>ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ</b> <b>ТА ХАРАКТЕРИСТИКА</b> <b>БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА</b>				
		Літ.	Арк.	Архивів
			12	69
<b>Кафедра БТМ</b>				

В зазначеній таблиці видно велику різницю в концентраціях кінцевого продукту. Найвищий показник відзначається в *M. purpurea* GbKL202. Проте, його час культивування вищий, порівняно з *M. echinospora* МТСС 708, який також синтезує далеко не найменшу кількість гентаміцину. Також, варто відмітити різницю середовищ для культивування, що не дає повноцінної картини порівняння. Тому, в таблиці 2.2. було прораховано вартість поживного середовища кожного продуцента.

Таблиця 2.2

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1л середовища	Джерело інформації*
<i>Micromonospora purpurea</i> SPU503	Крохмаль – 50	25	1,25	1
	Соеве борошно – 35	58	2,03	2
	Глюкоза – 15	65	0,975	3
	Пептон – 2	1320	3,24	4
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> – 0,5	32	0,016	5
	KNO <sub>3</sub> – 0,5	36	0,018	6
	CaCO <sub>3</sub> – 6	14,62	0,088	7
	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O – 0,01	1000	0,01	8
Вартість 1 л середовища – 7,627 грн				
<i>Micromonospora echinospora</i> МТСС 708	Крохмаль – 12,7252	25	0,318	1
	Соева макуха – 10,593	18	0,190	9
	Глюкоза – 5	65	0,325	3
	Кукурудзяний екстракт – 5	78	0,39	10
	ZnSO <sub>4</sub> – 0,2714	86	0,023	11
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> – 5,4032	570	3,079	12
	CaCO <sub>3</sub> – 7	14,62	0,102	7
Вартість 1 л середовища – 4,427 грн				
<i>Micromonospora purpurea</i> GbKL202	Крохмаль – 40	25	1	1
	Соева макуха – 25	18	0,45	9
	Кукурудзяний крохмаль – 10	34	0,34	13
	Пептон – 5	1 320	6,6	4
	CoCl <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O – 0,01	1 000	0,01	8
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> – 1	32	0,032	5
	CaCO <sub>3</sub> – 5	14,62	0,073	7
Вартість 1 л середовища – 8,505 грн				

Визначення вартості поживних середовищ

Примітка\* (ціни наведено станом на січень 2023): 1. <https://flagma.ua/uk/krokhmal-kartoplianyi-ukraina-vh-paperovi-mishky-o4332235.html>, 2. <https://prom.ua/ua/p1033659165-soevaya-muka-poluzhirnaya.html>, 3. <https://prom.ua/ua/p1720885605-dekstroza-pischevaya-25kg.html?&primelead=MS4z>, 4. <https://www.systopt.com.ua/item-pepton-fermentatyvnyj>, 5. <https://prom.ua/ua/p1632661741-sulfat-amoniyu>

- [granulovaniy.html](https://prom.ua/ua/p1026104419-kalievaya-selitra-dostavkoj.html), 6. <https://prom.ua/ua/p1026104419-kalievaya-selitra-dostavkoj.html>, 7.  
<https://prom.ua/ua/p1026102717-karbonat-kaltsiya.html>, 8. <https://prom.ua/ua/p631688613-kobalt-hloristyj.html?&primelead=MC44>,  
9. [https://prom.ua/ua/p1474919452-zhmyh-sevyj.html?utm\\_source=google\\_pmax&utm\\_medium=cpc&utm\\_content=pmax&utm\\_campaign=Pmax\\_spa\\_wa\\_r\\_b2b&gclid=Cj0KCQiA4aacBhCUARIsAI55maFugOdghp8V5u8\\_NYB9NGQPO9NgU5PqwzDC1gu7aVeIFkvcOxAvmxcaAt-ZEALw\\_wcB](https://prom.ua/ua/p1474919452-zhmyh-sevyj.html?utm_source=google_pmax&utm_medium=cpc&utm_content=pmax&utm_campaign=Pmax_spa_wa_r_b2b&gclid=Cj0KCQiA4aacBhCUARIsAI55maFugOdghp8V5u8_NYB9NGQPO9NgU5PqwzDC1gu7aVeIFkvcOxAvmxcaAt-ZEALw_wcB), 10. <https://prom.ua/ua/p1310282824-ekstrakt-kukuruznyj-litrov.html>, 11.  
<https://prom.ua/ua/p276196047-tsinka-sulfat-vodn.html?&primelead=Mj4wOA>, 12.  
<https://shop.hlr.ua/ammoniy-fosfornokislyy-3-zameshchennyj-chda-12913.html>, 13.  
<https://prom.ua/ua/p1662939933-krahmal-kukuruznyj-30kg.html>

З таблиці 2.2. було визначено, що найвищу вартість за середовище має *M. purpurea* GbKL202, а найнижчу, його потенційний конкурент *M. echinospora* МТСС 708. *M. purpurea* SPU503 має найменші шанси щодо її промислового використання, адже концентрація гентаміцину є дуже низькою, а вартість середовище не з найдешевших. Але остаточного порівняння ми не можемо виконати за цими даними, оскільки важливим показником нашого виробництва є умовна вартість гентаміцину. Кінцеве порівняння показано в табл.2.3.

Таблиця 2.3.

Узагальнене порівняння продуцентів гентаміцину

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища, грн	Концентрація гентаміцину, мг/л	Умовна вартість 1 мг цільового продукту, грн/мг	Тривалість культивування, год	Кількість утвореного гентаміцину за годину, мг/год
<i>Micromonospora purpurea</i> SPU503	7,627	1,089	7,003	120	0,009
<i>Micromonospora echinospora</i> МТСС 708	4,427	408,88	0,010827	96	4,259
<i>Micromonospora purpurea</i> GbKL202	8,505	780,39	0,010898	124	6,293

Як було зазначено вище, *M. purpurea* SPU503 виявився абсолютно не вигідним продуцентом для промислового культивування гентаміцину. Він має найнижчі показники по всім параметрам порівняння, а тому не може бути використаним для запропонованого виробництва.

*M. purpurea* GbKL202 та *M. echinospora* МТСС 708 мають дуже подібну умовну вартість, яка майже не відрізняється одна від іншої. Тому, вибір

виконуємо по утвореному гентаміцину за годину. Це параметр є на порядок вищим саме у *M. purpurea* GbKL202, обходячи *M. echinospora* MTCC 708 майже на 2 мг/год. Тому, можна казати про доцільність застосування штаму GbKL202 в подальшій роботі, а отже і розробці виробництва.

## 2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки *M. purpurea*

Для опису зазначимо, що синонімом *M. purpurea* є *M. echinospora* [15].

Штами *Micromonospora* мають схожі хемотаксономічні та морфологічні особливості. Усі вони містять мезодіамінопімелін у пептидоглікані клітинної стінки, ксилозу у гідролізатах цілого організму, складні суміші ізо- та антеізо-розгалужених жирних кислот із переважаючими пропорціями ізо C15:0 та ізо-C16:0 та полярні ліпідні структури, що містять фосфатидилетаноламін (діагностичного ліпиду) [16].



Рис.2.1. Електронна мікрофотографія *M. echinospora* DCWR9-8-2T, вирощеного на крохмально-казеїновому агаризованому середовищі протягом 21 дня при 30 °С, 1 мкм [17].

Спори *M. echinospora* зазвичай знаходяться поодинокі на субстратному міцелії. Сама поверхня спори зазвичай має бути гладкою, але також можливі варіаційні зміни, в залежності від штаму [17].

Представники цього роду є грампозитивними, спороутворюючими аеробними актинобактеріями, які мають унікальні морфологічні характеристики,

такі як одна спора, прикріплена до коротких субстратних гіф. Крім того, вони мають пігменти каротиноїдного міцелію, які демонструють жовті, помаранчеві, червоні, фіолетові, коричневі або чорні колонії [18].

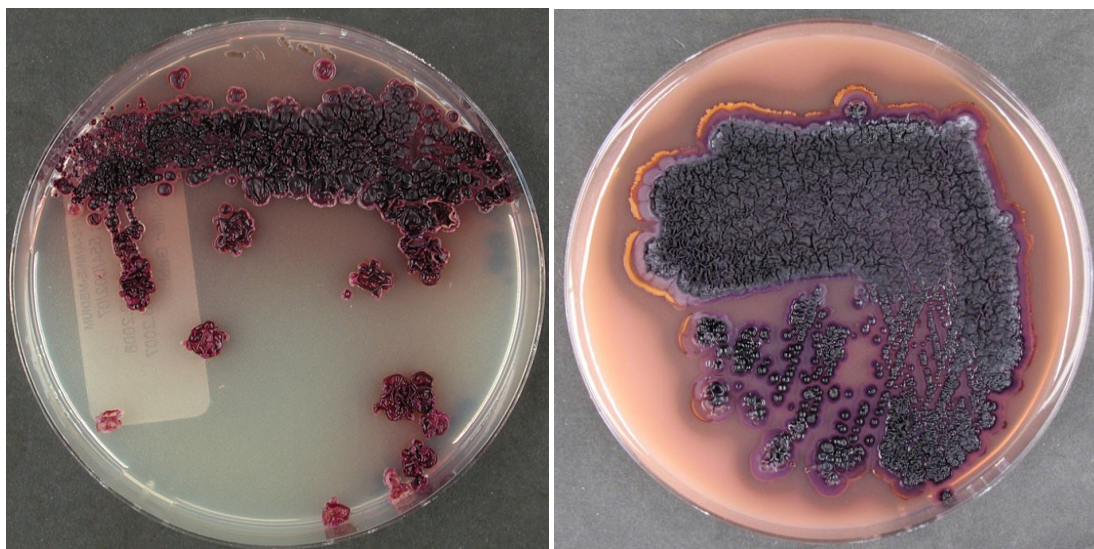


Рис.2.2. *M. echinospora* на агарі (назви не вказано) [19]

Загалом, штами ростуть при 20-37°C (температура оптимуму при цьому для більшості штамів становить близько 28 °С), при рН 8,0 і 9,0 і в присутності 1%, мас./об. хлориду натрію. Продукують каталазу, гідролізований ескулін і арбутин, розщеплений казеїн, крохмаль, Твін 20 і ксилан, але не ростуть при 4 °С, рН 4,4 або в присутності 5% мас./об. хлориду натрію [16,19].

Види, що належать до цього роду, широко поширені в різноманітних географічних середовищах існування, а саме; ґрунт, мангрові відкладення, морські відкладення, рослини та екстремальні середовища існування (наприклад, гіперпосушливі пустелі, глибоководні відкладення та гіперсолоні озера) [18].

### 2.3. Таксономічний статус *M. purpurea*

Домен: *Bacteria*  
Тип: *Actinobacteria*  
Клас: *Actinomycetia*  
Ряд: *Micromonosporales*  
Родина: *Micromonosporaceae*  
Рід: *Micromonospora*  
Вид: *M. purpurea* [15]

## РОЗДІЛ 3

### ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

#### 3.1. Потреба у гентаміцині

Гентаміцин антибіотик групи аміноглікозидів, проявляє бактерицидну дію проти аеробних грамнегативних бактерій, що робить гентаміцин хорошим варіантом для лікування кількох поширених інфекцій. Оскільки гентаміцин має мінімальну шлунково-кишкову абсорбцію, його зазвичай вводять парентерально, включаючи системні, місцеві та офтальмологічні форми [9].

Механізм бактерицидної дії гентаміцину до кінця не з'ясований, але вчені припускають що він виглядає наступним чином: він проходить через грамнегативну мембрану шляхом активного транспорту, залежного від кисню (оскільки потрібен кисень, аміноглікозиди неефективні для анаеробних бактерій). Потрапляючи в цитоплазму, гентаміцин зв'язується з 16s рРНК на 30s рибосомній субодиниці, порушуючи трансляцію мРНК та таким чином, призводячи до утворення усічених або нефункціональних білків [20]. Створені усічені білки розміщуються на клітинній стінці, що порушує її непроницність. В той же час інші вчені припускають, що в результаті накопичення активних форм кисню, в наслідок виснаження білків, які беруть участь в реакціях окислення-відновлення, призводить до загибелі бактерій [21].

Найпоширенішими мікроорганізмами в клінічній практиці, проти яких даний антибіотик проявляє належну терапевтичну відповідь, є представники родини *Enterobacteriaceae* (наприклад, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratiaspp.*, *Enterobacter spp.*), *Pseudomonas aeruginosa* та деякі штами родів *Neisseria*, *Moraxella* та *Haemophilus* [22]. Таким чином, він має застосування в кількох клінічних сценаріях, таких як бактеріальна септицемія, менінгіт, інфекції сечовивідних шляхів, шлунково-кишкового тракту (включаючи перитоніт) та інфекції м'яких тканин.

					<i>НУХТ БТЕК 05.01.11 КР ІІЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<b>РОЗДІЛ 3 ТЕХНІКО- ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ</b>	<i>Лім.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Архивів</i>
<i>Розроб.</i>		<i>Козуб В.К.</i>					17	69
<i>Перевір.</i>		<i>Удимович В.М.</i>				<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Реценз.</i>								
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						

Розглянувши досліді в яких використовували гентаміцин для лікування інфекцій сечовивідних шляхів [23] можна відзначити отримані результати, а саме що кількість подальших захворювань зменшувалась та під час клінічного спостереження в пацієнтів не було виявлено побічних ефектів та враховуючи той факт що кількість резистентних мікроорганізмів до стандартних методів лікування з кожним роком збільшується [24], можна зробити висновок що використання гентаміцину для лікування інфекцій сечовивідних шляхів є оптимальним варіантом.

### **3.2. Розрахунок потужності виробництва**

Обравши напрям використання гентаміцину визначимо річну потребу даного антибіотика. Так як даний антибіотик можна використовувати як дітям так і дорослим для більш легшого розрахунку в нашому випадку будемо розраховувати потребу для лікування людей старше 18 років. Відповідно до оприлюдненої інформації Державної служби статистики України на 2017 рік було зареєстровано 1 536 595 захворювань сечостатевої системи у осіб віком від 18 років та старше [25]

Так як гентаміцин відносять до антибіотику другої лінії приймемо що серед даної кількості захворювань він буде використовуватись лише в 10 % від загальної кількості випадків.

$$1\,536\,595 \times 10\% = 153\,659$$

Також, враховуючи, що до категорії захворювань сечової системи відносять велику кількість різних захворювань, а окрема статистика по кожному з них не ведеться, в наших розрахунках, приймемо за основу дані які наведені Українською Асоціацією Нефрологів ДУ від «Інститут нефрології НАМН України» за 2017 рік [26], а саме що найбільшу долю серед інфекційних захворювань сечової системи становить пієлонефриту який складає майже 90%, тому для загальної кількості захворювань ми візьмемо курс та дозування яке необхідне для лікування пієлонефриту.

Для лікування пієлонефриту середня тривалість курсу лікування становить 7-10 діб (розрахунок будемо проводити по найбільшій кількості днів необхідних для лікування даного захворювання)

10 діб

При лікуванні інфекцій сечовидільних шляхів гентаміцином доза становить 1,5 - 3 мг/кг маси тіла/доба (розрахунок проведемо по середньому значенню):

$$(1,5 + 3) / 2 = 2,25 \text{ мг/кг маси тіла}$$

Враховуючи що середня вага жінок та чоловіків різна визначимо яка кількість серед 153 659 випадків становить жінки та чоловіки. Згідно статистичних даних загальна кількість хвороби сечостатевої системи становить з врахуванням дітей 1723742 серед яких чоловіки 300219 та жінки 1423523, з чого можна приблизно розрахувати що в відсотковому співвідношенні захворюваність жінок становить 82,58 % від загальної кількості а чоловіків 17,42 %

$153\ 659 \times 17,42 \% = 26\ 767,4$  прийmemo 26 767 випадків становлять чоловіки

$$153\ 659 \times 82,58 \% = 126\ 891,6 \text{ прийmemo } 126\ 892 \text{ випадки становлять жінки}$$

Згідно даних Державна служба статистики України в 2020 році середня вага жінок становить 71 кг, а чоловіків 80 кг [25].

