

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

«До захисту в ЕК»

Декан факультету

Наталія ГРЕГІРЧАК

(підпис)

(ім'я та прізвище)

«__» червня 2024 р.

«До захисту допущено»

Завідувач кафедри

Віктор СТАБНІКОВ

(підпис)

(ім'я та прізвище)

«__» червня 2024 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код та назва спеціальності)

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

на тему: Біосинтез гентаміцину *Micromonospora echinospora*

Виконала: здобувачка IV курсу, групи 3

ГРЕБЕЛЬНА Діана Юріївна

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Керівник КАРЛАШ Юрій Васильович

(прізвище, ім'я та по батькові повністю)

(підпис)

Консультанти

(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 – 2024 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю
Кафедра біотехнології і мікробіології
Освітній ступінь бакалавр
Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код і назва)
Освітньо-професійна програма «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна»
(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ

“ 01 ” березня 2024 року

ЗАВДАННЯ

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

ГРЕБЕЛЬНОЇ Діани Юріївни

(прізвище, ім'я, по батькові)

- Тема роботи Біосинтез гентаміцину *Micromonospora echinospora*
керівник роботи КАРЛАШ Юрій Васильович доц., к.т.н.,
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)
затверджені наказом закладу вищої освіти від 29 березня 2024 року № 238-кс
- Строк подання здобувачем роботи 28 травня 2024 р.
- Вихідні дані до роботи геометричний об'єм ферментеру 10м3, коефіцієнт заповнення 0,6, цільовий продукт у вигляді антибіотичного препарату Гентаміцину, виробничий штам *Micromonospora echinospora*
- Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити)
характеристика цільового продукту, характеристика біологічного агента, техніко-економічне обґрунтування, обґрунтування вибору технологічної схеми, специфікація обладнання, опис технологічної схеми, контроль виробництва
- Перелік графічного матеріалу
Апаратурна схема біосинтезу *Micromonospora echinospora* формату А0 - аркушів 1
Технологічна схема біосинтезу *Micromonospora echinospora* формату А1 – аркушів 1

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 01.03.2024 р.

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
	Розділ 1. Характеристика цільового продукту	01.03.24 - 04.03.24	Виконано
	Розділ 2. Обґрунтування вибору біологічного агента	04.03.24- 08.03.24	Виконано
	Розділ 3. Техніко-економічне обґрунтування.	08.03.24.- 10.03.24	Виконано
	Розділ 4. Біосинтез цільового продукту	10.03.24.- 12.03.24	Виконано
	Розділ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми	12.03.24.- 15.03.24	Виконано
	Розділ 6. Специфікація обладнання	15.03.24- 17.03.24	Виконано
	Розділ 7. Опис технологічної схеми	17.03.24.- 20.03.24	Виконано
	Розділ 8. Контроль виробництва	20.03.24.- 25.03.24	Виконано
	Розділ 9. Обґрунтування стадій виділення і очищення субстанції гентаміцину	23.03.24 - 25.05.24	Виконано
	Розділ 10. Охорона довкілля	25.03.24 - 28.05.24	Виконано

Здобувач

_____ (підпис)

Діана ГРЕБЕЛЬНА

(ім'я та прізвище)

Керівник роботи

_____ (підпис)

Юрій КАРЛАШ

(ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена розробленню технічної та апаратурної схем біосинтезу *Micromonospora echinospora*. *Micromonospora echinospora* застосовується задля виробництва антибіотичного препарату Гентаміцину, та включає дослідження оптимальних умов культивування, методів виділення і очищення, а також заходів контролю якості отриманого продукту.

Технологія виробництва Гентаміцину бактерією *Micromonospora echinospora* включає в себе допоміжні роботи, а саме підготовку аераційного повітря, титрувальних розчинів, стерилізацію поживних середовищ та технологічний процес - стадії вирощування посівного матеріалу, та біосинтез у ферментері об'ємом 10м³, з коефіцієнтом заповнення 0,6.

Кваліфікаційна робота складається зі вступу, дев'яти розділів, списку використаної літератури, технологічної схеми (формат А1, 1 аркуш) та апаратурної схеми (формат А0, 1 аркуш).

Загальний обсяг роботи – 113 сторінок, 15 таблицок, 11 рисунків та 94 літературних найменувань.

Ключові слова: *Micromonospora echinospora*, антибіотики, гентаміцин, культивування.

ABSTRACT

The qualification work is dedicated to the development of technical and apparatus schemes for the biosynthesis of *Micromonospora echinospora*. *Micromonospora echinospora* is used for the production of the antibiotic drug Gentamicin, and includes research on optimal cultivation conditions, methods of isolation and purification, as well as measures for quality control of the obtained product.

The technology for producing Gentamicin by the bacterium *Micromonospora echinospora* involves auxiliary tasks, including the preparation of aeration air, titration solutions, sterilization of nutrient media, and the technological process – stages of seed material cultivation and biosynthesis in a 10 m³ fermenter, with a filling coefficient of 0.6. The qualification work consists of an introduction, nine chapters, a list of references, a technological scheme (format A1, 1 sheet), and an apparatus scheme (format A0, 1 sheet).

The total volume of the work is 113 pages, 15 tables, 6 figures, and 94 references.

Keywords: *Micromonospora echinospora*, antibiotics, gentamicin, cultivation.

ЗМІСТ

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	11
1.1 Фізико-хімічні властивості гентаміцину <i>Micromonospora echinospora</i>	11
1.2 Механізм біологічної дії гентаміцину <i>Micromonospora echinospora</i>	12
1.3 Використання та виготовлення гентаміцину <i>Micromonospora echinospora</i>	12
РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	15
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування.....	15
2.2. Перевірочний розрахунок складу поживного середовища для вирощування штаму <i>Micromonospora echinospora</i> NRRL B-2995 – продуцента гентаміцину.....	19
2.2.1. Розрахунок вмісту у середовищі джерела вуглецевого живлення.....	19
2.2.2. Розрахунок вмісту у середовищі джерела азотного живлення	20
2.2.3. Розрахунок вмісту Фосфору у поживному середовищі.....	21
2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента.....	21
2.4. Таксономічний статус біологічного агента.....	24
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ	25
3.1. Потреба в гентаміцині	25
3.2. Розрахунок потужності виробництва гентаміцину	28
3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера	30
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу	32
РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	35
4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента.....	35
4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт	37
РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	39
5.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера.....	39
5.1.1. Вибір умов і способу культивування <i>M. echinospora</i> NRRL B-2995 – продуцента гентаміцину	39
5.1.2. Вибір типу ферментера для культивування <i>M. echinospora</i> NRRL B-2995 – продуцента гентаміцину	40
5.2. Обґрунтування використання стадій підготовки стерильного повітря	41
5.3 Вибір мийних дезінфікуючих засобів	43
5.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища.....	47

5.4.1. Обґрунтування способів підготовки складових поживного середовища для культивування <i>Micromonospora echinospora</i> NRRL B-2995	47
5.4.2. Одержання посівного матеріалу у колбах на качалці.....	48
5.4.3. Отримання посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 25 л.....	48
5.4.4. Культивування <i>M. echinospora</i> NRRL B-2995 у посівному апараті на 250 л	49
5.4.5. Виробничий біосинтез гентаміцину у ферментері на 10 м ³	50
5.5. Обґрунтування вибору піногасника та титрувальних розчинів.....	51
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ПРОЕКТОВАНОГО ВИРОБНИЦТВА ГЕНТАМІЦИНУ	53
РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА ГЕНТАМІЦИНУ.	57
РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА ГЕНТАМІЦИНУ	65
8.1. Мікробіологічний контроль	65
8.2. Показники росту і синтезу гентаміцину	68
8.2.1. Визначення концентрації біомаси бактерій	68
8.2.2. Визначення концентрації гентаміцину	68
8.2.3. Визначення концентрації джерела Карбону (крохмаль) у поживному середовищі	69
8.2.4. Визначення концентрації джерела азоту (соевий шрот) у поживному середовищі	70
8.3. Карта постадійного контролю.....	73
РОЗДІЛ 9. ОБґРУНТУВАННЯ СТАДІЙ ВИДІЛЕННЯ І ОЧИЩЕННЯ СУБСТАНЦІЇ ГЕНТАМІЦИНУ	79
9.1. Відділення культуральної рідини.....	81
9.2. Адсорбція гентаміцину на макропористій смолі.....	68
9.3. Друга стадія виділення гентаміцину та отримання гентаміцину сульфату.....	85
9.4. Додаткове очищення гентаміцину сульфату	86
9.5. Виділення осажденного гентаміцину сульфату.....	86
9.6. Висушування гентаміцину сульфату	87
9.7. Подрібнення та просіювання субстанції гентаміцину сульфату.....	89
9.8. Фасування, стерилізація та пакування гентаміцину сульфату.....	92
9.9. Процесуальна схема післяферментаційних стадій виробництва гентаміцину сульфату.....	73

РОЗДІЛ 10. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ	94
10.1.1. Розрахунок орієнтовного об'єму стічних вод.....	95
10.1.2. Визначення середніх витрат стічних вод від промислового підприємств	96
10.2. Система знешкодження газоподібних відходів.....	99
10.3. Системи знешкодження твердих відходів	100

ВСТУП

Антибіотики є важливими вторинними метаболітами, що синтезуються макроорганізмами і мають антимікробні властивості. Вони десятиліттями використовуються як хіміотерапевтичні засоби проти інфекційних та хвороботворних мікроорганізмів. Застосування антибіотиків, разом із належною санітарією та вакцинацією, сприяло значному зниженню смертності від інфекційних захворювань, що раніше були переважно летальними. [1].

Аміноглікозиди — це група сильнодіючих антибіотиків, які використовуються для лікування важких інфекцій, викликаних аеробними грамнегативними бактеріями. Вони ефективні проти інфекцій черевної порожнини, сечовивідних шляхів, шкіри та м'яких тканин, кісток, крові, очей, вух, легенів та серця. Гентаміцин, один з аміноглікозидів, є важливим антибіотиком завдяки своєму широкому спектру дії та ефективності проти багатьох стійких до інших препаратів бактерій. Його механізм дії полягає у зв'язуванні з рибосомами бактерій і порушенні синтезу білка, що призводить до загибелі мікроорганізмів. [2,3].

Гентаміцин синтезується бактерією *Micromonospora echinospora*, яка продукує цей антибіотик під час росту на поживних середовищах. Біосинтез гентаміцину включає кілька ключових етапів, від ферментації до очищення і концентрації кінцевого продукту. Кожен з цих етапів вимагає ретельної організації та дотримання санітарних норм для забезпечення високої якості та безпеки продукту[1,4].

					НУХТ БТЕК 04.03.45 КР ПЗ			
Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Гребельна Д.Ю.				Вступ	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.	Карлаш Ю.В.						9	113
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							

Новизною даної роботи є розробка вдосконалених технічних і апаратурних схем для біосинтезу гентаміцину. Зокрема, запропоновано нові методи оптимізації поживних середовищ, що дозволяють збільшити продуктивність *Micromonospora echinospora*. Також впроваджено інноваційні технології адсорбції та додаткового очищення, що забезпечують високу чистоту кінцевого продукту. Крім того, застосовано сучасні методи контролю якості, які дозволяють точніше визначати концентрацію гентаміцину та знижувати кількість побічних продуктів. Ці нововведення спрямовані на підвищення ефективності виробництва гентаміцину, зниження собівартості препарату та покращення його терапевтичної ефективності.

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

1.1 Фізико-хімічні властивості гентаміцину *Micromonospora echinospora*

У культуральній рідині продуцента виявляється 16 компонентів, з яких 5 основних були позначені як гентаміцини А, В, С1, С2 і D. і 40% - С2 із сумарною формулою $C_{19}H_{38}N_5O_7$ і молекулярною масою 448-476. Добре розчинний у воді. Водні розчини стабільні протягом 2 тижнів при температурі від -15° до $+45^{\circ}$ С, витримують кип'ятіння та автоклавування при рН 2,0-14,0 [5].

Гентаміцин - аміноглікозидний антибіотик широкого спектру дії для клітинних культур, нетоксичний для вірусів і клітин ссавців на антибактеріальних рівнях. Пригнічує ріст грампозитивних і негативних бактерій, мікоплазми. Пригнічує нормальний синтез білка шляхом зв'язування з білком L6 50S рибосомальної субодиниці. Корисний антибіотик для систем експресії бакуловірусу, оскільки мутації в *trpF* перешкоджають зв'язуванню гентаміцину. Спричиняє неправильне зчитування коду шляхом зв'язування з 30S рибосомальною субодиницею, блокуючи транслокацію пептидил-тРНК з акцепторного сайту в донорний сайт [6].

Антибактеріальний проти грамнегативних аеробних бактерій, грампозитивних бактерій і мікоплазм. Використовується як агент селекції (ген стійкості до гентаміцину) у додатках молекулярної біології. Антибіотик із клітинної культури широкого спектру дії, нетоксичний для вірусів і клітин ссавців у антибактеріальних і проти мікоплазмових концентраціях. Завдяки своїй тривалій стабільності та повільному розвитку резистентності бактерій, він є корисним антибіотиком у довгострокових дослідженнях вірусів і культур тканин [7].

					НУХТ БТЕК 04.03.45 КР ПЗ			
Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Гребельна Д.Ю.				Розділ 1. Характеристика цільового продукту		Літ.	Арк.
Перевір.	Карлаш Ю.В.							11
Консультант								113
Н. Контр.							Кафедра БТМ	
Затверд.	Стабніков В.П.							

Гентаміцину сульфат - антибіотик-аміноглікозид, продукується *Micromonospora echinospora*. Агрегатний стан - аморфний порошок білого або злегка кремового кольору. Відносна молекулярна маса гентаміцину сульфату (Mr) - 575,67, емпірична формула - C₂₁H₄₅N₅O₁₁S. Хімічна назва сполуки-2-[4,6-діаміно-3-[3-аміно-6-(1-метиламіноетил)оксан-2-іл] окси-2-гідрокси - циклогексокси] -5 -метил-4-метиламінооксан -3,5- діолсульфат. Реєстраційні номери — CAS 1405-41-0, EINECS 215-778-9. Речовина добре розчинна у воді, практично нерозчинна в 96 % етанолі та органічних розчинниках [8].

1.2 Механізм біологічної дії гентаміцину *Micromonospora echinospora*

Дія гентаміцину полягає у зв'язуванні субодиниці 30S бактеріальної рибосоми, що негативно впливає на синтез білка. Антибіотик гентаміцин, що представлений у даній роботі належить до класу — аміноглікозиди. Аміноглікозиди - один із найдавніших класів протимікробних засобів. Як правило, молекула аміноглікозиду складається з двох або більше аміноцукрів, з'єднаних з ядром аміноциклітолу. Вони мають антибактеріальну активність широкого спектру дії проти грампозитивних та грамнегативних бактерій, мікобактерій та найпростіших [8].