Розрахуємо дозу препарату яку використають чоловіки та жінки протягом курсу лікування

$$80 \text{ кг} \times 2,25 \text{ мг/кг} \times 10 = 1\ 800 \text{ мг (1 чоловік)}$$

$$71 \text{ кг} \times 2,25 \text{ мг/кг} \times 10 = 1\ 597,5 \text{ мг (1 жінка)}$$

Дізнавшись необхідну кількість препарату для проходження курсу лікування 1 людиною визначимо кількість препарату яку використають чоловіки та жінки:

$$26\ 767 \text{ вип.ч.} \times 1\ 800 \text{ мг} = 48\ 180\ 600 \text{ мг}$$

$$126\ 892 \text{ вип.ж.} \times 1\ 597,5 \text{ мг} = 202\ 709\ 970 \text{ мг}$$

Загальна кількість гентаміцину для лікування чоловіків та жінок становить:

$$202\,709\,970 \text{ мг.ж.} + 48\,180\,600 \text{ мг.ч.} = 250\,890\,570 \text{ мг}$$

Розрахувавши необхідну кількість антибіотику, та враховуючи що синтез гентаміцину відбувається мікробним шляхом, за допомогою *M. purpurea* GbKL202 який синтезує 780,39 мг/л визначимо яку кількість культуральної рідини необхідно отримати:

$$250\,890\,570 \text{ мг} / 780,39 \text{ мг/л} = 321\,493,8 \text{ л}$$

Також після отримання культуральної рідини відбувається виділення та очищення цільового продукту, в результаті чого відбувається втрати продукту на певних стадіях, тому слід врахувати 40 % загальних втрат які відбуваються на даних етапах і загальна кількість культуральної рідини з врахуванням втрат буде становити:

$$321\,493,8 \text{ л} / (1 - 0,4) = 535\,823 \text{ л}$$

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

Визначивши необхідну кількість культуральної рідини на рік проведемо розрахунок кількості культуральної рідини за добу, кількість робочих трудоднів приймемо 270, так як після закінчення виробництва гентаміцину це надасть змогу експлуатувати передбачене для технологічного процесу обладнання з іншою метою, котре є економічно доцільним та вигіднішим ніж цілорічно отримувати один продукт.

$$V_{\text{д}} = \frac{C}{T_{\text{рд}}} = \frac{535\,823 \text{ л}}{270} = 1\,984,5 \text{ л/добу}$$

Кількість продукту за цикл ( $V_{\text{пц}}$ ) буде становити:

$$V_{\text{пц}} = \frac{K_1 * V_{\text{д}} * T_{\text{цф}}}{24} = \frac{1,1 * 1\,984,5 * (124 + 9)}{24} = 12\,097,2 \text{ л/цикл}$$

де  $T_{\text{цф}}$  – цикл роботи ферментера, який складається з тривалість виробничого біосинтезу (124 год) та часу підготовки ферментера до роботи (9 год).  $K_1$  – коефіцієнт запасу, який враховує можливість нестерильних операцій ( $K_1 = 1,1$ ).

12 097,2 л культуральної рідини ( $V_{\text{цк}}$ ) можна отримати у виробничому ферментері, геометричний об'єм якого має становити:

$$V_{\text{Г}} = \frac{V_{\text{цк}}}{K_{\text{зап}}} = \frac{12\,097,2}{0,65} = 18\,611,1 \text{ л}$$

Найближчий за геометричним об'ємом ферментер  $V_{\text{Г}} = 20 \text{ м}^3$ .

Проведемо уточнення коефіцієнта заповнення  $K_{\text{зап}} = \frac{V_{\text{цк}}}{V_{\text{Г}}} = \frac{12\,097,2}{20\,000} = 0,6$ ,

дане значення задовольняє наші потреби, тому залишаємо його незмінним.

### 3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

В результаті виробничого циклу отримуємо  $V_{\text{цк}} = 12\,097,2$  л культуральної рідини. При одержанні культуральної рідини необхідно врахувати втрати КР в результаті краплиносу через колектор відпрацьованого повітря ( $E_{\text{ф}}$ ), які становлять 10%.

Отже, загальна кількість ПМ та ПС на початку виробничого біосинтезу становитиме:

$$V_{\text{роб1}} = V_{\text{цк}} / (1 - E_{\text{ф}}) = 12\,097,2 / (1 - 0,1) = 13\,441,3 \text{ л}$$

Так як робочий об'єм ферментера складається з суми об'єму ПС та об'єму ПМ розрахуємо кількість посівного матеріалу. Посівний матеріал готується в посівному апараті (ПА) та його об'єм дорівнює 10 % від об'єму поживного середовища який подається до ферментера:

$$V_{\text{роб1}} = V_{\text{пс1}} + V_{\text{пм1}}, \text{ тоді } V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб1}} - V_{\text{пс1}}$$

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

$$V_{\text{пс1}} = V_{\text{роб1}} / (1 + X_{\text{пм1}}) = 13\,441,3 / (1 + 0,1) = 12\,219,4 \text{ л}$$

$$V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб1}} - V_{\text{пс1}} = 13\,441,3 - 12\,219,4 = 1\,221,9 \text{ л}$$

Для визначення приблизного геометричного об'єму посівного апарата  $V_{\text{па1}}$  використовуємо  $V_{\text{роб1}}$  та  $K_{\text{зап}}$  – коефіцієнт заповнення = 0,65;

$$V_{\text{па1}} = V_{\text{пм1}} / K_{\text{зап}} = 1\,221,9 / 0,65 = 1\,879,8 \text{ л}$$

Отже, таку кількість посівного матеріалу *M. purpurea* GbKL202 можна отримати при культивуванні в посівному апараті з геометричним об'ємом  $V_{\text{па1}} = 2 \text{ м}^3$ .

Тоді дійсний коефіцієнт заповнення буде

$$K_{\text{зап}2} = V_{\text{роб}2} / V_{\text{па}} = 1\,221,9 / 2\,000 = 0,61, \text{ що допустимо.}$$

Посівний матеріал для виробничого ферментера об'ємом  $20 \text{ м}^3$  готується у посівному апараті з робочим об'ємом  $V_{\text{роб}2}$

$$V_{\text{роб}2} = V_{\text{пм}1} / (1 - E_{\text{пм}}) = 1\,221,9 / (1 - 0,13) = 1\,404,5 \text{ л}$$

де  $E_{\text{пм}} = 0,13$  – втрати культуральної рідини при вирощуванні посівного матеріалу в посівному апараті за рахунок краплевиносу частини культуральної рідини під час аерації середовища.

Для одержання посівного матеріалу потрібно мати наступний об'єм поживного середовища  $V_{\text{пс}2}$  та кількість посівного матеріалу який становить 10% від об'єму поживного середовища  $V_{\text{пс}2}$

$$V_{\text{пс}2} = V_{\text{роб}2} / (1 + X_{\text{пм}2}) = 1\,404,5 / (1 + 0,1) = 1\,276,8 \text{ л}$$

Об'єм посівного матеріалу

$$V_{\text{пм}2} = V_{\text{роб}2} - V_{\text{пс}2} = 1\,404,5 - 1\,276,8 = 127,7 \text{ л}$$

Для визначення приблизного геометричного об'єму посівного апарата  $V_{\text{па}2}$  використовуємо  $V_{\text{пм}2}$  та  $K_{\text{зап}}$  – коефіцієнт заповнення = 0,65;

$$V_{\text{па}2} = V_{\text{пм}2} / K_{\text{зап}} = 127,7 / 0,65 = 196,4 \text{ л}$$

Отже, таку кількість посівного матеріалу *M. purpurea* GbKL202 можна отримати при культивуванні в посівному апараті з геометричним об'ємом  $V_{\text{па}} = 0,2 \text{ м}^3$ .

Тоді дійсний коефіцієнт заповнення буде

$$K_{\text{зап}2} = V_{\text{роб}2} / V_{\text{па}} = 127,7 / 200 = 0,638, \text{ що допустимо.}$$

Посівний матеріал для посівного апарата  $2 \text{ м}^3$  готується в інокуляторі з робочим об'ємом  $V_{\text{роб}3}$

$$V_{\text{роб}3} = V_{\text{пм}2} / (1 - E_{\text{пм}}) = 127,7 / (1 - 0,13) = 146,8 \text{ л}$$

де  $E_{\text{пм}} = 0,13$  – втрати культуральної рідини при вирощуванні посівного матеріалу в посівному апараті за рахунок краплевиносу частини культуральної рідини під час аерації середовища.

Для одержання посівного матеріалу потрібно мати наступний об'єм поживного середовища  $V_{\text{пс}2}$  та кількість посівного матеріалу який становить 10% від об'єму поживного середовища  $V_{\text{пс}2}$

$$V_{\text{пс3}} = V_{\text{роб3}} / (1 + X_{\text{пм3}}) = 146,8 / (1 + 0,1) = 133,5 \text{ л}$$

Об'єм посівного матеріалу

$$V_{\text{пм3}} = V_{\text{роб3}} - V_{\text{пс3}} = 146,8 - 133,5 = 13,3 \text{ л}$$

Для визначення приблизного геометричного об'єму посівного апарата  $V_{\text{па3}}$  використовуємо  $V_{\text{пм3}}$  та  $K_{\text{зап}}$  – коефіцієнт заповнення = 0,65;

$$V_{\text{па3}} = V_{\text{пм3}} / K_{\text{зап}} = 13,3 / 0,65 = 20,4 \text{ л}$$

Отже, таку кількість посівного матеріалу *M. purpurea* GbKL202 можна отримати при культивуванні в посівному апараті з геометричним об'ємом  $V_{\text{па}} = 20$  л.

Тоді дійсний коефіцієнт заповнення буде

$$K_{\text{зап2}} = V_{\text{роб2}} / V_{\text{па}} = 13,3 / 20 = 0,66,$$

не сильно перебільшує необхідне значення, що допустимо.

*Розрахунок ПС та ПМ для інокулятора*

Посівний матеріал для посівного апарата 200 л готується в інокуляторі з робочим об'ємом  $V_{\text{роб4}}$

$$V_{\text{роб4}} = V_{\text{пм4}} / (1 - E_{\text{пм4}}) = 13,3 / (1 - 0,05) = 14 \text{ л},$$

де  $E_{\text{пм4}} = 0,05$  – це втрати КР при вирощуванні посівного матеріалу в інокуляторі за рахунок краплевиносу частини КР під час аерації середовища.

Для одержання посівного матеріалу  $V_{\text{пс4}}$  потрібно мати наступний об'єм поживного середовища  $V_{\text{пс4}}$  та кількість посівного матеріалу, яка дорівнює 10% від об'єму поживного середовища  $V_{\text{пс4}}$

$$V_{\text{пс4}} = V_{\text{роб4}} / (1 + X_{\text{пм4}}) = 14 / (1 + 0,1) = 12,73 \text{ л}$$

Об'єм посівного матеріалу

$$V_{\text{пм4}} = V_{\text{роб4}} - V_{\text{пс4}} = 14 - 12,73 = 1,27 \text{ л}$$

*Розрахунок кількості ПС та ПМ для качалочних колб*

Кількість посівного матеріалу, що готується в колбах на качалці  $V_{\text{пм4}} = 1,27$  л. Втрати при культивуванні в колбах нехтуємо, оскільки вони малі.

$$V_{\text{роб5}} = V_{\text{пм4}} = 1,27 \text{ л}$$

Для одержання посівного матеріалу потрібно мати наступний об'єм поживного середовища  $V_{пс4}$  та кількість посівного матеріалу, що дорівнює 10% від об'єму поживного середовища  $V_{пс4}$

$$V_{пс5} = V_{роб5}/(1+X_{пм5}) = 1,27/(1+0,1) = 1,15 \text{ л}$$

Об'єм посівного матеріалу

$$V_{пм5} = V_{роб5} - V_{пс5} = 1,27 - 1,15 = 0,12 \text{ л}$$

Для культивування використовуємо колби об'ємом  $V_{кол} = 0,75 \text{ л}$  та коефіцієнтом заповнення  $K_{зап} = 0,2$

Кількість колб

$$N_k = V_{роб5}/V_{кол} \times K_{зап} = 1,27/0,75 \cdot 0,2 = 8,46 \text{ колб отже } 9 \text{ колб}$$

Підсумовуючи вище розраховане, можна зробити висновок, що процес одержання посівного матеріалу для синтезу гентаміцину у ферментері об'ємом  $20 \text{ м}^3$  з коефіцієнтом заповнення 0,65 відбувається в чотири етапи.

Таблиця 1.1.

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

№ стадії	Геометричний об'єм ферментера, $V_f$ , л	Коефіцієнт заповнення, $K_{зап}$ , частка	Робочий об'єм ферментера, $V_{роб}$ , л	Об'єм поживного середовища, $V_{пс}$ , л	Об'єм посівного матеріалу, $V_{пм}$ , л
1	0,750 × 9 колб	0,2	1,27	1,15	0,12
2	20	0,66	14	12,73	1,27
3	200	0,638	146,8	133,5	13,3
4	2 000	0,61	1 404,5	1 276,8	127,7
5	20 000	0,6	13 441,3	12 219,4	1 221,9

## 3.5. Біосинтез гентаміцину

### 3.5. 1. Шляхи катаболізму крохмалю у *M. purpurea* GbKL202

Для зображення наступних схем опираємось на *Micromonospora sp.* L5, оскільки в KEGG відсутні штами *M. purpurea* та його синонімічного ряду. Шлях катаболізму крохмалю в обраному актиноміцеті проходить шляхом гліколізу. Проте, в системі відсутній фермент, який би міг одразу перевести крохмаль в  $\alpha$ -D-глюкозо-1-фосфат (мається на увазі амілофосфорилаза, EC:2.4.1.1). Тому шлях

перетворення крохмалю до піровиноградної кислоти є більш довгим та розгалуженим (рис.3.1.) [27,28].

Ферменти: 1 - ізоамілаза [ЕС:3.2.1.68], 2, 3 - альфа-амілаза [ЕС:3.2.1.1], 4 - мальто-олігозилтрегалозосинтаза [ЕС:5.4.99.15], 5 - мальтоза альфа-D-глюкозилтрансфераза [ЕС:5.4.99.16], 6 - мальтоолігозилтрегалоза трегалогідролаза [ЕС:3.2.1.141], 7 - альфа-глюкозидаза [ЕС:3.2.1.20], 8 - альфа, альфа-трегалозофосфорилаза [ЕС:2.4.1.64], 9 - фосфоглюкомутаза [ЕС:5.4.2.2], 10 - глюкокіназа [ЕС:2.7.1.2], 11 - глюкозо-6-фосфат-ізомераза [ЕС:5.3.1.9], 12 - АТФ-залежна фосфофруктокіназа [ЕС:2.7.1.11], 13 - фруктозо-бісфосфатальдолаза, клас II [ЕС:4.1.2.13], 14 - тріозофосфатізомераза (ТІМ) [ЕС:5.3.1.1], 15 - гліцеральдегід 3-фосфатдегідрогеназа [ЕС:1.2.1.12], 16 - фосфогліцераткіназа [ЕС:2.7.2.3], 17 - 2,3-бісфосфогліцератзалежна фосфогліцератмутаза [ЕС:5.4.2.11], 18 - енолаза [ЕС:4.2.1.11], 19 - піруваткіназа [ЕС:2.7.1.40].

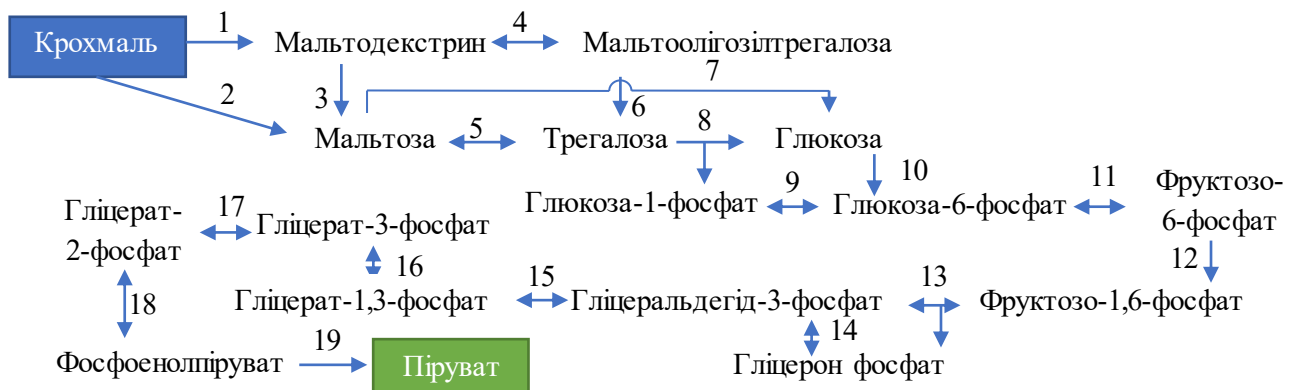


Рис.3.1. Схема катаболізму крохмалю в *Micromonospora sp.* L5 [27,28]

### 3.5.2. Біотрансформація крохмалю в гентаміцин

Під час біосинтезу кінцевою формою гентаміцину *M. purpurea* GbKL202 є гентаміцин C1a, тому будемо розглядати саме шлях біосинтезу цього типу. В базі даних KEGG не наведено схем щодо конкретного синтезу зазначеної речовини для штамів мікромоноспор [29], а лише представлена загальна карта синтезу гентаміцину [30]. Тому, використовуємо наявні літературні дані пf загальнодоступну карту синтезу гентаміцину від KEGG (без вказання продуценту).