Їх спосіб дії опосередковується зв'язуванням з аміноацильним сайтом (А-сайтом) бактеріальної 16S рибосомної РНК (рРНК), де вони переривають процес "перевірки", що забезпечує точність синтезу білка, на додаток до 50S рибосомна субодиниця, яка пригнічує транслокацію та рециркуляцію рибосом [3].

Дослідження біосинтетичного походження та шляхів для цього життєво важливого класу антибіотиків надзвичайно розвинулось протягом останнього десятиліття. На сьогодні ідентифіковано кластери біосинтетичних генів різних похідних аміноглікозидів, включаючи гентаміцин [9].

1.3 Використання та виготовлення гентаміцину *Micromonospora echinospora*

Гентаміцин високоефективний при інфекціях шкіри: фурункульозі, екзематозному дерматиті, інфікованих трофічних виразках та особливо опіках. Антибіотик призначають також при тяжкому перебігу змішаних інфекцій до визначення антибіотикограми збудників [10].

Гентаміцин застосовують внутрішньом'язово, внутрішньовенно, у порожнині, місцево, у виняткових випадках (за життєвими показаннями) – ендоліумбально. Для внутрішньом'язового введення використовують сульфат гентаміцину у вигляді готового розчину в ампулах або порошку у флаконах (0,08 г), до якого додають 2 мл води для ін'єкцій. Для внутрішньовенного введення використовують сульфат гентаміцину у вигляді готового розчину в ампулах. До разової дози препарату додають 5% розчин глюкози або ізотонічний розчин натрію хлориду і вводять дорослим в обсязі 200 мл, дітям - в 50-100 мл розчину 2 рази на добу зі швидкістю 60-80 крапель на хвилину. Тривалість внутрішньовенного введення 2-3 дні з наступним переходом на внутрішньом'язове лікування [11].

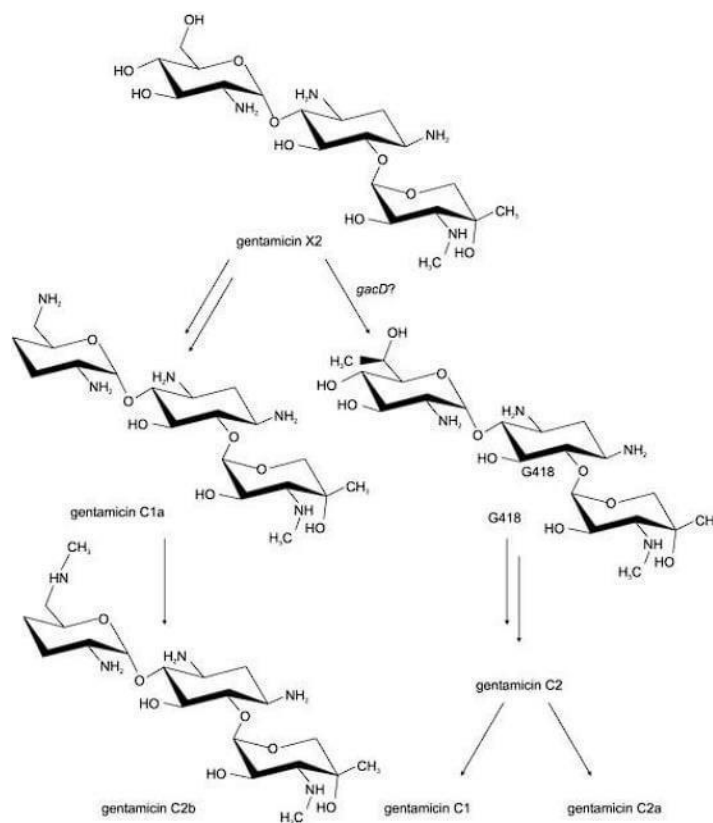


Рис.1.1 Частковий шлях біосинтезу гентаміцину [12]

Гентаміцину сульфат продукується культурами гриба *Micromonospora echinospora*. Білий порошок із кремовим відтінком, без запаху, гігроскопічний, легко розчиняється у воді. Водні розчини стійкі, витримують стерилізацію при температурі 1200 °C протягом 30 хв, а при кімнатній температурі зберігається кілька років, тому гентаміцин нерідко випускають у формі стерильного водного

розчину для ін'єкцій. Є найбільш активним та найменш токсичним аміноглікозидом із застосовуваних антибіотиків [1].

РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

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

Антибіотики на сьогоднішній день усе більше продовжують залишатися найважливішим ресурсом у глобальному лікуванні нових або вже існуючих інфекційних захворювань. Збільшення світових випадків резистентності патогенів людини до антибіотиків викликає глобальне занепокоєння, оскільки такі вторинні метаболіти неухильно втрачають ефективність у клінічних і реальних умовах. Незважаючи на зростання антибіотикорезистентності ринок таких лікарських засобів (якими і виступають антибіотики) досі залишається затребуваним [14, 15].

Гентаміцини є клінічно цінними аміноглікозидними антибіотиками, виділеними у вигляді комплексу гентаміцину С, що існує як суміш із п'яти компонентів, із нитчастої бактерії *Micromonospora echinospora* (раніше *Micromonospora echinospora*). Гентаміцини є інгібіторами синтезу білка, які зазвичай у лікувальній практиці використовуються для боротьби з грамнегативними бактеріальними інфекціями [16].

Під час аналізу широкодоступної літератури було виявлено, що найвищу кількість гентаміцину (табл. 2.1) синтезують бактеріальні штами роду *Micromonospora*, а саме *Micromonospora echinospora* CCTCC M 2018898-pYC004 (798 мг/л) [6], *M. echinospora* ATCC 15835 (ΔKΔP) (880 мг/л) [11], *M. echinospora* ATCC 15835 (SPU337) (861 мг/л) [12] та *M. echinospora* NRRL B-2995 (1500 мг/л) [13]. Склад поживних середовищ та умови культивування даних штамів відрізняються між собою.

На наступному етапі слід обрахувати вартість поживних середовищ обраних продуцентів гентаміцину, аби вибрати найоптимальніший із біологічних агентів (табл. 2.2). Опираючись на дані, зазначені у табл. 2.2, середовище для вирощування штаму CCTCC M 2018898-pYC004 є майже у 10 і 14 разів дешевшими, ніж для штамів NRRL B-2995 і ATCC 15835 (ΔKΔP).