Відомо, що основним попередником гентаміцинових антибіотиків є глюкозо-6-фосфат. Схему зображена на рис.3.2 [31-33].

Ферменти: 1 - ізоамілаза [ЕС:3.2.1.68], 2, 3 - альфа-амілаза [ЕС:3.2.1.1], 4 - мальто-олігозилтрегалозосинтаза [ЕС:5.4.99.15], 5 - мальтоза альфа-D-глюкозилтрансфераза [ЕС:5.4.99.16], 6 - мальтоолігозилтрегалоза трегалогідролаза [ЕС:3.2.1.141], 7 - альфа-глюкозидаза [ЕС:3.2.1.20], 8 - альфа, альфа-трегалозофосфорилаза [ЕС:2.4.1.64], 9 - фосфоглюкомутаза [ЕС:5.4.2.2], 10 - глюкокіназа [ЕС:2.7.1.2], 11 - глюкозо-6-фосфат-ізомераза [ЕС:5.3.1.9], 12 - глютамін-фруктозо-6-фосфат трансаміназа [ЕС:2.6.1.16], 13 - фосфоглюкозамінмутаза [ЕС:5.4.2.10], 14 - глюкозамін-1-фосфат N-ацетилтрансфераза [ЕС:2.3.1.157], 15 - біфункціональна УДФ-N-ацетилглюкозамінпірофосфорилаза [ЕС:2.7.7.23], 16 - УТФ-глюкозо-1-фосфатуридилтрансфераза [ЕС:2.7.7.9], 17 - УДФ-глюкозо-6-дегідрогеназа [ЕС:1.1.1.22], 18 - УДФ-глюкуронатдекарбоксилаза [ЕС:4.1.1.35], 19 - 2-дезоксисцилло-інозоа синтаза [ЕС:4.2.3.124], L-глютамін: 2-дезоксисцилло-інозоа амінотрансфераза [ЕС:2.6.1.100, ЕС:2.6.1.101], 2-дезоксисцилло-інозаміндегідрогеназа (SAM-залежна) [ЕС:1.1.99.38], 20 - 2-дезоксистрептамін N-ацетил-D-глюкозамінілтрансфераза [ЕС:2.4.1.283], 21 - паромамін D-ксилозилтрансфераза [ЕС:2.4.2.-], 22 - гентаміцин А2 дегідрогеназа [ЕС:1.1.1.-], піридоксальфосфатзалежна амінотрансфераза [ЕС:2.6.1.-], SAM-залежна 3"-N-метилтрансфераза [ЕС:2.1.1.-], кобаламін-залежна радикальна SAM метилтрансфераза [ЕС:2.1.1.-], 23 - гентаміцин-X2/G418 6'-оксидаза [ЕС: не вказано] і трансаміназа JI-20A/JI-20Ba [ЕС:2.6.1.-], 24 - фосфоттрансфераза GenP [ЕС: не вказано], 25 - трансаміназа JI-20A/JI-20Ba [ЕС:2.6.1.-], 26, 27 - піридоксаль-5'-фосфатзалежні амінотрансферази [ЕС: не вказано].



Рис.3.2. Схема біотрансформації крохмалю в гентаміцин [31-33]

## РОЗДІЛ 4

### ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

#### 4.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

*M. purpurea* GbKL202 є мезофільним нейтрофілом, через те, що оптимальний рівень рН становить 7,5, а температура – 33 °С, враховуючи що при даних умовах росте велика кількість мікроорганізмів, для зменшення ризику контамінації сторонньою мікрофлорою необхідно передбачити виробничий синтез в асептичних умовах [14].

Також для зменшення ризику контамінації процес синтезу гентаміцину слід проводити глибинним методом, та зважаючи що максимальний синтез антибіотика відбувається в стаціонарній фазі росту, синтез буде відбуватись з використанням періодичного способу культивування.

За своїми фізико-біологічними характеристиками наш продуцент є облигатним аеробом, тому для росту даного біологічного агента необхідно передбачити підготовку стерильного аераційного повітря. Визначившись що процес синтезу буде відбуватись глибинним методом для аерації нам необхідно встановити барботер та для інтенсифікації процесу аерації необхідно передбачити наявність перемішувального пристрою який буде встановлюватись над барботером.

Отже, підсумовуючи вищенаведену інформацію, процес виробничого синтезу гентаміцину культивуванням *M. purpurea* GbKL202, буде відбуватись в асептичних умовах, глибинним методом з постійною аерацією, періодичним способом.

На сьогодні на ринку біотехнологічного обладнання представлений великий спектр біологічних ферментерів, враховуючи що кожен виробник ферментерів може виробити обладнання на замовлення обирати серед конкретних типів ферментерів не є доцільно, через можливість встановлення всіх необхідних

					<i>НУХТ БТЕК 05.01.11 КР ПЗ</i>			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Козуб В.К.			<b>РОЗДІЛ 4 ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ</b>	Літ.	Арк.	Архивів
Компонентів на замовлення.							27	69
Реценз.						<i>Кафедра БТМ</i>		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Розглянувши спосіб культивування гентаміцину, нам необхідно передбачити наявність датчиків рівня рН, температури, кисню, також необхідно передбачити, щоб фермент був обладнаний рубашкою, для регулювання температури, барботером, мішалкою та ротаметром.

#### **4.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря**

*M. purpurea* GbKL202 є анаеробною культурою, отже для отримання посівного матеріалу та виробничого синтезу гентаміцину, необхідно передбачити приготування атмосферного очищеного повітря, для належного підтримування умов культивування аеробних. Для отримання готового аераційного стерильного стисненого повітря необхідно дотримуватися наступних етапів:

- забір атмосферного повітря (у найвищій точці Н = 23 м);
- очищення повітря на тканинних фільтрах від пилу;
- пропускання через компресор атмосферне повітря, де відбувається компресування його та збільшення температури до 200°C;
- подача повітря до теплообмінника з метою охолодження стисненого атмосферного повітря (для конденсації вологи);
- видалення зайвої вологи в ресивері;
- стабілізаційні заходи щодо тиску та нагрів повітря до 35°C;
- подача очищеного атмосферного повітря до головного фільтру, для належного очищення його до ступеню приблизно E=95%;
- очищення підготовленого атмосферного повітря в індивідуальних фільтрах, котрі передбачено встановлювати перед посівними апаратами та виробничим ферментером, ступінь очищення буде становити приблизно E=99,99%.

#### **4.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів**

Санімакс добре поєднується з холодною і гарячою водою при приготуванні в будь-якому співвідношенні відповідно до інструкції виробника. Водний отриманий розчин зазвичай є прозорим, має відмінні мийні технологічні властивості, легко змиваються та прибираються з оброблених ним поверхонь, не залишаючи розводів, залишків і нальоту, не фіксують органічні відповідні

забруднення на оброблюваних об'єктах; не мають шкідливого впливу на матеріали та компоненти оброблюваних та експлуатовуваних об'єктів, виготовлених з металів (в т.ч. алюмінію), скла та склоподібних елементів, полімеризованих матеріалів та гумових, не ушкоджує лакофарбове та гальванічне покриття. При експлуатуванні первинно робочих розчинів нагрітих, їхні антимікробні та мийно-дезінфікуючі властивості збільшуються та посилюються, можливо підвищувати мийочу дію за рахунок додавання кальцинованої соди (до 3%) [34].

Санімакс має бактерицидний (включаючи мікобактерії туберкульозу, *Listeria monocytogenes*, *P. aeruginosa*, *S.aureus* та *S.aureus* Methicillin Resistant, *Salmonella enteritidis*, *S. choleraesuis*, *Shigella dysenteriae* (в т.ч. вірусів гепатитів, герпесу, грипу, рота-, коронавірус, збудників «пташиного грипу»)), фунгіцидною (проти патогенних грибів та плісняви) та спороцидною дією [34].

IV клас небезпеки (малонебезпечна речовина за ГОСТ 12.1.007-76) при інгаляційному впливі парів. Не містить летких та екологічно неблагополучних компонентів. Дозволено для застосування у присутності пацієнтів, що не дратує органи дихання та ока при вільному випаровуванні [34].

До складу входить комплекс чотирьох четвертинних амонієвих сполук (не менше 50%) та допоміжних компонентів. рН  $7,5 \pm 1,5$  [34].

Засіб застосовується у вигляді водних робочих розчинів у концентрації від 0,04% до 0,25% препарату в залежності від сфери застосування, збудника та об'єктів обробки, виду забруднення. Нормовитрата отриманого робочого розчину для роботи становить 100 мл/м<sup>2</sup>. Способи належної обробки: ручний (протирання, зрошення, заношення, занурення, замочування, промочування, заповнення), автоматизований або ж механізований (в т.ч. у машинах для мийки, СІР-мийка), аерозольний [34].

Санікон – дієвий дезінфікуючий засіб 3 в 1. Ефективно проводить дезінфекцію, миття та дезодорує чим. Мийчий дезінфекційний засіб має також і фунгіцидні (щодо таких збудників кандидозів та дерматозів, дерматофітозів, а також грибів, пліснявих грибів *Aspergillus niger*), бактерицидні (включаючи

збудників туберкульозу) та віруліцидні (включаючи віруси гепатитів В, С, ВІЛ, герпесу, грипу, рота-, корона-, хантавірусів, вірусу «пташиного» грипу H5N1) властивості [35].

Дезінфекційний засіб Санікон призначений для санітарної обробки та профілактичної дезінфекції лабораторного, холодильного, торговельного та технологічного обладнання, обладнання, інвентарю, тарі, виробничої меблів. Використовується для миття та дезінфекції (санітарної обробки) різних поверхонь, у тому числі із застосуванням підлогомиїних машин [35].

Склад: комплекс четвертинний амонієвих сполук – 5,5% (алкілдиметилбензиламоній хлорид – 2,2%, октилдецилдиметиламоній хлорид – 1,65%, дидецилдиметиламоній хлорид – 0,825, діоктилдиметиламоній хлорид – 0,825) [35].

#### **4.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища**

Для отримання посівного матеріалу *Micromonospora purpurea* GbKL202 використовують наступне поживне середовище, г/л:

Глюкоза

Крохмаль

Соева макуха

Кукурудзяний крохмаль

Пептон

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

$\text{CaCO}_3$

Карбонат кальцію використовується в поживному середовищі для регулювання рівня рН тому готувати та стерилізувати даний компонент доцільно в окремому реакторі на всі стадії одержання посівного матеріалу.

*Поживне середовище для колб на качалці*

Для отримання посівного матеріалу в качалочних колбах використовується невелика кількість поживного середовища, тому оптимально проводити стерилізації в автоклаві. Склад поживного середовища необхідно поділити на композиції через різні температурні режими стерилізації певних компонентів:

*Композиція А:* глюкоза, крохмаль, кукурудзяний крохмаль, соєва макуха та пептон (0,05 МПа, 30 хв, 112 °С);

*Композиція Б:* амоній сульфат (0,15 МПа, 40 хв, 131 °С);

*Композиція В:* карбонат кальцію (0,15 МПа, 40 хв, 131 °С).

Глюкозу, крохмаль, кукурудзяний крохмаль, соєву макуху та пептон об'єднують в одну композиції, через термолабільність даних компонентів, крохмаль та кукурудзяний крохмаль перед стерилізацією необхідно розпарити тримаючи на водяній бані впродовж 30 хв, при температурі 80 °С. Після розпарення до колби вносять інші компоненти та другу частину води колбу закривають ватно-марлевым корком та поміщають в автоклав на 30 хв при 112 °С.

Амоній сульфат стерилізують окремо від термолабільних речовин через більш жорсткі умови стерилізації, сіль поміщають в колбу та доливають воду закривають ватно-марлевым корком та поміщають в автоклав на 40 хв при 131 °С.

*Поживне середовище для інокуляторів та посівних апаратів*

Під час приготування та стерилізації поживного середовища на стадіях отримання посівного матеріалу в інокуляторах та посівних апаратах, поділ компонентів та умови стерилізації будуть однакові.

*Композиція А:* глюкоза, крохмаль, кукурудзяний крохмаль, соєва макуха та пептон (0,05 МПа, 30 хв, 112 °С);

*Композиція Б:* амоній сульфат (0,15 МПа, 40 хв, 131 °С);

*Композиція В:* карбонат кальцію (0,15 МПа, 40 хв, 131 °С).

Композицію А готують в реакторах спочатку в реактор вносять крохмаль та кукурудзяний крохмаль, для розпарювання, в сорочку реактора подають глуху пару для нагрівання розчину до 80 °С протягом 30 хв. Після розпарення вносять інші компоненти та іншу частину води, стерилізацію проводять в реакторі гострою парою.

Амоній сульфат готують в невеликих реакторах та переносять після розчинення в інокулятор та посівні апарати куди вносять іншу частину води та проводять стерилізацію гострою парою.

### *Виробниче культивування*

Для синтезу гентаміцину використовують наступне поживне середовище,

г/л:

Крохмаль;

Соева макуха;

Кукурудзяний крохмаль;

Пептон;

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ;

$\text{CoCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ;

$\text{CaCO}_3$ .

Під час синтезу гентаміцину в ферментері об'ємом  $20 \text{ м}^3$  використовується великий об'єм поживного середовища, тому процес стерилізації доцільно провести в установці безперервної стерилізації з продуктивністю  $10 \text{ м}^3/\text{год}$ .

Отже, процес приготування буде відбуватись в реакторі об'ємом  $16 \text{ м}^3$  спочатку в реактор вносять  $1/10$  частини необхідної води та компоненти які потрібно розпарити, в сорочку реактора подають глуху пару та протягом 30 хв проводять розпарювання. Потім вносять всі інші компоненти та іншу частину води, перемішують для рівномірного розподілення речовин, та подають в УБС де відбувається стерилізації протягом 5 хв при температурі  $131 \text{ }^\circ\text{C}$ .

## РОЗДІЛ 5

### СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Обладнання для біотехнологічного виробництва гентаміцину показано в таблиці 5.1. Номери позицій відповідають апаратурній схемі (див. *графічну частину роботи*)

*Таблиця 5.1*

#### Специфікація обладнання для виробництва гентаміцину

Позиція	Назва	Кількість	Технічна характеристика
ПЗ-1	Повітрозабірник	1	Обладнаний металевою сіткою, яка сприяє вилученню забруднювальних частинок
Ф-2	Фільтр грубого очищення	1	Фільтр сітчастий («Технофільтр», Україна), фільтруючий матеріал – гофровані ткани сітки з високолегованих сталей, корпус – із високолегованої сталі. Продуктивність – до 1100 м <sup>3</sup> /год, стартовий опір – 50 Па. Клас очищення – G2/G3 <sup>1</sup> .
К-3	Компресор	1	Компресор гвинтовий Tidy 50 («Dalgakiran», Україна). Максимальний тиск – 7 бар, потужність – 37 кВт, продуктивність – до 6400 л/хв <sup>2</sup> .
Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Кожухотрубний теплообмінник ОРЕКС-3-СТ («ОПЕКС», Україна) з нержавіючої сталі. Робочий тиск – від 6 до 40 бар <sup>3</sup> .
Р-5	Ресивер	1	Ресивер («Dalgakiran», Україна) з нержавіючої сталі об'ємом 500 л <sup>4</sup> .
Т-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Паровий калорифер з нержавіючої сталі («ОПЕКС», Україна), продуктивність за повітрям – до 400 л/хв <sup>5</sup> .
Ф-7	Фільтр тонкого очищення	1	Фільтр кишенькового типу («Технофільтр», Україна), фільтруючий матеріал – поліестер з мікрОВОЛОКНОМ, корпус – із оцинкованої або нержавіючої сталі. Продуктивність – до 800 м <sup>3</sup> /год, стартовий опір – 55 Па. Клас очищення: G4/F9 <sup>6</sup> .

					<b>НУХТ БТЕК 05.01.11 КР ПЗ</b>			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Козуб В.К.			<b>РОЗДІЛ 5 СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ</b>	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Удимович В.М.					33	69
Реценз.						<b>Кафедра БТМ</b>		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

P-8 P-11	Реактор-змішувач	2	Реактор сталевий об'ємом 5 л («Амаг», Індія) з паровою сорочкою та перемішувачим пристроєм. Діаметр – 0,152 м, висота – 0,310 м <sup>7</sup> .
P-10	Реактор-змішувач	1	Реактор сталевий об'ємом 40 л («Єврохіммаш», Україна) з паровою сорочкою та лопатевою мішалкою. Діаметр – 0,4 м, висота – 0,75 м, частота обертання мішалки – 100 об/хв, споживана потужність – 0,75 кВт <sup>8</sup> .
P-12	Реактор-змішувач	1	Реактор сталевий об'ємом 10 л («Єврохіммаш», Україна) з паровою сорочкою та лопатевою мішалкою. Діаметр – 0,25 м, висота – 0,5 м, частота обертання мішалки – 100 об/хв, споживана потужність – 0,75 кВт <sup>8</sup> .
P-15	Реактор-змішувач	1	Реактор сталевий об'ємом 16 м <sup>3</sup> («Єврохіммаш», Україна) з паровою сорочкою та лопатевою мішалкою. Діаметр – 2,2 м, висота – 5,95 м, частота обертання мішалки – 100 об/хв, споживана потужність – 0,75 кВт <sup>8</sup> .
H-16	Насос перистальтичний	1	Насос перистальтичний Delasco-Z («Logrus», Україна). Продуктивність – 20 м <sup>3</sup> /год <sup>9</sup> .
УБС-17	Установка безперервної стерилізації	1	Установка безперервної стерилізації продуктивністю 15 м <sup>3</sup> /год («EASTBIO», Китай) <sup>10</sup> .
P-19 P-29	Реактор-змішувач	2	Реактор сталевий об'ємом 400 л («Єврохіммаш», Україна) з паровою сорочкою та лопатевою мішалкою. Діаметр – 0,8 м, висота – 2,55 м, частота обертання мішалки – 100 об/хв, споживана потужність – 0,75 кВт <sup>8</sup> .
H-20 H-30	Насос перистальтичний	2	Насос перистальтичний Delasco-PMA («Logrus», Україна). Продуктивність – 400 л/год <sup>11</sup> .
ФІ-21 ФІ-25 ФІ-31 ФІ-33	Фільтр індивідуальний	4	Фільтр НЕРА («Технофільтр», Україна), фільтруючий матеріал – міроскловолокно, корпус – із пластику, алюмінію, оцинкованої або нержавіючої сталі. Продуктивність – до 1000 м <sup>3</sup> /год, стартовий опір – 250 Па, кінцевий опір – 650 Па. Клас очищення: E10-12/H13/H14/U15-17 <sup>12</sup> .

ІН-22	Інокулятор	1	Ферментатор об'ємом 20 л («Solaris Biotech», Італія) з нержавіючої сталі з паровою сорочкою, барботером, перемішувачем, ротаметром, датчиками рН і температури <sup>13</sup> .
Н-23	Насос перистальтичний	1	Насос перистальтичний G1016-1 («GROTHEN», Китай). Продуктивність – 90 л/год [14].
ПА-26	Інокулятор	1	Ферментатор об'ємом 200 л («Solaris Biotech», Італія) з нержавіючої сталі з паровою сорочкою, барботером, перемішувачем, ротаметром, датчиками рН і температури <sup>13</sup> .
ПА-32	Інокулятор	1	Ферментер об'ємом 2 м <sup>3</sup> («Solaris Biotech», Італія) з нержавіючої сталі з паровою сорочкою, барботером, перемішувачем, ротаметром, датчиками рН і температури <sup>13</sup> .
Фр-34	Ферментер	1	Ферментер об'ємом 20 м <sup>3</sup> («Solaris Biotech», Італія) з нержавіючої сталі з паровою сорочкою, барботером, перемішувачем, ротаметром, датчиками рН і температури <sup>13</sup> .

Примітка: 1 - <http://www.technofilter.com.ua/filtry-vozdushnyye/filtr-vozdushnyy-setchatyy>, 2 - <https://dalgakiran.ua/ru/products/kompressori-serii-tidy-3-50/>, 3 - <https://opeks.ua/ru/teploobmennik-dlya-bassejna-opeks-3-ph500-3/>, 4 - <http://dalgakiran.su/products/compressors/vozdushnie-resiveri>, 5 - <https://opeks.ua/ua/postavka-kalorifera-i-parovogo-kozhuxotrubnogo-kondensatora-dlya-pidigrivu-duttyevogo-povitrya/>, 6 - <https://www.technofilter.com.ua/types/pocket/>, 7 - <https://www.directindustry.com/prod/amar-equipment-pvt-ltd/product-157764-1612857.html>, 8 - [http://euromash.kiev.ua/ua/aparati\\_perem\\_ustroystvom\\_ua.php](http://euromash.kiev.ua/ua/aparati_perem_ustroystvom_ua.php), 9 - <https://flagma.ua/peristalticheskiy-nasos-rsm-delasco-z-o1714309.html>, 10 - <http://www.eastbio.net/products/4004.html>, 11 - <http://logrus.ua/ru/peristaltic-pump-pma/>, 12 - <https://www.technofilter.com.ua/types/hepa/>, 13 - [https://www.sartorius.com/en/products/fermentation-bioreactors?utm\\_source=google&utm\\_medium=cpc&utm\\_campaign=ru\\_ru\\_search\\_bioreactor/fermentation\\_No\\_nbranded&gclid=CjwKCAiAuOieBhAIEiwAgjCvcUwDJ6xigYAi8GVZWjNj9xir\\_Cm3RBj9fiaCasf93O5fD\\_SOLtHhIRoCau8QAvD\\_BwE](https://www.sartorius.com/en/products/fermentation-bioreactors?utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=ru_ru_search_bioreactor/fermentation_No_nbranded&gclid=CjwKCAiAuOieBhAIEiwAgjCvcUwDJ6xigYAi8GVZWjNj9xir_Cm3RBj9fiaCasf93O5fD_SOLtHhIRoCau8QAvD_BwE), 14 - <https://thermolab.net.ua/ua/p1425450164-nasos-peristalticheskiy-grothen.html>

## РОЗДІЛ 6

### ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

В технологічній схемі виробництва гентаміцину культивуванням *M. purpurea* GbKL202 наведено допоміжні роботи (підготовка повітря для аерації, приготування та стерилізація карбонату кальцію та поживного середовища) і технологічний процес (отримання посівного матеріалу і виробничий синтез гентаміцину). Технологічна та апаратурна схеми процесу виробництва гентаміцину наведені в графічній частині роботи.

**ДР 1. Підготовка повітря для аерації під час вирощування посівного матеріалу та виробничого біосинтезу**

#### **ДР 1.1. Забір повітря**

Атмосферне для очищення повітря за допомогою встановленої вертикальної труби з повітрязабірничком для забору на висоті приблизно 23 м.

#### **ДР 1.2. Грубе очищення повітря**

Отримане забором повітря відправляють на фільтр спочатку грубого очищення, для відокремлення та очищення великих частинок пилу та бруду розміром в межах 1 мкм, після очищення фільтру ступінь відповідного очищення повітря становитиме приблизно 90%.

#### **ДР 1.3. Накопичення та компресування повітря**

Після проведення грубого очищення атмосферного повітря, його перенаправляють до компресору для стиснення до тиску приблизно 0,5 МПа з збільшенням температури повітря до більш ніж 200°C.

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

Після компресування повітря, необхідно видалити надлишкову вологу, тому його направляють в теплообмінник де відбувається охолодження до 20 °C з подальшим направленням до ресиверу де видаляється зайва волога (W=60%).

					<i>НУХТ БТЕК 05.01.11 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<b>РОЗДІЛ 6 ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ</b>	<i>Лім.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розроб.</i>		<i>Козуб В.К.</i>					36	69
<i>Перевір.</i>		<i>Удимович В.М.</i>						
<i>Реценз.</i>								
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						
						<i>Кафедра БТМ</i>		

### ***ДР 1.5. Нагрів повітря***

Видаливши надлишкову вологу повітря подають в теплообмінник для нагрівання його до 35 °С, з метою зменшення ймовірності утворення конденсату фільтрах тонкого та індивідуального очищення ( $W=50\%$ ).

### ***ДР 1.6. Тонке очищення повітря***

Нагрівши повітря, його направляють на головний фільтр очищення, після проходження якого ступінь очищення становить  $E=95\%$ .

### ***ДР 1.7. Очищення повітря на індивідуальних фільтрах***

Перед початком проведення аерації поживного середовища отримане повітря пропускають через фільтри індивідуального належного очищення для досягнення мети досягнувши ступеня очищення приблизно  $E=99,995\%$ .

## ***ДР 2. Приготування та стерилізація карбонату кальцію***

***ДР 2.1. Приготування та стерилізація карбонату кальцію на стадії одержання посівного матеріалу***

Для приготування посівного матеріалу потрібно приготувати та простерилізувати 2,848 кг кальцію карбонату. В реактор об'ємом 400 л поміщають сформовану за допомогою технологічних ваг наважку карбонату кальцію масою 933,24 г, далі через дозатор вносять 258,9 л води питної та вмикають мішалку (50 об/хв) та подають в сорочку реактора глуху пару для досягнення температури 50 °С. Після суспендування проводять стерилізацію гострою парою впродовж 40 хв при 131 °С (0,15 МПа).

## ***ДР 3. Приготування та стерилізація поживного середовища***

***ДР 3.1. Приготування та стерилізація поживного середовища для отримання посівного матеріалу в колбах на качалці***

Під час отримання посівного матеріалу в колбах на качалці потрібно приготувати 1,15 л поживного середовища. В попередньому розділі (див. розділ 4) нами було виконано поділ на композиції з врахуванням температурних режимів стерилізації кожного компонента. Варто зазначити, що ми передбачаємо заварювання звичайного та кукурудзяного крохмалю. Поділ компонентів на композиції та їх кількісний вміст наведено в табл. 6.1.

**Поділ компонентів на композиції для стерилізації поживного середовища на стадію вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці**

Компоненти поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 1,15 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, л
Глюкоза	10	11,5	А	0,3
Крохмаль	20	23		
Соева макуха	15	17,25		
Кукурудзяний крохмаль	10	11,5		
Пептон	5	5,75		
Вода		300 (мл)	Б	0,62
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1	1,15		
Вода		620 (мл)	В	0,23
CaCO <sub>3</sub>	2	2,3		
Вода		230 (мл)		

***ДР 3.1.1. Приготування та стерилізація композиції А***

На технічних вагах важать 23 г крохмалю та 11,5 г кукурудзяного крохмалю зважені компоненти поміщають в колбу об'ємом 1 л вносять 150 мл води та на водяній бані розпарюють компоненти протягом 30 хв при 80 °С. Після розпарення в колбу поміщають зважені на технічних вагах 11,5 г глюкози 15 г соєвої макухи та 5,75 г пептону та вносять попередньо відміряної за допомогою мірного циліндра питної води в кількості 150 мл. Вміст колби перемішують належно до абсолютного повного розчинення, закривають корком ватно-марлевым і розташовують в автоклаві, де протягом періоду 30 хв проводять стерилізацію за температури 112 °С (0,05 МПа).

***ДР 3.1.2. Приготування та стерилізація композиції Б***

На технічних вагах відважують приблизно 1,15 г амонію сульфату, в подальшому відважену сіль переносять до колби об'ємом 2 л та додають попередньо відміряну за допомогою підготовлено мірного циліндра питну води в кількості 620 мл. Вміст виробничої колби перемішують до абсолютно повного

розчинення, закривають корком ватно-марлевым і розташовують в автоклаві, де протягом 40 хв проводять стерилізацію при 131 °С (0,15 МПа).

**ДР 3.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для отримання посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 20 л**

Під час отримання та накопичення належного посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 20 л необхідно підготувати та приготувати близько 12,73 л поживного середовища тому, що стерилізаційні заходи проходять та відбуватимуться гострою парою, отже необхідно зменшити об'єм внесеної води через потенційне і передбачуваним утворенням конденсату (10%). Отже, кількість води яка потрібна для приготування поживного середовища буде становити приблизно 11,8 л. Розподіл відповідних компонентів на композиції та їхній кількісний вміст наведено в табл. 6.2.

*Таблиця 6.2*

**Поділ компонентів на композиції для стерилізації поживного середовища на стадію вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 20 л**

Компоненти поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 12,73 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, л
Глюкоза	10	127,3	А	3
Крохмаль	20	254,6		
Соева макуха	15	190,95		
Кукурудзяний крохмаль	10	127,3		
Пептон	5	63,65		
Вода		3 (л)		
Конденсат		0,3 (л)	Б	0,3
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1	12,73		
Вода		6,26 (л)		
Конденсат		0,63 (л)	В	0,63
СаСО <sub>3</sub>	2	25,46		
Вода		2,54 (л)		

**ДР 3.2.1. Приготування та стерилізація композиції А**

На технічних вагах важать 254,6 г крохмалю та 127,3 г кукурудзяного крохмалю зважені компоненти поміщають в реактор об'ємом 5 л вносять 2 л

питної води та в сорочку реактора подають глуху пару та вмикають перемішувач (50 об/хв) для розпарювання компонентів протягом 30 хв при 80 °С. Після розпарення в реактор поміщають зважені на технічних вагах 127,3 г глюкози, 190,95 г соєвої макухи та 63,65 г пептону та вносять попередньо відміряної за допомогою мірного циліндра питної води в кількості 1 л, вмикають перемішувач (50 об/хв) для рівномірного розподілу компонентів, та протягом 30 хв проводять стерилізацію гострою парою при 112 °С (0,05 МПа).

### ***ДР 3.2.2. Приготування та стерилізація композиції Б***

На технічних вагах відважують приблизно 12,73 г амонію сульфату, зважену сіль поміщають в колбу об'ємом 2 л та вносять попередньо відміряної за допомогою мірного циліндра питної води в кількості 1,26 л. Вміст колби перемішують до повного розчинення, після розчинення солі розчин подають в посівний апарат об'ємом 20 л та за допомогою дозатора вносять 5 л питної води, вмикають перемішувач (50 об/хв) для рівномірного розподілу компонентів, та протягом 40 хв проводять стерилізацію гострою парою при 131 °С (0,15 МПа).

### ***ДР 3.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для отримання посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 200 л***

Під час отримання посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 200 л потрібно приготувати 133,5 л поживного середовища, так як стерилізація буде відбуватись гострою парою необхідно зменшити кількість внесеної води через утворення конденсату (10%). Отже, кількість води яка необхідна для приготування поживного середовища становить 123,8 л. Поділ компонентів на композиції та їх кількісний вміст наведено в табл. 6.3.

*Таблиця 6.3*

### **Поділ компонентів на композиції для стерилізації поживного середовища на стадію вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 200 л**

Компоненти поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 133,5 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, л
Глюкоза	10	1 335	А	30

Крохмаль	20	2 670		
Соева макуха	15	2 002,5		
Кукурудзяний крохмаль	10	1 335		
Пептон	5	557,5		
Вода		30 (л)		
Конденсат		3 (л)		3

*Закінчення табл. 6.3*

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1	133,5	<b>Б</b>	67,1
Вода		67,15 (л)		
Конденсат		6,72 (л)		
CaCO <sub>3</sub>	2	267	<b>В</b>	26,7
Вода		26,7 (л)		

### ***ДР 3.3.1. Приготування та стерилізація композиції А***

На технічних вагах важать 2,67 кг крохмалю та 1,335 кг кукурудзяного крохмалю зважені компоненти поміщають в реактор об'ємом 50 л вносять 15 л питної води та в сорочку реактора подають глуху пару та вмикають перемішувач (50 об/хв) для розпарювання компонентів протягом 30 хв при 80 °С. Після розпарення в реактор поміщають зважені на технічних вагах 1,335 кг глюкози, 2,0025 кг соєвої макухи та 0,5575 кг пептону та дозатором вносять питну воду в кількості 15 л, вмикають перемішувач (50 об/хв) для рівномірного розподілу компонентів, та протягом 30 хв проводять стерилізацію гострою парою при 112 °С (0,05 МПа).

### ***ДР 3.3.2. Приготування та стерилізація композиції Б***

На технічних вагах важать 133,5 г амонію сульфату, зважену сіль поміщають в колбу об'ємом 5 л та вносять попередньо відміряної за допомогою мірного циліндра питної води в кількості 3,1 л. Вміст колби перемішують до повного розчинення, після розчинення солі розчин подають в посівний апарат об'ємом 200 л та за допомогою дозатора вносять 64 л питної води, вмикають перемішувач (50 об/хв) для рівномірного розподілу компонентів, та протягом 40 хв проводять стерилізацію гострою парою при 131 °С (0,15 МПа).