					НУХТ БТЕК 04.03.45 КР ПЗ			
Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Розділ 2. Обґрунтування вибору біологічного агента			
Розроб.	Гребельна Д.Ю.							
Перевір.	Карлаш Ю.В.							
Консультант								
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							
					Літ.	Арк.	Акрушів	
							15	113
					Кафедра БТМ			

Таблиця 2.1

Особливості біосинтезу гентаміцину різними продуцентами

Біологічний агент	Склад поживного середовища:		Тривалість культивування, год	Концентрація гентаміцину, мг/л	Особливості процесу біосинтезу	Використана література
	компонент	концентрація, г/л				
1	2	3	4	5	6	7
<i>Micromonospora echinospora</i> CCTCC M 2018898-pYC004	Кукурудзяний крохмаль соєве борошно пептон KNO ₃ CaCO ₃ MgSO ₄ CoCl ₂	40 30 5 0,5 6 2 0,08	5 – 7 діб (120 – 168 год)	798	Культивування у колбах на качалці (t° = 34°C; n = 250 об/хв; pH = 6,8 – 7,0)	Chang Y., Chai B., Ding Y., He M., Zheng L., Teng Y., Liu T. Overproduction of gentamicin B in industrial strain <i>Micromonospora echinospora</i> CCTCC M 2018898 by cloning of the missing genes <i>genR</i> and <i>genS</i> . <i>Metabolic Engineering Communications</i> . 2019, 24 (9): e00096. doi: 10.1016/j.mec.2019.e00096.
<i>Micromonospora echinospora</i> ATCC 15835 (ΔKAP)	Крохмаль соєвий шрот глюкоза кукурудзяний порошок	50 35 15 15	5 діб (120 год)	880	Культивування у колбах на качалці (t° = 34°C; n = 220 об/хв)	Ni X., Sun Z., Gu Y., Cui H., Xia H. Assembly of a novel biosynthetic pathway for gentamicin B production in <i>Micromonospora echinospora</i> . <i>Microbial Cell Factories</i> . 2016, 15 (1). doi: 10.1186/s12934-015-0402-6.
<i>Micromonospora echinospora</i> ATCC 15835 (SPU337)	пептон KNO ₃ (NH ₄) ₂ SO ₄ NH ₄ Cl CoCl ₂ CaCO ₃	2 0,5 0,5 1 0,01 6		861 ± 35		Ni X., Sun Z., Zhang H., He H., Ji Z., Xia H. Genetic engineering combined with random mutagenesis to enhance G418 production in <i>Micromonospora echinospora</i> . <i>Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology</i> . 2014, 41 (9): 1383 – 1390. doi: 10.1007/s10295-014-1479-3.

Закінчення табл. 2.1

<i>Micromonospora echinospora</i> NRRL B-2995	Крохмаль	10	5 діб (120 год)	1500 мг/л	Культивування у колбах на качалці ($t^{\circ} = 34^{\circ}\text{C}$; $n = 200$ об/хв; $\text{pH} = 7,5$) Об'єм інокулята – 2%	Shaza Y. A. Qattan, Khattab A. A. Gentamicin production by cultural optimization system and genetically improved mutants of <i>Micromonospora echinospora</i> . Pharmacophore. 2020, 11 (1): 15 – 26.
	соєвий шрот	5				
	CaCO_3	4				
	K_2HPO_4	1				
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,03				
	CoCl_2	0,001				
	NaCl	0,6				

Таблиця 2.2

Вартість поживних середовищ для культивування продуцентів гентаміцину

Продуцент	Компонент поживного середовища	Концентрація у ПС, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації (1, 2, 3)*
1	2	3	4	5	6
Micromonospora echinospora CCTCC M 2018898-pYC004	Кукурудзяний крохмаль	40	49,2	1,968	1
	соєве борошно	30	65	1,95	2
	пептон	5	1060	5,3	3
	KNO ₃	0,5	135	0,0675	4
	CaCO ₃	6	164	0,984	5
	MgSO ₄	2	11	0,022	5
	CoCl ₂	0,08	700	0,056	6
Вартість 1 л середовища – 10,35 грн					
Micromonospora echinospora ATCC 15835 (ΔKΔP)	Крохмаль	50	23	1,15	5
	соєвий шрот	35	19	0,665	3
	глюкоза	15	53	0,795	5
	кукурудзяний порошок	15	556	8,34	7
	пептон	2	1060	2,376	3
	KNO ₃	0,5	135	0,0675	4
	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5	30	0,015	5
	NH ₄ Cl	1	50	0,05	5
	CoCl ₂	0,01	700	0,007	6
	CaCO ₃	6	164	0,984	5
Вартість 1 л середовища – 14,45 грн					
Micromonospora echinospora NRRL B-2995	Крохмаль	10	23	0,23	5
	соєвий шрот	5	19	0,095	3
	CaCO ₃	4	164	0,656	5
	K ₂ HPO ₄	1	97	0,097	5
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,03	107	0,003	8
	CoCl ₂	0,001	700	0,0007	6
	NaCl	0,6	20	0,012	5
Вартість 1 л середовища – 1,1 грн					

Примітка. * - Ціни наведено станом на лютий 2023 р. 1 –

<https://dekordlatorta.com.ua/ua/>, 2 – <https://ukrbee.ua/uk/>, 3 – <https://prom.ua/ua/>, 4 –

<https://agrokomora.com.ua/ua/>, 5 – <https://flagma.ua/>, 6 – <https://uleyshop.com/>, 7 –

<https://az-m.co.ua/ua/>, 8 – <http://www.arowana-im.com.ua/>.

Умовна вартість 1 г гентаміцину, синтезованого на різних поживних середовищах

Біологічний агент	Концентрація гентаміцину, мг/л	Тривалість культивування, год	Кількість утвореного гентаміцину за годину, мг/год	Вартість 1 л середовища, грн/л	Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г
1	2	3	4	5	6
Micromonospora echinospora NRRL B-2995	1500	120	12,5	1,1	0,73
Micromonospora echinospora ATCC 15835 (ΔKΔP)	880	120	7,33	14,19	16,13
Micromonospora echinospora CCTCC M 2018898-pYC004	798	168	4,75	10,35	12,97

Тому розрахунок умовної вартості 1 г синтезованого антибіотику є одним із ключових моментів у виборі найефективнішого біологічного агента. Результати, наведені у табл. 2.3, показують, що умовна вартість цільового продукту, синтезованого бактеріальним штамом *M. echinospora* NRRL B-2995, є найнижчою. Також суттєвими перевагами даного штаму є те, що кількість одержаного гентаміцину за 1 годину виробничого процесу є найвищою і тривалість культивування є найнижчою.

2.2. Перевірочний розрахунок складу поживного середовища для вирощування штаму *Micromonospora echinospora* NRRL B-2995 – продуцента гентаміцину

Тривалість культивування бактеріального штаму складає 120 год, концентрація синтезованого гентаміцину у культуральній рідині становить 1,5 г/л [13].

2.2.1. Розрахунок вмісту у середовищі джерела вуглецевого живлення

Потреба для синтезу гентаміцину. Крохмаль є джерелом вуглецю у процесі біосинтезу антибіотику гентаміцину. Проведемо розрахунок, скільки вуглецю

міститься у 1,5 г гентаміцину. Молекулярна маса даного антибіотику ($C_{21}H_{43}N_5O_7$) складає 477,6 [17]. Отже, у 477,6 г гентаміцину міститься 252 г Карбону, а в 1,5 г цільового продукту $(252 \cdot 1,5) / 477,6 = 0,8$ г Карбону.

На наступному етапі розрахуємо, у скількох грамах крохмалю міститься 0,8 г Карбону. Молекулярна маса крохмалю становить 162. Тому, у 162 г крохмалю міститься 72 г вуглецю, а 0,8 г Карбону міститься $1 (162 \cdot 0,8) / 72 = 1,8$ г крохмалю. Оскільки під час культивування мікроорганізмів на крохмалі близько 40 % субстрату використовується одержання енергії, необхідної для конструктивного метаболізму, вміст крохмалю у поживному середовищі складатиме $1,8 \cdot 0,4 + 1,8 = 2,52$ г/л.