***ДР 3.4. Приготування та стерилізація поживного середовища для отримання посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 2 м<sup>3</sup>***

Під час отримання посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 2 м<sup>3</sup> потрібно приготувати 1 276,8 л поживного середовища, так як стерилізація буде відбуватись гострою парою необхідно зменшити кількість внесеної води через утворення конденсату (10%). Отже, кількість води яка необхідна для приготування поживного середовища становить 1 183,96 л. Поділ компонентів на композиції та їх кількісний вміст наведено в табл. 6.4.

Таблиця 6.4

**Поділ компонентів на композиції для стерилізації поживного середовища на стадію вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 2 м<sup>3</sup>**

Компоненти поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 1 276,8 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, л
Глюкоза	10	12 768	А	300
Крохмаль	20	25 536		
Соева макуха	15	19 152		
Кукурудзяний крохмаль	10	12 768		
Пептон	5	6 384		
Вода		300 (л)		
Конденсат		30 (л)		30
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1	1 276,8	Б	628,6
Вода		628,6 (л)		
Конденсат		62,8 (л)		62,8
СаСО <sub>3</sub>	2	2 553,6	В	255,36
Вода		255,36 (л)		

#### **ДР 3.4.1. Приготування та стерилізація композиції А**

Об'ємно-ваговим дозатором важать 25,536 кг крохмалю та 12,768 кг кукурудзяного крохмалю зважені компоненти поміщають в реактор об'ємом 500 л, дозатором вносять 150 л питної води та в сорочку реактора подають глуху пару та вмикають перемішуючий пристрій (50 об/хв) для розпарювання компонентів протягом 30 хв при 80 °С. Після розпарення в реактор поміщають зважені об'ємно-ваговим дозатором 12,768 кг глюкози, 19,152 кг соєвої макухи та 6,384 кг пептону та дозатором вносять питну воду в кількості 150 л, вмикають

перемішувачий пристрій (50 об/хв) для рівномірного розподілу компонентів, та протягом 30 хв проводять стерилізацію гострою парою при 112 °С (0,05 МПа).

#### ***ДР 3.4.2. Приготування та стерилізація композиції Б***

На технічних вагах важать 1 276,8 г амонію сульфату, зважену сіль поміщають в реактор об'ємом 10 л та дозатором вносять питну воду в кількості 8,6 л. Вмикають перемішувачий пристрій (50 об/хв), після розчинення солі розчин подають в посівний апарат об'ємом 2 м<sup>3</sup> та за допомогою дозатора вносять 620 л питної води, вмикають перемішувачий пристрій (50 об/хв) для рівномірного розподілу компоненту, та протягом 40 хв проводять стерилізацію гострою парою при 131 °С (0,15 МПа).

#### ***ДР 3.5. Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу гентаміцину в ферментері об'ємом 20 м<sup>3</sup>***

Під час синтезу гентаміцину в ферментері об'ємом 20 м<sup>3</sup> потрібно приготувати 12 219,4 л поживного середовища, так як стерилізація буде відбуватись гострою парою в установці безперервної стерилізації необхідно зменшити кількість внесеної води через утворення конденсату (20%). Отже, кількість води яка необхідна для приготування поживного середовища становить 10,183 м<sup>3</sup>. Поділ компонентів на композиції та їх кількісний вміст наведено в табл. 6.5.

*Таблиця 6.5*

#### **Поділ компонентів на композиції для стерилізації поживного середовища на стадію виробничого біосинтезу гентаміцину в ферментері об'ємом 20 м<sup>3</sup>**

Компоненти поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 12 219,4 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, л
Крохмаль	40	488 776	А	10 183
Соева макуха	25	305 485		
Кукурудзяний крохмаль	10	122 194		
Пептон	5	61 097		
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1	12 219,4		
СоСl <sub>2</sub> · Н <sub>2</sub> О	0,01	122,194		

CaCO <sub>3</sub>	5	61 097		
Вода		10 183 (л)		
Конденсат		2 036,4 (л)		2 036,4

### ***ДР 3.5.1. Приготування композиції А***

Об'ємно-ваговим дозатором важать 488,7766 кг крохмалю та 122,194 кг кукурудзяного крохмалю зважені компоненти поміщають в реактор об'ємом 16 м<sup>3</sup>, дозатором вносять 1,183 м<sup>3</sup> питної води та в сорочку реактора подають глуху пару та вмикають перемішуючий пристрій (50 об/хв) для розпарювання компонентів протягом 30 хв при 80 °С. Після розпарення в реактор поміщають зважені об'ємно-ваговим дозатором 305,485 кг соєвої макухи, 61,097 кг пептону, 12,2194 кг амонію сульфату, 61,097 карбонату кальцію, 0,122 кг хлориду кобальту та дозатором вносять питну воду в кількості 9 м<sup>3</sup>, вмикають перемішуючий пристрій (50 об/хв) для рівномірного розподілу компонентів.

### ***ДР 3.5.2. Стерилізація композиції А в установці безперервної стерилізації***

Приготований розчин компонентів (від ДР 3.5.1) відцентровим насосом подають в установку безперервної стерилізації в якій проводиться стерилізація поживного середовища гострою парою впродовж 5 хв при 131 °С (0,15 МПа).

## ***ТП 4. Отримання посівного матеріалу***

### ***ТП 4.1. Підтримання колекційної культури***

Колекційну музейну культуру *M. purpurea* GbKL202 зберігають на постійній основі на скошеному м'ясо-пептонному агарі (МПА) при температурі 3±1 °С. З інтервалом у кожні 3 – 4 місяці фахівці проводять пересіви музейної культури виключно в строго асептичних умовах.

### ***ТП 4.2. Отримання робочої культури***

Для отримання відповідних ізольованих колоній у виключних строгих асептичних умовах, бактеріологічною мікробіологічною петлею культуру агента *M. purpurea* GbKL202 розсівають методом виснажувального штриха на відповідних чашках Петрі з підготовленим агаризованим м'ясо-пептонним

середовищем. Чешки Петрі після розсіву встановлюють в автоматизований термостат та інкубують протягом 28 год при  $37\pm 1$  °C.

#### ***ТП 4.3. Вирощування посівного матеріалу на агаризованих поживних середовищах***

Отриманні ізольовані колонії біологічного агента, (від ТП 4.2), у відповідних асептичних умовах, пересівають бактеріологічною мікробіологічною петлею до пробірок з відповідним агаризованим м'ясо-пептонним середовищем (для засіву однієї пробірки використовують одну ізольовану колонію). Для пересіву в подальшому відбирають колонії, які знаходяться на відстані не менше ніж 1 см одне від одного. Інкубують у відповідному термостаті при  $37\pm 1$  °C протягом 28 год.

#### ***ТП 4.4. Отримання посівного матеріалу в колбах на качалці***

У належних асептичних умовах до підготовленої колби зі стерильною композицією Б вносять 300 мл стерильної композиції А (від ДР 3.1.1) та 230 мл стерильного карбонату кальцію (від ДР 2.1) вміст колби потім планомірно перемішують для рівномірного і належного розподілу компонентів та розливають по приблизно 128 мл в дев'ять підготовлених стерильних качалочних колб зі стандартним об'ємом 750 мл. В належних асептичних умовах до підготовленої пробірки з робочою вирощеною культурою *M. purpurea* GbKL202 додають близько 5 мл фізіологічного розчину для належного суспендування клітин. Одержану потім суспензію за допомогою піпетки вносять до колби з отриманим стерильним і підготовленим поживним середовищем, для однієї колби використовують підготовлену суспензію отриману з однієї пробірки.

Посівний в подальшому матеріал вирощують у відповідних колбах на качалці (100 об/хв) протягом приблизно 28 год при належній температурі  $37\pm 1$  °C. По завершенню технологічного процесу культивування відбирають належну пробу для проведення відповідного мікробіологічного контролю та визначення відповідності концентрації біомаси ( $C_{\text{біомаси}} = 5$  г/л). Отриманий посівний матеріал з 9 колб в асептичних умовах об'єднують в єдиній стерильній засівній колбі об'ємом 2 л.

#### ***ТП 4.5. Отримання посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 20 л***

В асептичних умовах в інокулятор об'ємом 20 л з стерильною композицією Б з реактора об'ємом 5 л самоплином вносять стерильну композицію А (від ДР 3.2.1) та перистальтичним насосом стерильний розчин карбонату кальцію об'ємом 2,54 л (від ДР 2.1), помістивши компоненти поживного середовища вмикають перемішуючий пристрій (50 об/хв) для рівномірного розподілу компонентів. Після перемішування вносять посівний матеріал (від ТП 4.4).

Посівний матеріал вирощують в інокуляторі протягом 28 год при 30 °С, з постійним перемішуванням (100 об/хв) та з швидкістю подачі стерильного аераційного повітря 0,5 л/(л·хв). Впродовж культивування кожні 4 год, а також по завершенню культивування відбирають пробу для проведення мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси ( $C_{\text{біомаси}} = 5 \text{ г/л}$ ).

#### ***ТП 4.6. Отримання посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 200 л***

До посівного апарату об'ємом 200 л з стерильною композицією Б з реактора об'ємом 50 л самоплином вносять стерильну композицію А (від ДР 3.3.1) та перистальтичним насосом подають стерильний розчин карбонату кальцію об'ємом 26,7 л (від ДР 2.1), подавши всі компоненти необхідного поживного середовища у відповідному посівному апараті, вмикають обертаючий перемішуючий пристрій (50 об/хв) для їх рівномірного належного розподілу. Після достатнього перемішування за допомогою відповідного перистальтичного насоса переносять отриманий посівний матеріал (від ТП 4.5).

Посівний матеріал належним чином вирощують у відповідному посівному апараті протягом 28 год за температури  $37 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ , з постійним перемішуванням (100 об/хв) та з швидкістю подачі стерильного аераційного повітря 0,5 л/(л·хв). Протягом всього часу культивування кожні 4 год, а також по завершенню відповідного культивування відбирають пробу для належного проведення відповідного мікробіологічного контролю та визначення належної концентрації біомаси ( $C_{\text{біомаси}} = 5 \text{ г/л}$ ).

#### **ТП 4.7. Отримання посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 2 м<sup>3</sup>**

До посівного апарату об'ємом 2 м<sup>3</sup> з стерильною композицією Б з реактора 500 л перистальтичним насосом вносять стерильну композицію А (від ДР 3.4.1) та перистальтичним насосом подають стерильний розчин карбонату кальцію об'ємом 255,36 л (від ДР 2.1), додавши всі компоненти відповідного поживного середовища в технологічному посівному апараті та вмикають перемішуючий пристрій (50 об/хв) для їх рівномірного розподілу. Після перемішування за допомогою труби перетискування вносять посівний матеріал (від ТП 4.6).

Посівний матеріал вирощують в посівному апараті протягом 28 год при 37 °С, з постійним перемішуванням (100 об/хв) та з швидкістю рівномірної подачі стерильного підготовленого аераційного повітря 0,5 л/(л·хв). Протягом всього часу культивування приблизно кожні 4 год, а також по завершенню технологічного процесу культивування відбирають необхідну пробу для проведення належного мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси ( $C_{\text{біомаси}} = 5 \text{ г/л}$ ).

#### **ТП 5. Виробничий синтез гентаміцину**

##### **ТП 5.1. Виробничий біосинтез гентаміцину в ферментері об'ємом 20 м<sup>3</sup>**

В ферментер об'ємом 20 м<sup>3</sup> подають стерильною композицією А від установки безперервної стерилізації, та за допомогою труби перетискування вносять посівний матеріал (від ТП 4.7).

Вирощування *Micromonospora purpurea* GbKL202 відбувається до досягнення кінцевої концентрації біомаси (10 г/л) та концентрації гентаміцину (780,39 мг/л), впродовж 124 год при температурі 33 °С з постійним перемішуванням (100 об/хв) та з швидкістю подачі стерильного аераційного повітря 0,5 л/(л·хв).

Впродовж виробничого синтезу кожні 8 год, а також по завершенню культивування, відбирають проби культуральної рідини для визначення концентрації джерел вуглецю та азоту, гентаміцину та біомаси для проведення мікробіологічного контролю.

## РОЗДІЛ 7

### КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

В стадії біосинтезу періодично контролюються наступні параметри: концентрація біомаси, джерела вуглецю та азоту, антибіотична активність.

Також здійснюється поетапний контроль таких параметрів як: мікробіологічний контроль, вміст вуглецю та азоту в середовищі.

#### 7.1. Карта постадійного контролю доферментаційних процесів

*Таблиця 7.1*

#### Карта постадійного контролю

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
1	2	3	4	5
Кх 1.1.1 Приготування розчину каустичної соди	Розчин каустичної соди	Хімічний метод Перевірка концентрації	Після приготування розчину	Концентрація розчину 2%
Кх 1.1.2 Приготування розчину Хлораміну	Розчин хлораміну	Хімічний метод Перевірка концентрації	Після приготування розчину	Концентрація розчину 0,5%
Кх 1.1.3 Приготування розчину Делаксону	Розчин Делаксону	Хімічний метод Перевірка концентрації	Після приготування розчину	Концентрація розчину 0,5%
Кх 1.1.4 Приготування розчину Гембару	Розчин Гембару	Хімічний метод Перевірка концентрації	Після приготування розчину	Концентрація розчину 0,5%
Кт 1.2.1 Щоденне прибирання	Підлога, чистота	Візуальний огляд	Щоденно, після миття	Чисте приміщення, відсутність бруду та пилу
Кт 1.2.2 Генеральне прибирання	Поверхні обладнання, стіни, двері, вікна, чистота	Змиви стерильними тампонами	Раз на місяць під час виробничого процесу після дез.обробки	Чисте приміщення $\tau = 30$ хв

<b>НУХТ БТЕК 05.01.11 КР ПЗ</b>				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.		Козуб В.К.		
Перевір.		Удимович В.М.		
Реценз.				
Н. Контр.				
Затверд.		Стабніков В.П.		
<b>РОЗДІЛ 7 КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА</b>			Лім.	Арк.
				48
			<b>Кафедра БТМ</b>	
			Аркушів	69

Кт 1.3.1 Миття обладнання	Обладнання та комунікації, чистота	Термометр технічний, манометр технічний, годинник	Під час проведення операції	$t = 45\text{ }^{\circ}\text{C}$ $\tau = 15\text{-}20\text{ хв}$
Кт 1.3.2 Ополіскування	Внутрішня та зовнішня поверхня обладнання та комунікації	Термометр технічний, годинник	Під час операції	$t = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ $\tau = 20\text{ хв}$
Кт 1.3.3 Технічний огляд	Обладнання, інвентар, комунікації	Візуальний огляд	Під час технічного огляду	Відсутність несправностей
Кт 1.3.4 Перевірка на герметичність	Герметичність роботи обладнання, час роботи, тиск	Течієшукач, манометр технічний, годинник	Постійно під час визначення	$p = 0,02\text{ МПа}$ $\tau = 1\text{ год}$ відсутність неущільнень
Кт 1.3.5 Стерилізація	Обладнання та комунікації	Манометр технічний, термометр	Температура та тиск визначаються безперервно під час стерилізації	$t = 125 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ $\tau = 40\text{ хв}$ $p = 0,2\text{ МПа}$
ДР 1.1 Забір атмосферного повітря	Висота повітрязбірної труби	Висотомір	Перманентно	$H = 23\text{ м}$
ДР 1.2 Грубе очищення повітря	Попереднє очищення повітря, ступінь очищення	Перевірка ступеня очищення	Під час очистки повітря в фільтрі грубого очищення	$E = 90\%$
ДР 1.3 Компресування повітря	Стискання повітря	Манометр технічний Термометр	Під час компресування повітря	$P = 0,5\text{ МПа}$ $t = 200\text{ }^{\circ}\text{C}$
ДР 1.4 Охолодження повітря та видалення вологи	Охолодження повітря, температура	Термометр технічний	Після охолодження повітря	$t = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ $W = 60\%$
ДР 1.5 Нагрівання повітря	Нагріє повітря, температура	Термометр технічний	Після нагрівання повітря	$t = 35\text{ }^{\circ}\text{C}$ , $W = 50\%$
ДР 1.6 Тонке очищення повітря	Очищене повітря, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеню очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря в фільтрі тонкого очищення	$E = 95\%$ $\delta = 1\text{ мкм}$