Потреба для синтезу біомаси. Кількість крохмалю, необхідного для біосинтезу біомаси $= 10 - 2,52 = 7,48$ г. Оскільки під час вирощування продуценту на крохмалі близько 40 % субстрату використовується на «холосте окиснення» для одержання енергії, тому, щоб синтезувати необхідну кількість біомаси у середовище необхідно внести $x \cdot 0,4 + x = 31,5$ г; $x = 5,34$ г крохмалю. У такій кількості крохмалю міститься $5,34 \cdot 72 / 162 = 2,37$ г Карбону. У біомасі міститься 50 % вуглецю, тому 2,37 г такого елемента містить $2,37 \cdot 2 = 4,74$ г біомаси.

2.2.2. Розрахунок вмісту у середовищі джерела азотного живлення

Потреба для синтезу біомаси. Припустимо, що вміст азоту у біомасі складає 10%. Тому, у 4,74 г біомаси вміст Нітрогену становить 0,474 г. Бактеріальний продуцент гентаміцину здатен асимілювати як джерела азотного живлення аміний Нітроген. Такий тип азоту містить 43% білків, а до складу таких білків входить близько 16% Нітрогену.

Для біосинтезу гентаміцину застосовується поживне середовище, що в якості джерела амінного азоту містить соєвий шрот. Оскільки у 100 г білку міститься 16 г азоту, тоді у 0,474 г Нітрогену міститься $(100 \cdot 0,474) / 16 = 2,96$ г білку. У перерахунку на соєвий шрот отримуємо 6,88 г/л.

Потреба для синтезу гентаміцину. Слід провести розрахунок, скільки азоту міститься у 1,5 г антибіотику. Молекулярна маса даного антибіотику ($C_{21}H_{43}N_5O_7$)

складає 477,6. Отже, у 477,6 г гентаміцину міститься 70 г Карбону, а в 1,5 г цільового продукту $(70 \cdot 1,5) / 477,6 = 0,22$ г Нітрогену.

Оскільки у 100 г білку міститься 16 г азоту, тому 0,22 г азоту міститься у $(100 \cdot 0,22) / 16 = 1,375$ г білку. Перерахувавши на соєвий шрот у результаті отримаємо 3,2 г/л. Тому, загальний вміст даного компоненту у середовищі повинен становити $(6,88 + 3,2) = 10,1$ г/л.

2.2.3. Розрахунок вмісту Фосфору у поживному середовищі

Потреби для синтезу біомаси. У біомасі міститься близько 3% Фосфору. Тому, для синтезу 4,74 г/л біомаси вміст Фосфору у середовищі має складати $4,74 \cdot 0,03 = 0,142$ г/л. Джерелом Фосфору при виробництві гентаміцину виступає K_2HPO_4 . Розрахуємо кількість такої солі, необхідної для отримання 4,74 г/л біомаси. Молекулярна маса K_2HPO_4 складає 174. Отже, у 174 г гідроортофосфату калію міститься 31 г Фосфору, тоді 0,142 г Фосфору буде міститись у $(174 \times 0,142) / 31 = 0,8$ г солі. Для одержання 4,74 г/л біомаси вміст K_2HPO_4 у середовищі культивування повинен становити 0,8 г/л.

Інші компоненти середовища

Джерелами таких необхідних для росту бактеріального штаму елементів, як Кальцій, Калій, Ферум, Сульфур, Кобальт, Хлор є солі карбонату кальцію ($CaCO_3$), сульфату феруму ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$), хлоридів натрію і кобальту ($NaCl$ і $CoCl_2$), калію нітрату (KNO_3), які не здатні лімітувати ріст продуцента гентаміцину, оскільки такі компоненти вносять у середовище культивування у надлишку.

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

Micromonospora echinospora – грампозитивна бактерія, яка може утворювати міцелій (псевдоміцелій). Міцелій (псевдоміцелій) мікроорганізма розгалужений, добре розвинений, септований, діаметром 0,5-2 мм і більший - до 1 см. Нерухомі спори утворюються по одній, розташовані як на коротких, так і на довгих спороносцях. Наявні конідії. Виникнення спороносців моноподіальне або симподіальне, спорангії відсутні. Повітряний міцелій (псевдоміцелій) відсутній. Бактерії грампозитивні, некислотостійкі. [18]



Рис. 2.1 – *Micromonospora echinospora* [19]

Фрагментація міцелію (псевдоміцелію) являє собою особливу форму вегетативного розмноження. Розмноження актинобактерій відбувається через утворення безстатевих спор. Утворення субстратного міцелію актинобактеріями відбувається як в рідких, так і в твердих середовищах. Із проростаючої спори розвивається субстратний міцелій (псевдоміцелій). Міцелій (псевдоміцелій) розгалуженого субстрату моноподіальний. Спороутворення може відбуватися на субстраті та / або повітряному міцелії як одиничні клітини або в ланцюгах різної довжини.

Колонії *Micromonospora echinospora* на агаризованих середовищах ризоїдної форми, мають колір від теракотового до червоно-бурого, профіль припіднятий, зернисту, зморшкувату поверхню, в'язку консистенцію, уривчастий край, неправильної форми.

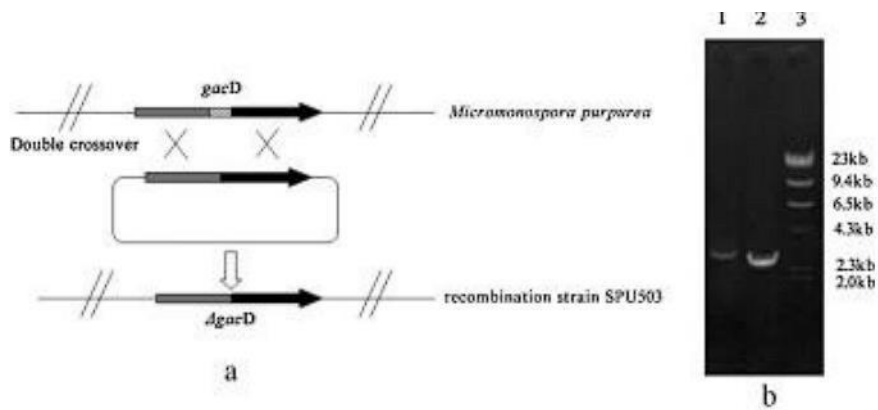


Рис.2.2.– Цільова інактивація генів у *Micromonospora echinospora*

Оптимальна температура росту колоній *Micromonospora echinospora* 27-34°C, найбільш буде оптимальна температура 29-30°C, тобто організм мезофіл. Мікроорганізм молоко не пептонізує і не коагулює. Крохмаль гідролізує. Желатин не розріджує.

Відношення до джерел вуглецю. Засвоює крохмаль, глюкозу, сахарозу, мальтозу, арабінозу, ксилозу; слабо – галактозу, фруктозу; рафінозу дуже слабо – лактозу; не засвоює маніт, інозит, рамнозу. Хемоорганотроф.

Відношення до кисню – аероб, оптимальне значення рН 7-7,4 - нейтрофіл, оптимальна вологість - 60%. Характерні фосфоліпіди – фосфатидилетаноламін, фосфатидилінозитол, фосфатидилінозитолманозиди.

Основні жирні кислоти – розгалужені ізо- та антеїзоструктури. Клітинна стінка містить мезо-діамінопімелінову кислоту, її 3-гідроксіпохідну **Меланоїдні пігменти**. Меланіни - це полімери з різноманітною молекулярною структурою, які зазвичай виглядають чорними або коричневими і утворюються в результаті окислювальної полімеризації фенольних та індольних сполук. Вони виробляються широким колом організмів, починаючи від бактерій і закінчуючи людиною.

Актинобактерії відомі виробленням пігментів, які можуть бути червоними, жовтими, оранжевими, зеленувато-коричневими, рожевими, коричневими, чітко вираженими коричневими, синіми або чорними, залежно від штаму, середовища використання та віку культури. Меланіни не є важливими для росту та розвитку

організмів, але вони грають значну роль в покращенні їх конкурентоспроможності та виживання.

2.4. Таксономічний статус біологічного агента

Класифікація мікроорганізму за визначником Берджі

Група 24. Актиноплани.

Надцарство: *Procaryota*

Царство: *Bacteria, Bacteriobiota*

Відділ: *Actinobacteria*

Клас: *Actinobacteria*

Підклас: *Actinobacteridae*

Порядок: *Actinomycetales*

Підпорядок: *Micromonosporineae*

Родина: *Micromonosporaceae*

Рід: *Micromonospora*

Вид: *echinospora*

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

3.1. Потреба в гентаміцині

Гентаміцин це аміноглікозидний антибіотик який проявляє бактерицидну дію проти аеробних грамнегативних бактерій, в результаті чого дана речовина нині використовується для лікування поширених інфекцій. Не зважаючи на наявні на сьогодні в світі повідомлення про поширення проблеми набутої резистентності мікроорганізмів, біологічні агенти з резистентними властивостями до антибіотиків, які мають аеробний або факультативний метаболізм, є чутливими до гентаміцину та інших представників антибіотиків аміноглікозидної групи [20]. Через згадані властивості починаючи з 1971 року Управління з продовольства і медикаментів США схвалило використання гентаміцину для лікування інфекційних захворювань спричинених *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter* spp., *Enterobacteriaceae* spp., *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus* [21].

Нині гентаміцин має понад 50 років клінічного досвіду, і на сьогодні він продовжує відігравати важливу роль у лікуванні та профілактиці інфекційних захворювань, через наявну меншу кількість побічних дій зафіксовану під час споживання даної речовини, невелику вартість даного засобу та зручність застосування.

Згідно інструкції гентаміцин використовують при наступних захворюваннях [22]:

- септицемія (включаючи неонатальний сепсис) (розчин для ін'єкцій, порошок);
- ускладнені урогенітальні інфекційні захворювання (розчин для ін'єкцій);
- інфекційні захворювання нижніх відділів дихальних шляхів(розчин для ін'єкцій);
- інфекційні захворювання шкіри, кісток, суглобів, м'яких тканин; інфіковані опікові рани (розчин для ін'єкцій, мазь, крем, порошок);
- інфекційні захворювання центральної нервової системи (включаючи менінгіт) у комбінації з β -лактамами антибіотиками (розчин для ін'єкцій);

					НУХТ БТЕК 04.03.45 КР ПЗ						
Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата							
Розроб.		Гребельна Д.Ю.			Розділ 3. Техніко- економічне обґрунтування			Літ.	Арк.	Акрушіє	
Перевір.		Карлаш Ю.В.								25	113
Консультант								Кафедра БТМ			
Н. Контр.											
Затверд.		Стабніков В.П.									

- інфекції черевної порожнини (включаючи перитоніт) (розчин для ін'єкцій).

Фармакодинаміка. Гентаміцин є антибіотиком групи аміноглікозидів з широким спектром дії. Механізм дії пов'язаний з інгібуванням рибосомальних субодиниць 30S. Тести *in vitro* підтверджують його активність відносно різних видів грампозитивних та грамнегативних мікроорганізмів: *Escherichia coli*, *Proteus* spp. (індолпозитивний та індолнегативний), *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Citrobacter* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp. і *Staphylococcus* spp. (включаючи пеніцилін- та метицилінрезистентні штами). Нижчеказані мікроорганізми, як правило, стійкі до гентаміцину: *Streptococcus pneumoniae*, більшість інших видів стрептококів, ентерококів, *Neisseria meningitidis*, *Treponema pallidum* та анаеробні мікроорганізми, такі як *Bacteroides* spp. або *Clostridium* spp [23].

Фармакокінетика. Максимальна концентрація у плазмі крові через 0,5–2 години після внутрішньом'язового введення 80 мг гентаміцину становить 4–12 мкг/мл. Подібні концентрації досягаються і після внутрішньовенного введення. Період напіввиведення — 2,5 години і підвищується при порушенні видільної функції нирок. Зв'язування з білками плазми становить 20–30%. Об'єм розподілу — 0,25 л/кг. У нормі гентаміцин погано проходить через гематоенцефалічний бар'єр, при менінгіті концентрація у спинномозковій рідині підвищується.

Гентаміцин проникає через плаценту. Концентрації, які спостерігаються у крові плода, становлять приблизно 40% концентрації, яка визначається у матері. Гентаміцин не метаболізується в організмі. Виводиться у незміненому вигляді з сечею, переважно шляхом гломерулярної фільтрації і частково — шляхом клубочкової секреції [23].

Курс лікування для вищезазначених захворювань в основному становить 7-10 діб, середньодобова доза гентаміцину складає 2-5 мг/кг маси тіла розділена на 3 введенні через кожні 8 год. В залежності від захворювання дозування гентаміцину

відрізняється, так при лікуванні пієлонефриту, уретриту, циститу та інших інфекцій сечовидільних шляхів застосовують 1,5 - 3 мг/кг маси тіла, при лікуванні інфекцій тканин а також при пневмонії застосовують 4,5 – 5,1 мг/кг маси тіла, а при тяжких інфекціях (сепсис, перитоніт, абсцес легень, менінгіт та інші) застосовують 6 мг/кг маси тіла. Для подальшого визначення потреби розглянемо статистичні дані кількості захворювання населення на певні типи хвороб.

Оскільки у вільному доступі не представлено точних даних щодо захворюваності населення України по різних групам хвороб [24], будемо опиратися на дані європейських досліджень. Станом на 10 травня 2022 року науковці, щоб краще оцінити частоту найпоширеніших шкірних захворювань або захворювань у 27 європейських країнах, провели популяційне дослідження. Загалом було 44 689 респондентів, з яких 21 887 (48,98%) ідентифікували себе як чоловіків і 22 802 (51,02%) як жінок. Трохи більше 40% учасників повідомили, що мали принаймні 1 дерматологічний стан або захворювання протягом останніх 12 місяців. Екстраполюючи ці дані на популяцію, дослідники можуть оцінити, що 185 103 774 особи мали принаймні 1 дерматологічний стан або захворювання [25].

Із представленої кількості хворих, приймемо, що для України кількість пацієнтів становитиме 0,1%, а саме 185 104 особи. Серед означеної групи хворих лише 64% будуть використовувати ін'єкційну форму гентаміцину. Тому як кількість випадків, що потребують лікування хвороб шкіри та підшкірної клітковини становить $185104 \times 0,64 = 118\,466$.

Так як не можливо дізнатись точну вагу кожного пацієнта з наведених даних для розрахунку візьмемо середнє значення ваги, згідно даних Державної служби статистики України середня вага чоловіків становить 80 кг, а жінок 71 кг [26]. Визначити кількість жінок і чоловіків в дані кількості випадків також неможливо, тому для подальших розрахунків приймемо середнє значення даних показників: $(80 + 71) / 2 = 75,5$ кг, для зручності подальших розрахунків приймемо 75 кг.