Продовження табл. 7.1

ДР 1.7 Очищення повітря на індивідуальних фільтрах	Очищене повітря, ступінь очищення	Перевірка ступеню очищення згідно паспорту фільтра	Під час очистки повітря на індивідуальному фільтрі	$E = 99,995\%$ $\delta = 0,11$ мкм
ДР 3.1.1 Приготування та стерилізація композиції А	Розчин композиції А, Температура, тиск, час стерилізації	Термометр технічний, манометр технічний, годинник	Тиск визначається безперервно під час стерилізації	$T = 80$ °С, $t = 30$ хв, $T = 112$ °С, $t = 30$ хв, $P = 0,05$ МПа відсутність мікробіоти
ДР 3.1.2 Приготування та стерилізація композиції Б	Розчин композиції Б, Температура, тиск, час стерилізації	Термометр технічний, манометр технічний, годинник	Тиск визначається безперервно під час стерилізації	$T = 131$ °С, $t = 40$ хв, $P = 0,15$ МПа відсутність мікробіоти
ДР 3.2.1 Приготування та стерилізація композиції А	Розчин композиції А, Температура, тиск, час стерилізації	Термометр технічний, манометр технічний, годинник	Тиск визначається безперервно під час стерилізації	$T = 80$ °С, $t = 30$ хв, $n = 50$ об/хв, $T = 112$ °С, $t = 30$ хв, $P = 0,05$ МПа відсутність мікробіоти
ДР 3.2.2 Приготування та стерилізація композиції Б	Розчин композиції Б, Температура, тиск, час стерилізації	Термометр технічний, манометр технічний, годинник	Тиск визначається безперервно під час стерилізації	$T = 131$ °С, $t = 40$ хв, $P = 0,15$ МПа відсутність мікробіоти
ДР 3.3.1 Приготування та стерилізація композиції А	Розчин композиції А, Температура, тиск, час стерилізації	Термометр технічний, манометр технічний, годинник	Тиск визначається безперервно під час стерилізації	$T = 80$ °С, $t = 30$ хв, $n = 50$ об/хв, $T = 112$ °С, $t = 30$ хв, $P = 0,05$ МПа відсутність мікробіоти
ДР 3.3.2 Приготування та стерилізація композиції Б	Розчин композиції Б, Температура, тиск, час стерилізації	Термометр технічний, манометр технічний, годинник	Тиск визначається безперервно під час стерилізації	$T = 50$ °С, $n = 50$ об/хв, $T = 131$ °С, $t = 40$ хв, $P = 0,15$ МПа відсутність мікробіоти

ДР 3.4.1 Приготування та стерилізація композиції А	Розчин композиції А Температура, тиск, час стерилізації	Термометр технічний, манометр технічний, годинник	Тиск визначається безперервно під час стерилізації	T = 80 °C, t = 30 хв, n = 50 об/хв, T = 112 °C, t = 30 хв, P = 0,05 МПа відсутність мікробіоти
ДР 3.4.2 Приготування та стерилізація композиції Б	Розчин композиції Б Температура, тиск, час стерилізації	Термометр технічний, манометр технічний, годинник	Тиск визначається безперервно під час стерилізації	T = 50 °C, n = 50 об/хв, T = 131 °C, t = 40 хв, P = 0,15 МПа відсутність мікробіоти
ДР 3.5.1 Приготування композиції А	Нестерильне поживне середовище	Однорідність	Під час операції	T = 80 °C, t = 30 хв, n = 50 об/хв,
ДР 3.5.2 Стерилізація композиції А в установці безперервної стерилізації	Стерильне поживне середовище, Температура, тиск, час стерилізації, стерильність	Термометр технічний, манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	T = 131 °C, t = 5 хв відсутність мікробіоти
ТП 4.1 Підтримання колекційної культури	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, мікробіологічна чистота культури	Годинник, термометр технічний, мікробіологічний контроль,	Температура і швидкість обертів контролюються перед культивуванням. Мікробіологічний контроль і визначення концентрації біомаси проводять після вирощування.	T = 5 °C , t = 4 міс відсутність сторонньої мікробіоти
ТП 4.2 Отримання робочої культури	Посівний матеріал, рН, тривалість вирощування, температура, частота обертів мішалки, мікробіологічна чистота культури	Датчик рН, годинник, термометр, технічний, тахометр, манометр	рН визначають після змішування всіх компонентів поживного середовища в інокуляторі, Температура і швидкість обертання контролюються та підтримуються автоматично весь час вирощування.	T = 37 °C, t = 28 год відсутність сторонньої мікробіоти

<p>ТП 4.3 Отримання посівного матеріалу на агаризованих поживних середовищах</p>	<p>Посівний матеріал, рН, тривалість вирощування, температура, частота обертів мішалки, мікробіологічна чистота культури, концентрація біомаси</p>	<p>Датчик рН, датчик рО<sub>2</sub>, годинник, термометр, технічний, тахометр, манометр</p>	<p>рН визначають після змішування всіх компонентів поживного середовища в посівному апараті, Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування. Мікроскопіювання – в кінці процесу вирощування культури в посівному апараті</p>	<p>T = 37 °C, t = 28 год відсутність сторонньої мікробіоти</p>
<p>ТП 4.4 Отримання посівного матеріалу в колбах на качалці</p>	<p>Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, частота обертів качалки, мікробіологічна чистота культури</p>	<p>Годинник, термометр, технічний, тахометр, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура і швидкість обертів контролюються перед культивуванням. Мікробіологічний контроль і визначення концентрації біомаси проводять після вирощування.</p>	<p>T = 37 °C, n = 100 об/хв, t = 28 год, відсутність сторонньої мікробіоти</p>
<p>ТП 4.5 Отримання посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 20 л</p>	<p>Посівний матеріал, рН, тривалість вирощування, температура, частота обертів мішалки, мікробіологічна чистота культури</p>	<p>Датчик рН, датчик рО<sub>2</sub>, годинник, термометр, технічний, тахометр, манометр</p>	<p>Датчик рН, датчик рО<sub>2</sub>, годинник, термометр, технічний, тахометр, манометр</p>	<p>T = 37 °C, t = 28 год, n = 100 об/хв w(пов.) = 0,5 л/(л*хв), C(біом.) = 5 г/л, відсутність сторонньої мікробіоти</p>
<p>ТП 4.6 Отримання посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 200 л</p>	<p>Посівний матеріал, рН, тривалість вирощування, температура, частота обертів мішалки, мікробіологічна чистота культури</p>	<p>Датчик рН, датчик рО<sub>2</sub>, годинник, термометр, технічний, тахометр, манометр</p>	<p>Температура і швидкість обертання контролюються та підтримуються автоматично весь час вирощування.</p>	<p>T = 37 °C, t = 28 год, n = 100 об/хв, w(пов.) = 0,5 л/(л*хв), C(біом.) = 5 г/л, відсутність сторонньої мікробіоти</p>

<p>ТП 4.7 Отримання посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 2 м<sup>3</sup></p>	<p>Посівний матеріал, рН, тривалість вирощування, температура, частота обертів мішалки, мікробіологічна чистота культури, концентрація біомаси</p>	<p>Датчик рН, датчик рО<sub>2</sub>, годинник, термометр, технічний, тахометр, манометр</p>	<p>рН визначають після змішування всіх компонентів поживного середовища в посівному апараті, Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування</p>	<p>T = 37 °C, t = 28 год, n = 100 об/хв, w(пов.) = 0,5 л/(л*хв), C(біом.) = 5 г/л, відсутність сторонньої мікробіоти</p>
<p>ТП 5.1 Виробничий біосинтез гентаміцину в ферментері об'ємом 20 м<sup>3</sup></p>	<p>Посівний матеріал, рН, тривалість вирощування, температура, частота обертів мішалки, кратність подачі повітря, мікробіологічна чистота культури, морфологічна відповідність м/о, концентрація біомаси, концентрація цільового продукту</p>	<p>Датчик рН, датчик рО<sub>2</sub>, годинник, термометр, технічний, тахометр, витратомір, манометр</p>	<p>рН визначають після змішування всіх компонентів поживного середовища в ферментері, і протягом перших 40 годин культивування постійно контролюють його на одному рівні, після 40 години рН знижують. Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування.</p>	<p>T = 33 °C, t = 124 год, n = 100 об/хв, w(пов.) = 0,5 л/(л*хв), C(біом.) = 10 г/л, C(гентаміцину) = 780,39 мг/л відсутність сторонньої мікробіоти</p>

## 7.2. Мікробіологічний контроль

Враховуючи, що культивування *M. purpurea* GbKL202 для виробництва лікарського засобу гентаміцину здійснюється в асептичних умовах, щоб переконатися у відсутності контамінації, необхідно здійснювати мікробіологічний контроль на всіх етапах.

Через кожні 40 годин з ферментера відбирають 20 мл культуральної рідини для аналізу.

Мікробіологічний контроль здійснюється двома способами: прямим посівом на агаризовані поживні середовища та мікроскопією.

Прямий засів здійснюється методом посіву культуральної рідини на виділені колонії на чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром (МПА) для ідентифікації бактерій та глюкозо-картопляним агаром (ГПА) або сусло-агаром (СА) для виявлення грибів і дріжджів.

Для мікроскопії застосовують світловий мікроскоп та препарат "розчавлена крапля".

*Приготування препарату «роздавлена крапля».* Препарат виготовляється на знежиреному предметному склі, на яке наноситься невелика крапля дистильованої води. З дотриманням правил асептики до води бактеріологічною петлею вводять невелику кількість культуральної рідини, перемішують і накривають покривним склом. Забороняється додавати велику кількість культури, оскільки препарат буде густим і непридатним для спостереження. Не слід допускати утворення бульбашок повітря під покривним склом. У випадку надлишку води її видаляють фільтрувальним папером. Мікроскопію проводять за допомогою сухої системи, збільшення  $\times 40$ .

При відсутності сторонньої мікрофлори в зразку під час мікроскопії можуть бути помітні клітини *M. purpurea* GbKL202. Представники цього роду мають добре розвинений, розгалужений, септований, діаметром 0,5 мкм. міцелій. Нерухомі спори утворюються по одній як сидячі або на коротких чи довгих спороносцях, які часто розташовані як розгалуженими пучками.

### **7.3. Показники росту і синтезу гентаміцину**

#### **7.3.1. Визначення концентрації біомаси**

Концентрацію біомаси встановлюють за оптичною щільністю клітинної суспензії з наступним перерахунком на абсолютно суху біомасу відповідно до калібрувального графіку. У пробірку наливають 9 мл дистильованої води і додають 1 мл культуральної рідини. Розчин змішують і вимірюють його оптичну густину (при 540 нм). Конвертацію в суху біомасу проводять згідно з калібрувальним графіком .

### 7.3.2. Визначення концентрації гентаміцину

Гентаміцин вимірюють методом ВЕРХ.

Культуру центрифугують для отримання супернатанту. Для цього рН отриманої культури доводили до 2,0 за допомогою H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Тамариндовий бульйон перемішували протягом 30 хвилин, а потім центрифугують при 11378 об/хв протягом 10 хвилин. Потім значення рН досліджуваного супернатанту для дослідження доводять до відповідного значення в межах 7,0-7,4 за допомогою NaOH. Попередньо оброблений зразок супернатанту повторно центрифугують при приблизно 11378 об/хв протягом 10-15 хв. Система ВЕРХ передбачає наявність насосу Gilson (Middleton, Wisconsin) 305 і автосамплера Gilson 231 XL, встановлений на клапані для впорскування каніфолі (петля зразка 100 мл). Аналіти виявляють за допомогою УФ-детектора зі змінною передбачаною довжиною хвилі Gilson 116, а дані в подальшому записуються на інтеграторі Spectra-Physics SP 4270 (Сан-Хосе, Каліфорнія). Відповідна рухома фаза - 5,5 г гептансульфоната натрію при 700 об. / об. Метанол, 250 об./об. Перед використанням рухома фаза фільтрують через фільтр Millipore 0,45 мм. Використовують колонку 12,5 × 4,6 см, 5 мм Nucleosyl C18. Швидкість потоку 1,5 мл/хв. Об'єм аналізу становить 100 мл, а УФ-детектор – 330 нм [36].

Для розчину проби до 10 мл розчину гентаміцину додають 5 мл метанолу і 4 мл реактиву фталевої кислоти, перемішують, додають 25 мл метанолу і нагрівають на водяній бані при 60°C протягом 15 хв. Розчин має охолотитись [36].

### 7.4. Визначення концентрації джерела азоту та вуглецю

#### 7.4.1. Визначення концентрації амонійного азоту.

Постачальником азоту в середовищі для культивування *M. purpurea* GbKL202 є сульфат амонію.

Метод Несслера [37] ґрунтується на утворенні забарвленої нерозчинної сполуки при подальшій взаємодії саме реактиву Несслера (K<sub>2</sub>HgI<sub>4</sub>) з аміаком в передбачуваних нейтральних або лужних розчинах сполук:  $2 \text{HgI}_4 + \text{NH}_3 + \text{OH} = \text{NH}_2\text{Hg}_2\text{I}_3 + 5\text{I} + \text{H}_2\text{O}$ .

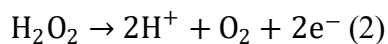
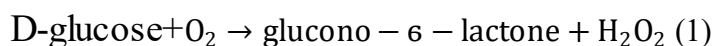
Для визначення наявного аміаку до 1 мл отриманого супернатанту отриманої культуральної рідини додають близько 1 мл реактиву Несслера. Коефіцієнт отриманої екстинкції вимірюють при передбачуваній довжині хвилі близько 400-425 нм. Концентрацію передбачуваного аміаку визначають за раніше отриманим калібрувальним графіком.

#### **7.4.2. Визначення концентрації вуглецю**

Для культивування *M. purpurea* GbKL202 у середовищі основним джерелом вуглецю є крохмаль.

Більш доцільним методом визначення вмісту крохмалю є поляриметричні методи. Метод засновано на руйнуванні крохмалю і вимірюванні кута повороту площини поляризації світла цукровмісним розчином. Кут повороту площини поляризації пропорційний концентрації оптично активної речовини [38].

Для вимірювання крохмалю використовують біохімічний аналізатор YSI 2700 Біохімічний аналізатор Select [39], заснований на ферментативному окисленні наявної глюкози в зразку, з послідуєчим електрохімічним окисленням одержаного  $H_2O_2$  на платиновому електроді:



В кінцевому результаті формується струм тест-сигналу, який корелює з кількістю глюкози в зразку. Одержані значення є середніми значеннями трикратних вимірів.

## РОЗДІЛ 8 ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ

### 8.1. Аналіз технологічної схеми виробництва гентаміцину

Технологічна схема виробництва гентаміцину передбачає наявність доферментаційних процесів отримання (виробнича санітарна підготовка виробничої ділянки, підготовка, приготування та стерилізація отриманих поживних середовищ для подальшого культивування), ферментаційні процеси отримання гентаміцину (отримання та накопичення посівного матеріалу, виробниче культивування продуцента).

**Санітарна підготовка виробництва.** На цьому етапі передбачувано відбувається як щоденне, так і генеральне прибирання залучених приміщень з використанням ряду мийно-дезинфікуючого засобу «Санімакс». Розчин відпрацьований в подальшому зливається до каналізації.

Миття та належне ополіскування ємнісного обладнання проводиться за використання передбаченої СІР-мийки відповідним мийно-дезинфікуючим засобом «Санікон». Далі опісля процесу належної обробки відпрацьований розчин відкачується до збірника та можливо буде повторно використовуватися, але ж промивна вода, яка є не конденсійною, передбачувано зливається до каналізаційної системи. *Даний етап є місцем емісії рідких відходів.*

**Приготування та стерилізація поживного середовища для отримання посівного матеріалу та виробничого біосинтезу.** На початку, перед належним безпосереднім приготуванням і її підготовкою середовища проводять перевірку компонентів поживного середовища. У разі невідповідності нормам проводиться процес відбракування. Зазвичай на даному етапі утворюються тверді відходи у вигляді пакувальних матеріалів від сировини. *Даний етап є місцем емісії твердих відходів.*

					<i>НУХТ БТЕК 05.01.11 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Козуб В.К.</i>			<b>РОЗДІЛ 8 ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ</b>	<i>Лім.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Перевір.</i>		<i>Удимович В.М.</i>					57	69
<i>Реценз.</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						

**Підготовка посівного матеріалу.** На цьому етапі здійснюється нарощування посівного матеріалу в інокуляторах та посівних апаратах. Так як посівний матеріал використовується для засіву наступного ферментера, відходи посівного матеріалу не враховуються.