Узагальнені дані потреби в гентаміцині для лікування захворювань шкіри та підшкірної клітковини, представлено в табл. 3.2. Як попередньо зазначалося, лікування представлених захворювань проходить шляхом застосування

антибіотику у формі розчину для ін'єкцій, тому для подальших розрахунків обираємо саме її.

Таблиця 3.1

**Потреба гентаміцину, що планується до випуску у формі розчину для ін'єкцій,
для лікування захворювань**

Захворювання	Кільк. випадків	Доз. гентаміцину	Термін прийому препарату	Середня вага пацієнта	Кількість спожитого гентаміцину*
Хвороби шкіри та підшкірної клітковини	118 466	4,5 мг/кг маси /день	8 діб	75 кг	319,859 кг
Разом:					319,859 кг

Примітка: * розрахунок проводився по мінімальному дозуванні препарату на кг маси тіла

З даних наведених в табл. 3.2, можна дійти висновку що теоретична річна потреба в гентаміцині, що буде використовуватись у формі розчину для ін'єкцій, становить 319,859 кг (≈ 320 кг), для лікування всього можливого спектру дерматологічних захворювань.

3.2. Розрахунок потужності виробництва гентаміцину

Дізнавшись загальну потребу гентаміцину розглянемо наявні на ринку препарати які мають дану речовину в якості діючої речовини. За даними Державного реєстру лікарських засобів України [27] на ринку представлена невелика кількість препаратів гентаміцину у формі розчину для ін'єкцій, табл. 3.2.

Лікарські засоби з діючою речовиною гентаміцин у формі розчину для ін'єкцій, зареєстровані в Україні

Назва препарату	Лікарська форма препарату	Склад діючих речовин	Компанія-виробник
ГЕНТАМІЦИНУ СУЛЬФАТ	розчин для ін'єкцій, 40 мг/мл по 2 мл в ампулі; по 10 ампул у контурній чарунковій упаковці; по 1 контурній чарунковій упаковці в пачці; по 2 мл в ампулі; по 10 ампул у контурній чарунковій упаковці, запаяній папером	1 мл містить гентаміцину сульфату (в перерахуванні на гентаміцин та безводну речовину) 40 мг	ПАТ "Галичфарм", Україна
ГЕНТАМІЦИН ДС	розчин для ін'єкцій, 40 мг/мл по 1 мл або 2 мл в ампулі, по 10 ампул в контурній чарунковій упаковці та картонній пачці	1 мл розчину містить гентаміцину сульфат - 40 мг	ВЕТПРОМ АД, Республіка Болгарія
ГЕНТАМІЦИН- ЗДОРОВ'Я	розчин для ін'єкцій, 40 мг/мл, по 1 мл або по 2 мл в ампулі; по 10 ампул у картонній коробці; по 1 мл або по 2 мл в ампулі; по 5 ампул у блістері; по 2 блістери в картонній коробці; по 2 мл в ампулі; по 10 ампул у блістері; по 1 блістеру в картонній коробці	1 мл розчину містить гентаміцину сульфату у перерахуванні на гентаміцин 40 мг	Товариство з обмеженою відповідальністю "Фармацевтична компанія "Здоров'я", Україна
ГЕНТАМІЦИНУ СУЛЬФАТ- ДАРНИЦЯ	розчин для ін'єкцій, 40 мг/мл, по 2 мл в ампулі; по 5 ампул в у контурній чарунковій упаковці; по 2 контурні чарункові упаковки в пачці	1 мл розчину містить гентаміцину сульфату 40 мг	ПрАТ "Фармацевтична фірма "Дарниця", Україна

Розглянувши кількість препаратів які вміщують гентаміцин, можна дійти висновку що на ринку України наявні жорсткі конкуруючі умови, а враховуючи наявні різні лікарські форми, можна зробити висновок, що оптимальним варіантом буде виробництво гентаміцину в формі розчину для ін'єкцій так як препарату даної форми на ринку найменше (відповідно до даних Державного реєстру ЛЗ України [27]). Враховуючи що в основному крем, мазь та порошок використовується для зовнішнього використання при хворобах шкіри та підшкірної клітковини, для подальшого розрахунку річної потужності виробництва потрібно виключити кількість гентаміцину необхідну для лікування даних захворювань з загально розрахованого значення потреби гентаміцину.

Серед наявних на ринку України препаратів гентаміцину у формі розчину для ін'єкцій, приблизно 75 % препаратів є українського виробництва, тому враховуючи дану кількість перевірених вітчизняних препаратів, доцільно прийняти що можливе покриття препаратом становитиме 20 % від загальної потреби. Отже, річна потужність виробництва становитиме:

$$320 \text{ кг} * 0,2 = 64 \text{ кг гентаміцину}$$

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

Річна потужність виробництва гентаміцину: $G_{\text{гп}} = 64 \text{ кг/рік}$;

Кількість робочих днів: $T_{\text{рд}} = 60$ трудоднів. Залишкові робочі дні будуть використані для щорічного технічного огляду обладнання, обслуговування та виробництва інших антибіотиків;

Частка сухих речовин в готовому продукті: $CP_{\text{гп}} = 0,9$;

Концентрація гентаміцину в культуральній рідині: 1,5 г/л (синтез відбувається культивуванням *Micromonospora echinospora* NRRL B-2995 [27]);

Час виробничого циклу: $T_{\text{цф}} = 130$ год (120 год культивування + 10 год підготовка ферментера);

Коефіцієнт запасу нестерильних операцій: $K_1 = 1,1$;

Коефіцієнт заповнення ферментера: $K_3 = 0,6$;

Втрата продукту при виділенні: $E_{св} = 0,3$ (етапи виділення включають фільтрування, іонообмінну сорбцію, ультрафільтрацію та сушіння концентрату);

Втрата культуральної рідини при крапловиносі: $E_{\phi} = 0,1$.

Враховуючи заплановану кількість трудоднів та час виробничого циклу, кількість виробничих циклів за рік становитиме:

$$N_{\text{цк}} = 24 \times T_{\text{рд}} / T_{\text{цф}} = 24 \times 60 / 130 = 11 \text{ циклів}$$

Визначивши кількість виробничих циклів, розрахуємо кількість продукту, яка утворюється за даний один виробничий цикл:

$$G_{\text{цк}} = G_{\text{гп}} / N_{\text{цк}} = 64 / 11 = 5,82 \text{ кг/цикл}$$

Розрахувавши кількість продукту яка отримується за один цикл, врахуємо кількість культуральної рідини з врахуванням втрат при виділенні, необхідної для отримання даної кількості продукту.

$$V_{\text{кр}} = K_1 \times G_{\text{цк}} \times C_{\text{гп}} / P_{\text{кр}} (1 - E_{св}) = 1,1 \times 5,82 \times 0,9 / (1,5 \times (1 - 0,3)) = 5,48 \text{ м}^3$$

За один виробничий цикл отримують $5,48 \text{ м}^3$ культуральної рідини, так як під час ферментації відбуваються втрати культуральної рідини в результаті краплевиносу, кількість культуральної рідини з врахуванням даних втрат, становитиме:

$$V_{\phi} = V_{\text{кр}} / (1 - E_{\phi}) = 5,48 / (1 - 0,1) = 6,08 \text{ м}^3$$

З врахуванням коефіцієнту заповнення, приблизний геометричний об'єм ферментера становитиме:

$$V_{\text{пф}} = V_{\phi} / K_3 = 6,08 / 0,6 = 10,13 \text{ м}^3$$

Приймаємо найближчий ферментер з стандартним геометричним об'ємом 10 м^3 , тоді дійсний коефіцієнт заповнення становитиме:

$$K_{3\phi} = V_{\text{кр}} / V_{\text{пф}} = 6,08 / 10 = 0,608$$

Дане значення коефіцієнту заповнення, знаходиться в допустимих межах для аеробного процесу ферментації, отже, обраний ферментер задовольняє наші вимоги.