Оскільки, використовуваний біологічний агент, а саме *M. purpurea* GbKL202, є аеробом, аерація поживного середовища є невід’ємним процесом при культивуванні. Зважаючи на це, при проведенні культивування буде утворюватись достатньо великий об’єм повітря, що відпрацьоване. *Даний етап є місцем емісії газоподібних відходів.*

**Виробничий біосинтез.** На цьому етапі *M. purpurea* GbKL202 культивується для отримання культуральної рідини з гентаміцином (процес культивування також включає аерацію поживного середовища). Після завершення біосинтезу культуральна рідина надходить до збірника перед виділенням гентаміцину, тому рідкі відходи на даному етапі не враховуються. *Даний етап також є місцем емісії газоподібних відходів*

## **8.2 Перспективи впровадження системи екологізації**

### **8.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів**

Для щоденного та генерального прибирання готують розчин «Санімакс» концентрацією 0,05%. За один цикл виробництва (133 год) витрачається 440 л робочого розчину «Санімакс», який після миття зливається у каналізацію. Обладнання мийть 0,2%-им розчином «Санікон» за допомогою СІР-мйки, об’єм відходів за один цикл 4850 л. Мийно-дезинфікуючі засоби «Санімакс» та «Санікон» мають клас безпеки IV, а тому є безпечними для навколишнього середовища. Узагальнена характеристика рідких відходів виробництва наведена у табл. 8.1.

## Характеристика рідких відходів під час виробництва

Назва складової рідких відходів	Речовини, які входять до складу відходів	Приблизний об'єм відходів на 1 цикл виробництва (л)	Клас небезпеки
0,05% розчин «Санімакс»	Комплекс чотирьох четвертинних амонієвих сполук (не менше 50%) і допоміжних компонентів	440	IV
0,2% розчин «Санікон»	Комплекс чотирьох четвертинних амонієвих сполук (не менше 5,5%) і допоміжні компоненти (в т. ч. ПАР, барвник, ароматизатор). рН концентрату $12,4 \pm 0,5$	4850	
Всього		5290	

Ліквідація отриманих рідких відходів при виробництві передбачувано пропонується проводити за використання саме біологічного методу подальшої очистки, при використанні саме за використання відповідних аеротенків.

Аеротенки передбачають собою відповідний резервуар, в якому доволі повільно переміщується суміш відповідного активного мулу та стічної води, котру необхідно очистити. Для більш кращого і безперервного контакту відбувається постійне перемішування за допомогою завчасно стиснутого повітря у відповідних спеціальних пристосуваннях. Для належної життєдіяльності використовуваних мікроорганізмів-мініралізаторів до аеротенку повинен постійно надходити кисень, що міститься у повітрі. Активний мул є собою певний біоценоз з сукупності мікроорганізмів-мініралізаторів, що здатні сорбувати на своїй поверхні та окислювати за наявності достатнього рівня кисню повітря органічні речовини отриманих стічних вод та рідин [40].

Гарний активний мул має компактні хлоп'я середньої крупності. У ньому повинні бути розвинуті відповідні коловертки, де присутні сувійка *Opercularia*, а також належні розвинуті сувійки *Vorticella convalaria*. Присутність саме нитчастих відповідних форм бактерій, гіпертрофних коловерток, сувоек і дрібних амеб передбачувано показує на погіршення мулу [40].

Якість відповідного мулу визначається різноманітними багатьма факторами. За інших однакових умов воно залежить від такого співвідношення

між отриманою масою активного мулу (по сухій речовині) та масою забруднених відповідних речовин, що знаходяться у об'ємі воді, яка повинна очищатися. Це отримане співвідношення характеризує саме навантаження на використовуваний мул. Виражається воно кількістю витягнутих зі стічних вод забруднень по БПК<sub>5</sub>, що приходить на 1 грам беззольної речовини активного мулу [40].

Як правило, 1 грам мулу зберігає свою нормальну активність при завантаженні на нього 200 – 400 мг кисню. При більш високих навантаженнях (1000 – 1200 кг/т), тобто при роботі аеротенків на неповне очищення, активний мул обов'язково регенерують [40].

Показник якості активного мулу – його здатність до осідання. Ця здатність оцінюється величиною мулового індексу, що представляє собою об'єм активного мулу в мілілітрах після 30-хвилинного відстоювання, 100 мілітрів мулової суміші, що припадає на 1 грам сухої речовини мулу [40].

Суміш саме стічної рідини з відповідним активним мулом повинна належно аеруватися по всій довжині використовуваного аеротенку. Це необхідно не лише для того, аби забезпечити використовувані мікроорганізми-мініралізатори достатньою кількістю кисню атмосферного повітря, але й для підтримки активного мулу в належному зваженому стані. Кисень нагнітається в аеротенк із повітрям повітродувками або засмоктується з атмосфери при сильному перемішуванні вмісту аеротенку [40].

Відмінна риса аеротенку як технологічного приміщення для біологічного очищення полягає в тому, що технологічний процес відповідного очищення можна належно регулювати до необхідного по місцевих умовах певного ступеня. Чим довше триває процес аерації, тим більше атмосферного повітря та активного мулу, і відповідно кращим буде очищення води [40].

Стічна вода, котра пройшла через технологічний аеротенк разом з відповідним активним мулом переходить до вторинного відстійника, де використовуваний активний мул відокремлюється від очищеної стічної води. Отриманий таким чином активний мул, повторно перекачується до каналу перед аеротенком для подальшого повторного використання. Цей мул доволі часто

називається циркуляційним. У процесі саме окислювання ним органічної речовини кількість відповідного мулу у зв'язку з ростом мікроорганізмів і наявністю саме органічних забруднень безупинно і невпинно зростає, саме тому частину відповідного мулу доводиться постійно видаляти [40].

Наступну обробку активного мулу, що видаляється, виконують разом з обробкою осаду з первинних відстійників у метантенках. Водночас активний мул через його значно велику вологість попередньо достатньо ущільнюють у відповідних спеціальних спорудженнях, що називаються мулоущільнювачами [40].

На самому початку технологічного процесу при змішуванні стічної рідини з відповідним активним мулом забруднення на активному мулі відповідно сорбуються і частково окисляються до певного рівня. У подальшому результаті різко зменшується відповідна біохімічна потреба самої стічної рідини в кисні. Власне кажучи забруднення витягаються досить швидко, приблизно в плинні двох годин. Часткова сорбція відповідних нерозчинних і колоїдних речовин може саме відбуватися і при недостатці відповідного кисню, на цьому і заснований принцип належної попередньої аерації очищувальних стічних вод [40].

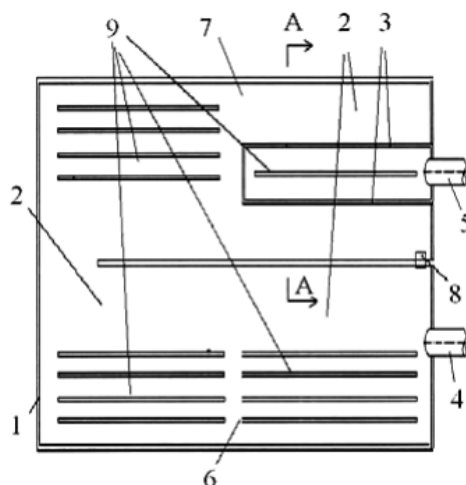
На другому етапі процесу активний мул регенерується, мається на увазі відновлюється його саме сорбційна відповідна здатність, а також відбувається окислення затриманого раніше на мулі забруднення. Швидкість належного споживання кисню на цьому етапі процесу значно менша, ніж у першій [40].

На третій стадії процесу йде нітрифікація амонійних солей – швидкість споживання кисню тут знову зростає [40].

Уже сам етап споживання кисню в певному періоді часу при біохімічному окислюванні в аеротенку вказує саме на те, що можна сконструювати споруду на дві частини відповідно до фаз відповідного окислювання. Якщо, наприклад, по місцевих санітарних умовах стічну або ж промивну рідину можна спустити до водойми без повного її очищення, то конструкцію аеротенку можна розрахувати на більшу тривалість перебування в них води відповідно потреби до першої фази окислювання. Такий аеротенк буде очищати стічну рідину тільки частково [40].

При частковому очищенні стічної рідини сорбуюча здатність активного мулу відновлюється додатковою аерацією в резервуарах, названих регенераторами [40].

*Аеротенк-відстійник* (рис. 8.1) (корисна модель належить до галузі біологічної очистки стічних вод і може бути використана в різних галузях промисловості та комунальному господарстві) [41].



*Рис. 8.1.* Двокоридорний аеротенк-відстійник (вигляд зверху)

Аеротенк містить корпус 1, зони відстоювання водомулової суміші 2, вмонтований регенератор 3, що не доходить до дна корпусу 1 і має довжину, що дорівнює 1/2 довжини аеротенку, трубопроводи 4 вводу стічної води і активного мулу і трубопроводи 5 виводу очищеної води з надлишковим активним мулом, перший коридор 6, і другий коридор 7, ерліфт 8 для перекачування мулової суміші з другого коридору 7 в початкову область першого коридору 6, що утворює внутрішню циркуляцію активного мулу, пневматичну систему аерації 9 з фільтросами, при цьому регенератор 3 утворює біля дна другого коридору 7 наскрізний отвір 10 для циркуляції водомулової суміші.

Запропонований аеротенк-відстійник працює наступним чином.

Стічна вода після пісколовки і первинного відстійника по трубопроводу 4 вводу стічної води і активного мулу, через корпус 1 аеротенка подається в перший коридор 6, змішується з активним мулом і зрошується повітрям через пневматичну систему аерації 9 з фільтросами, з якої подається стиснене повітря.

Активний мул в перший коридор 6 подається за допомогою ерліфта 8. Стічна вода самопливом надходить в другий коридор 7 аеротенка, де в аеробному режимі очищується за допомогою системи аерації 9. Рух водомулової суміші вздовж регенератора 3 супроводжується її опусканням через наскрізний отвір 10, що розташований біля дна другого коридору 7. До того ж, потік суміші, що опускається вниз, прискорюється завдяки тому, що з нього відокремлюються бульбашки повітря. В анаеробних зонах циркуляція водомулової суміші забезпечується за рахунок руху в придонній товщі рідини після витікання циркуляційного потоку з отвору 10, що утворений під регенератором 3, за схемою "витікання з під щита". Швидкість цього потоку є основною для гарантованого втримання твердої фази водомулової суміші в зонах дефіциту кисню в плаваючому стані. В бокових зонах відстоювання регенератора 3 утворюються умови для процесу нітри-денітрифікації, відбувається відстоювання очищеної води і ця вода безперервно витікає з аеротенка через трубопроводи 5 виводу очищеної води [41].

### **8.2.2. Система знешкодження твердих відходів**

Тверді відходи, які утворюються на етапах санітарної підготовки виробництва та приготування поживного середовища, являють собою упаковки, в якій поставляються мийно-дезінфікуючі засоби та компоненти середовища. Упаковка від засобів «Санімакс» та «Санікон» виготовлена з поліетилену високої щільності і піддається вторинній переробці. Компоненти поживного середовища постачаються у мішках з полівінілхлориду. У зв'язку з тим, що полівінілхлорид відрізняється від звичайного пластику, даний вид матеріалу пакування потребує окремої вторинної переробки.

**Характеристика твердих відходів під час виробництва**

Назва складової твердих відходів	Речовини, які входять до складу відходів	Приблизний об'єм відходів на 1 цикл виробництва (кг)	Клас небезпеки
Упаковка «Санімакс» та «Санікон»	Поліетилен високої щільності	2,39	IV
Упаковка компонентів поживного середовища	Полівінілхлорид	5,93	
Всього		8,32	

Упаковки від миючих засобів та компонентів середовища сортують (окремо поліетилен, полівінілхлорид та папір) та відправляють до пунктів прийому вторинної сировини для переробки.

**8.2.3. Система знешкодження газоподібних викидів**

Газоподібні відходи утворюються на етапах підготовки посівного матеріалу та виробничого культивування.

Тривалість підготовки посівного матеріалу в інокуляторі та посівних апаратах становить 84 год, а виробничий біосинтез займає 124 год. Аерацію здійснюють зі швидкістю 0,5 л/лКР/хв. Для підготовки інокуляту використовують 1 інокулятор з робочим об'ємом 14 л та 2 посівних апарати з робочими об'ємами 146,8 л та 1404,5 л, а для виробничого біосинтезу 1 ферментер з робочим об'ємом 13 441,3 л. Отже, приблизний об'єм відпрацьованого повітря за цикл ферментації становить:

$$(28 \cdot 14 \cdot 0,5) + (28 \cdot 146,8 \cdot 0,5) + (28 \cdot 1404,5 \cdot 0,5) + (124 \cdot 13\,441,3 \cdot 0,5) = 855275 \text{ л} = 855,3 \text{ м}^3$$

## Характеристика газоподібних відходів під час виробництва

Назва складової газоподібних відходів	Речовини, які входять до складу відходів	Приблизний об'єм відходів на 1 цикл виробництва (м <sup>3</sup> )	Клас небезпеки
Відпрацьоване повітря після ферментації	Вуглекислий газ	855,3	IV

Очищення газоподібних викидів здійснюють за допомогою скруберів.

*Кільцевий скрублер* (рис. 8.3) (Винахід стосується способу очищення запиленого газового потоку за рахунок мокрого пиловидалення в кільцевому скрублері за допомогою упорскуваної промивальної рідини, який відрізняється тим, що щонайменше часткова кількість промивальної рідини, переважно вся промивальна рідина, упорскується у газовий потік проти напрямку його протікання) [42].

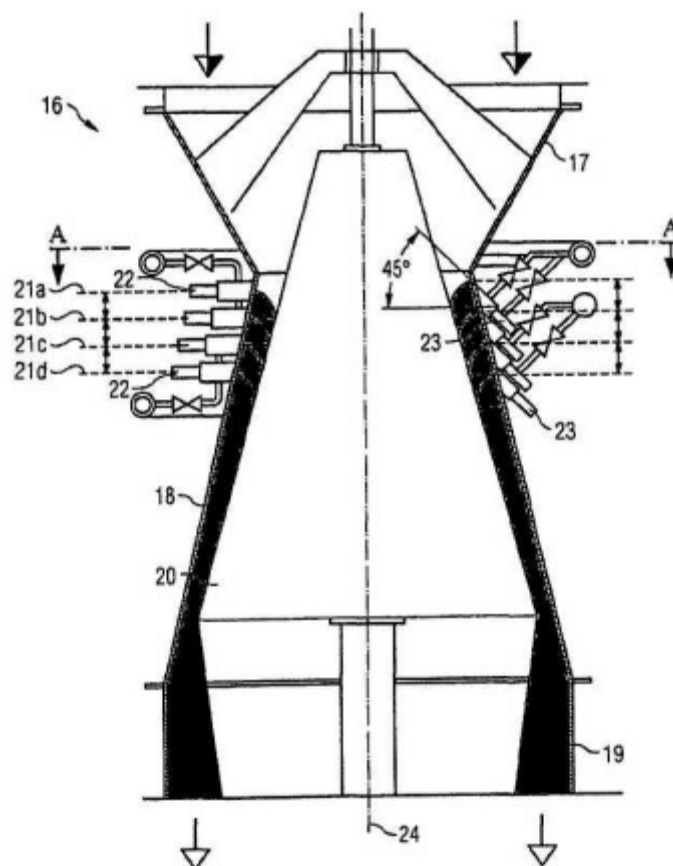


Рис. 8.3. Розрізи кільцевих скрублерів [42]

На рис.8.3 змальовано два поздовжні розрізи половин сторін двох різних варіантів кільцевого скрубера 16 відносно встановлення сопел. Корпус містить частину, яка безперервно звужується у напрямі протікання очищеного газового потоку - конфузоре 17, частину, яка безпосередньо примикає до неї та безперервно розширюється, - дифузоре 18 і частину 19 постійного перерізу, яка примикає до неї. У цих частинах корпусу кільцевого скрубера 16 встановлене створююче 25 кільцевий зазор тіло 20, верхня частина якого конічно звужується проти напрямку протікання, а тупа верхня торцева сторона направлена знизу у нижню частину конфузора 17.

Нижня частина тіла 20 починається на висоті переходу від дифузора 18 до частини 19 корпусів і звужується у напрямі протікання. Корпус і тіло 20 виконані, в основному, обертально-симетричними. Тіло 20 розташоване в корпусі з можливістю осьового переміщення. За рахунок цього відповідну ширину кільцевого зазору можна підганяти до масового потоку протікання газу.

На відміну від традиційних кільцевих скрубев, над конфузоре 17 не передбачена центральна форсунка для уприскування промивальної рідини. Навпаки, у вхідній зоні кільцевого зазору в чотирьох лежачих одна за одною у напрямі протікання площинах розташовані направлені у кільцевий зазор форсунки 22, 23. Отже, вони розташовані в цих площинах 21a, 21b, 21c, 21 d, лежачих одна за одною, якщо дивитися від конфузора 17 у напрямі дифузора 18 вздовж поздовжньої осі 24 кільцевого скрубера 16. Всі площини перпендикулярні поздовжній осі 24, тобто є площинами перерізу проточного каналу в кільцевому зазорі. Форсунки 22 у варіанті на фіг.3 зліва розташовані перпендикулярно поздовжній осі 24 кільцевого скрубера 16, а форсунки 23 справа встановлені під гострим кутом  $45^\circ$  до неї. В обох випадках уприскування промивальної рідини відбувається із складовою швидкості проти напрямку протікання газового потоку в кільцевому зазорі. Цим досягається максимально можлива відносна швидкістю між газовим потоком і промивальною рідиною [42].

#### **8.2.4. Заходи щодо зменшення об'ємів відходів**

З метою запобігання або зменшення обсягів утворення відходів та стимулювання впровадження маловідходних технологій Кабінет Міністрів України, міністерства та інші центральні і місцеві органи виконавчої влади в межах своєї компетенції здійснюють [43]:

а) розроблення та впровадження науково обгрунтованих нормативів утворення відходів на одиницю продукції (сировини та енергії), виконання робіт і надання послуг, що регламентують їх кількісний та якісний склад, відповідно до передових технологічних досягнень;

в) встановлення на основі затверджених нормативів (питомих показників обсягів утворення відходів) граничних показників утворення відходів у технологічних процесах;

г) розроблення та впровадження системи поводження з пакувальними матеріалами і тарою; системи збирання, видалення, знешкодження та утилізації відпрацьованих олив (мастил); системи збирання, заготівлі та утилізації зношених шин, гумотехнічних виробів та відходів гумовотехнічного виробництва; системи заготівлі та утилізації непридатних до використання транспортних засобів; системи збирання та утилізації електричного та електронного обладнання; системи збирання, видалення, знешкодження, утилізації відходів, що утворюються у процесі медичного обслуговування, ветеринарної практики, пов'язаних з ними дослідних робіт;

д) розроблення загальних вимог щодо поводження з побутовими відходами;

е) розроблення системи інформаційного, науково-методичного забезпечення виробників відходів відомостями про технологічні та інші можливості зменшення обсягів утворення та їх утилізації;

В Україні практикується три способи утилізації твердих побутових відходів [44]:

1. Спалювання. Найпоширеніший спосіб утилізації сміття, особливо будівельного через свою дешевизну. Однак, через виділення в повітря шкідливих та небезпечних для навколишнього середовища та особливо для здоров'я людини

речовин, такий спосіб можна використовувати далеко не для всіх видів відходів. Сучасні підприємства оснащені спеціальними очисними спорудами. Якщо ви не знаєте, як правильно утилізувати будівельне сміття, то зверніться в спеціальні компанії, які надають послуги з вивезення та ліквідації сміття після будівельно-монтажних робіт.

2. Захоронення. Для закопування твердих побутових відходів відводяться великі полігони, які знаходяться за межами населених пунктів. Для захоронення не підходять речовини, які з часом можуть виділяти в ґрунт та підземні води небезпечні речовини.

3. Компостування. Цей метод використовується, в основному, для обробки побутових (харчових) відходів, в результаті чого виходить органічне добриво – компост, що ефективно використовується в сільському господарстві.

Найефективнішим способом утилізації твердих побутових або будівельних відходів є їх переробка. В результаті можна отримати вторинну сировину або навіть енергію, що можна використовувати на благо суспільства та навколишнього середовища [44].

Утилізація побутової хімії актуальна в побуті, торгівлі та на виробництві. Вся продукція неналежної якості підлягає знищенню. До цієї категорії належать товари з вичерпаним терміном придатності, браком при виготовленні або ушкодженнями в результаті порушень умов зберігання [45].

У складі миючих засобів міститься велика кількість агресивних компонентів, які завдають непоправної шкоди природі при утилізації на полігонах. Тому задіюють спеціалізовані підприємства [45].

Знищення неліквідів з порушенням природоохоронних вимог пов'язано з рядом наслідків [45]:

- Забруднення навколишнього середовища.
- Штрафні санкції до порушника.
- Призупинення діяльності організації-порушника.

При дотриманні вимог законодавства юридична особа має право зменшити податкову базу при сплаті податку на прибуток. Розмір пільги дорівнює витратам на знищення побутової хімії [45].

#### *Послідовність утилізації [45]*

1. Оцінка складності складу. Лабораторією або за вхідними даними існуючої документації визначається склад побутової хімії. Аналізується ступінь його небезпеки і горючості.

2. Оцінка стану. Проводиться за зовнішнім виглядом. Спеціаліст оглядає упаковку на цілісність. Стежить за тим чи змінилося агрегатний стан та інші характеристики товару. Оцінює складність збору матеріалу, якщо упаковка порушена.

3. Транспортування. Якщо побутова хімія не представляє небезпеки, її можна перевозити для утилізації в необладнаних автомобілях. Але для хімічно нестабільних компонентів або продукції з порушеною упаковкою використовуються спеціальні контейнери.

4. Переробка. Основним завданням стає нейтралізація хімічно агресивних компонентів. У ряді випадків обмежуються поділом компонентів складних формул на окремі складові. Завдяки цьому вдається пустити сировину на повторне виробництво.

5. Вторинна переробка. Найчастіше активні речовини миючих засобів застосовують при випуску хімічних добавок для будівництва: в бетони і розчини, для додання пластичності і легкоукладальності. Така продукція дешевше, а її виробництво безпечніше.

#### *Способи утилізації*

Виділяють кілька технологій [45]:

1. Знешкодження. Має на увазі додавання в формулу компонентів, які активізують хімічні процеси. На виході отримуємо нейтральні речовини.

2. Нормалізація кислотності. Допомагає перетворити кислоти і луги в прості солі, які можуть використовуватися в подальшому.

3. Поглинання рідкої фази. За допомогою всмоктуючих матеріалів (наприклад, торфу) запобігають розтікання і поширення агресивних складових.

Аналізуючи показники забруднення повітряного басейну, що включає обсяг викидів шкідливих речовин стаціонарних та пересувних джерел забруднення потрібно відмітити зменшення загальної кількості викидів в атмосферне повітря в 2014 році у порівнянні з попереднім (на 11,02 тис.т. або на 14,2% менше) і склало 77,42 тис.т [46].

До основних антропогенних джерел забруднення атмосфери належать: теплове та енергетичне устаткування; промислові підприємства, добувна та обробна галузь господарства, всі види транспорту [46].

Однією з основних причин забруднення атмосферного повітря є низький рівень оснащення джерел викидів пилогазоочисним обладнанням. Значно впливає на забруднення атмосфери відсутність установок по вловлюванню газоподібних сполук, а саме: діоксиду сірки, діоксиду азоту, оксиду вуглецю, летючих органічних сполук та інших [46].

Основними напрямками зменшення надходження забруднюючих речовин в атмосферне повітря є, насамперед виконання природоохоронних заходів та впровадження сучасних технологій очищення промислових викидів [46].

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

1. de Lima Procópio R. E., da Silva I. R., Martins M. K., de Azevedo J. L., de Araújo J. M. Antibiotics produced by *Streptomyces*. *The Brazilian Journal of infectious diseases*. 2012, 16(5): 466-471. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2012.08.014>
2. Boumehira A. Z., El-Enshasy H. A., Hacène H., Elsayed E. A., Aziz R., Park E. Y. Recent progress on the development of antibiotics from the genus *Micromonospora*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2016, 21: 199-223. <https://doi.org/10.1007/s12257-015-0574-2>
3. Aminoglycosides Market Size, Share & Trends Analysis Report By Drug (Neomycin, Tobramycin, Gentamicin, Amikacin, Paromomycin, Streptomycin, Kanamycin), By Mode Of Administration, By Application, By Region, And Segment Forecasts, 2015 – 2022. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/aminoglycoside-market>
4. Lin L., Lu L., Cao W., Li T. Hypothesis for potential pathogenesis of SARS-CoV-2 infection—a review of immune changes in patients with viral pneumonia. *Emerging microbes & infections*. 2020, 9(1): 727-732. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1746199>
5. Terreni M., Taccani M., Pregnotato M. New antibiotics for multidrug-resistant bacterial strains: latest research developments and future perspectives. *Molecules*. 2021, 26(9): 2671. <https://doi.org/10.3390/molecules26092671>
6. Гентамицина сульфат (Gentamycini sulfas). [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://compendium.com.ua/info/14159/gentamitsina-sul\\_fat/](https://compendium.com.ua/info/14159/gentamitsina-sul_fat/)
7. Gentamicin. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Gentamicin>
8. ГЕНТАМІЦИН (GENTAMICINUM). [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://compendium.com.ua/uk/akt/71/3226/gentamicinum/>
9. Chaves B. J., Tadi P. Gentamicin. 2020.

10. Гентаміцин. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://mozdocs.kiev.ua/liki.php?nav=1&am=&go=&hf=1&name=%E3%E5%ED%F2%E0%EC%B3%F6%E8%ED&lang=1&page=1>
11. ГЕНТАМІЦИН. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://mozdocs.kiev.ua/likiview.php?id=2356>
12. Li D., Li H., Ni X., Zhang H., Xia H. Construction of a gentamicin C1a-overproducing strain of *Micromonospora purpurea* by inactivation of the *gacD* gene. *Microbiological research*. 2013, 168(5): 263-267. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2012.12.006>
13. Raju C. A., Satya C. V., Mehta C. C., Yugandhar N. M., Rao S. S. Optimization of media composition for the production of gentamycin by *Micromonospora echinospora* MTCC 708 using response surface methodology. *IJMER*. 2012, 2: 1267-1273.
14. Wei Z., Shi X., Lian R., Wang W., Hong W., Guo S. Exclusive production of gentamicin C1a from *Micromonospora purpurea* by metabolic engineering. *Antibiotics*. 2019, 8(4): 267. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8040267>
15. *Micromonospora echinospora* (*Micromonospora purpurea*). [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q8KNC8/entry>
16. Carro L., Nouioui I., Sangal V., Meier-Kolthoff J. P., Trujillo M. E., Montero-Calasanz M. D. C., et al. Genome-based classification of micromonosporae with a focus on their biotechnological and ecological potential. *Scientific reports*. 2018, 8(1): 525. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17392-0>
17. Thanaboripat D., Thawai C., Kittiwongwattana C., Laosinwattana C., Koohakan P., Parinthawong N. *Micromonospora endophytica* sp. nov., an endophytic actinobacteria of Thai upland rice (*Oryza sativa*). *The Journal of Antibiotics*. 2015, 68(11): 680-684. <https://doi.org/10.1038/ja.2015.57>
18. Hifnawy M. S., Fouda M. M., Sayed A. M., Mohammed R., Hassan H. M., AbouZid S. F., et al. The genus *Micromonospora* as a model microorganism for

bioactive natural product discovery. *RSC advances*. 2020, 10(35): 20939-20959.  
<https://doi.org/10.1039/D0RA04025H>

19. *Micromonospora echinospora* subsp. *echinospora* DSM 43816 is a mesophilic bacterium that builds an aerial mycelium and produces antibiotic compounds. [Електронний ресурс]. Режим доступу:  
<https://bacdive.dsmz.de/strain/7972>

20. Krause K. M., Serio A. W., Kane T. R., Connolly L. E. Aminoglycosides: an overview. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2016, 6(6): a027029.  
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a027029>

21. Pajares M., Jiménez-Moreno N., Dias I. H., Debelec B., Vucetic M., Fladmark K. E., et al. Redox control of protein degradation. *Redox biology*. 2015, 6: 409-420. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.07.003>

22. Vrancianu C. O., Dobre E. G., Gheorghe I., Barbu I., Cristian R. E., Chifiriuc M. C. Present and future perspectives on therapeutic options for carbapenemase-producing *Enterobacterales* infections. *Microorganisms*. 2021, 9(4): 730. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040730>

23. Kushner B., Allen P. D., Crane B. T. Frequency and demographics of gentamicin use. *Otology & neurotology: official publication of the American Otological Society, American Neurotology Society [and] European Academy of Otology and Neurotology*. 2016, 37(2): 190. <https://doi.org/10.1097/MAO.0000000000000937>

24. Silva A., Costa E., Freitas A., Almeida A. Revisiting the frequency and antimicrobial resistance patterns of bacteria implicated in community urinary tract infections. *Antibiotics*. 2022, 11(6): 768. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11060768>

25. Держстат України. [Електронний ресурс]. Режим доступу:  
<https://www.ukrstat.gov.ua/>

26. Одарчук І. В. Клініко-патогенетичні особливості пієлонефриту на тлі міхурово-сечовідного рефлюксу у дітей раннього віку: Автореф. дис. канд. мед. наук. Вінниця, 2018. 209 с.

27. Starch and sucrose metabolism - *Micromonospora* sp. L5. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.kegg.jp/pathway/mil00500>

28. Glycolysis / Gluconeogenesis - *Micromonospora* sp. L5. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.kegg.jp/pathway/mil00010>
29. KEGG Pathway Maps - *Micromonospora* sp. L5. [Электронный ресурс].  
Режим доступа: [https://www.kegg.jp/brite/query=00010&htext=br08901.keg&option=-a&node\\_proc=br08901\\_org&proc\\_enabled=mil&panel=collapse](https://www.kegg.jp/brite/query=00010&htext=br08901.keg&option=-a&node_proc=br08901_org&proc_enabled=mil&panel=collapse)
30. Aminoglycosides - Reference pathway. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.kegg.jp/pathway/map07021>
31. Ni X., Sun Z., Gu Y., Cui H., Xia H. Assembly of a novel biosynthetic pathway for gentamicin B production in *Micromonospora echinospora*. *Microbial cell factories*. 2016, 15: 1-9. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0402-6>
32. Chen X., Zhang H., Zhou S., Bi M., Qi S., Gao H., et al. The bifunctional enzyme, *GenB4*, catalyzes the last step of gentamicin 3', 4'-di-deoxygenation via reduction and transamination activities. *Microbial Cell Factories*. 2020, 19: 1-12. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01317-0>
33. Neomycin, kanamycin and gentamicin biosynthesis - Reference pathway. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.genome.jp/pathway/map00524>
34. САНИМАКС. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://interdez.com.ua/ru/product/dezinficiruyuschee-sredstvo-sanimaks-interdez-kiev>
35. САНИКОН дезінфекційний засіб для поверхонь. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.propecs.ua/product/sanikon-dezinfekcijnyj-zasib-dlya-poverhon/>
36. Frutos P., Torrado S., Perez-Lorenzo M. E., Frutos G. A validated quantitative colorimetric assay for gentamicin. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2000, 21(6): 1149-1159. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(99\)00192-2](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(99)00192-2)
37. Определение аммиака. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.chem21.info/page/222125071060106001167224035109137089200062007043/>

38. ПОЛЯРИМЕТРІЯ. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/894/polyarimetriya>
39. YSI 2700D Select Biochemistry Analyzer. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.marshallscientific.com/YSI-2700-Select-Biochemistry-Analyzer-p/ysi-2700.htm>
40. Аеротенки – апарати біологічної очистки стічних вод. [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://lubbook.org/book\\_353\\_glava\\_31\\_8\\_2.%C2%A0Aerotenki\\_%E2%80%93\\_apa.html](https://lubbook.org/book_353_glava_31_8_2.%C2%A0Aerotenki_%E2%80%93_apa.html)
41. Патент України UA 118529. Аеротенк-відстійник / Ващенко Л.В., Волошин М.Д., Белянська О.Р., Клименко І.В. Опубл. 10.08.2017. Бюл. №15.
42. Патент України UA 110381. Кільцевий скруббер з кільцевим уприскуванням / Хегеманн К.-Р.. Опубл. 25.12.2015. Бюл. №24.
43. ЗАКОН УКРАЇНИ "Про відходи" Відомості Верховної Ради України (ВВР), 1998, N 36-37, ст.242 ).
44. Як утилізувати тверді побутові відходи? [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://karbon-cns.com.ua/uk/yak-utiliizuvati-tverdii-pobutovii-viidhodi.html>
45. Утилізація побутової хімії в Києві. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://alphaeco.com.ua/utilizatsiya-khimichnikh-rechovin/pobutova-khimiya>
46. СТАН АТМОСФЕРНОГО ПОВІТРЯ. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://eprdep.zht.gov.ua/ND2014-2.htm>