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

За один виробничий цикл отримуємо $V_{\text{пц}} = 5,48 \text{ м}^3$ культуральної рідини. Під час отримання культуральної рідини необхідно передбачити втрати КР в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря ($E_{\text{ф}}$), які становлять 10%.

Отже, кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом становитиме:

$$V_{\text{роб.1}} = \frac{V_{\text{пц}}}{1-E_{\text{ф}}} = \frac{5,48}{1-0,1} = 6,08 \text{ м}^3$$

Робочий об'єм ферментера складається з суми об'єму поживного середовища (ПС) $V_{\text{пс1}}$ та об'єму посівного матеріалу (ПМ) $V_{\text{пм1}}$.

Посівний матеріал готується в посівному апараті (ПА) та його об'єм дорівнює 2 % від об'єму поживного середовища [28] який подається до ферментера:

$$V_{\text{пс1}} = V_{\text{роб1}} / (1 + X_{\text{пм1}}) = 6\,080 / (1 + 0,02) = 5\,960 \text{ л}$$

$$V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб1}} - V_{\text{пс1}} = 6\,080 - 5\,960 = 120 \text{ л}$$

Розрахунок кількості ПС та ПМ для посівного апарату

Посівний матеріал для ферментера об'ємом 120 л готується у посівному апараті з робочим об'ємом $V_{\text{роб2}}$

$$V_{\text{роб2}} = V_{\text{пм1}} / (1 - E_{\text{пм}}) = 120 / (1 - 0,13) = 138 \text{ л}$$

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 $V_{\text{пс2}}$ та кількість посівного матеріалу який становить 10% від об'єму поживного середовища $V_{\text{пс2}}$

$$V_{\text{пс2}} = V_{\text{роб2}} / (1 + X_{\text{пм2}}) = 138 / (1 + 0,1) = 125,5 \text{ л}$$

Об'єм посівного матеріалу

$$V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб2}} - V_{\text{пс2}} = 138 - 125,5 = 12,5 \text{ л}$$

Для визначення приблизного геометричного об'єму посівного апарата $V_{\text{па1}}$ використовуємо $V_{\text{роб2}}$ та $K_{\text{зап}}$ – коефіцієнт заповнення = 0,6;

$$V_{\text{па1}} = V_{\text{роб2}} / K_{\text{зап}} = 138 / 0,6 = 230 \text{ л}$$

Дану кількість посівного матеріалу *Micromonospora echinospora* NRRL B-2995 можна отримати при культивуванні в посівному апараті з геометричним об'ємом $V_{\text{па}} = 0,25 \text{ м}^3$.

Тоді дійсний коефіцієнт заповнення буде

$$K_{\text{зап2}} = V_{\text{роб2}} / V_{\text{па}} = 138 / 250 = 0,55, \text{ що допустимо.}$$

Розрахунок ПС та ПМ для інокулятора

Посівний матеріал для посівного апарата $0,25 \text{ м}^3$ готується в інокуляторі з робочим об'ємом $V_{\text{роб3}}$

$$V_{\text{роб3}} = V_{\text{пм3}} / (1 - E_{\text{пм3}}) = 12,5 / (1 - 0,05) = 11,55 \text{ л},$$

де $E_{\text{пм3}} = 0,05$ — це втрати КР при вирощуванні посівного матеріалу в інокуляторі за рахунок краплиноносу частини КР під час аерації середовища. Для одержання посівного матеріалу $V_{\text{пс4}}$ потрібно мати наступний об'єм поживного середовища $V_{\text{пс3}}$ та кількість посівного матеріалу, яка дорівнює 10% від об'єму поживного середовища $V_{\text{пс3}}$

$$V_{\text{пс3}} = V_{\text{роб3}} / (1 + X_{\text{пм3}}) = 11,55 / (1 + 0,1) = 10,5 \text{ л}$$

Об'єм посівного матеріалу:

$$V_{\text{пм3}} = V_{\text{роб3}} - V_{\text{пс3}} = 11,55 - 10,5 = 1,05 \text{ л}$$

Для визначення приблизного геометричного об'єму інокулятора $V_{\text{ін1}}$ використовуємо $V_{\text{роб3}}$ та $K_{\text{зап}}$ — коефіцієнт заповнення = 0,6;

$$V_{\text{ін1}} = V_{\text{роб3}} / K_{\text{зап}} = 11,55 / 0,6 = 19,25 \text{ л}$$

Дану кількість посівного матеріалу *Micromonospora echinospora* NRRL B-2995 можна отримати при культивуванні в інокуляторі з геометричним об'ємом $V_{\text{ін1}} = 25 \text{ л}$.

Тоді дійсний коефіцієнт заповнення буде

$$K_{\text{зап1}} = V_{\text{роб3}} / V_{\text{ін}} = 11,55 / 25 = 0,46, \text{ що допустимо.}$$

Розрахунок кількості ПС та ПМ для качалочних колб

Кількість посівного матеріалу, що готується в колбах на качалці $V_{\text{пм3}} = 1,19 \text{ л}$. Втратами при культивуванні в колбах нехтуємо, оскільки вони малі.

$$V_{\text{роб4}} = V_{\text{пм3}} = 1,05 \text{ л}$$

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

$$V_{\text{пс4}} = V_{\text{роб4}} / (1 + X_{\text{пм4}}) = 1,05 / (1 + 0,1) = 0,95 \text{ л}$$

Об'єм посівного матеріалу

$$V_{\text{пм4}} = V_{\text{роб4}} - V_{\text{пс4}} = 1,05 - 0,95 = 0,1 \text{ л}$$

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

Кількість колб

$$N_{\text{к}} = V_{\text{роб4}} / V_{\text{кол}} \times K_{\text{зап}} = 1,05 / 0,75 \cdot 0,2 = 7 \text{ колб}$$

Підсумовуючи можна зазначити, що процес одержання посівного матеріалу для синтезу гентаміцину у ферментері об'ємом 10 м^3 і з коефіцієнтом заповнення 0,6 буде проходити у три етапи.

Таблиця 3.3

Об'єми апаратів для стадії підготовки посівного матеріалу *M. echinospora* NRRL B-2995 та виробничого біосинтезу гентаміцину

№ стадії	Геометричний об'єм ферментера, $V_{\text{г}}$, л	Коефіцієнт заповнення, $K_{\text{зап}}$, частка	Робочий об'єм ферментера, $V_{\text{роб}}$, л	Об'єм ПС, $V_{\text{пс}}$, л	Об'єм ПМ, $V_{\text{пм}}$, л
1	$0,750 \times 7$ колб	0,2	1,05	0,95	0,1
2	25	0,46	11,55	10,5	1,05
3	250	0,55	138	125,5	12,5
5	10 000	0,6	6 080	5 960	120

РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента

Ростовим субстратом для біосинтезу гентаміцину за допомогою *Micromonospora echinospora* є крохмаль. Крохмаль розкладається до глюкози. Оскільки у Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes відсутня інформація про шляхи катаболізму ростового субстрату у *Micromonospora echinospora*, обираємо близькоспоріднений мікроорганізм *Streptomyces fradiae* для опису метаболізму.

Згідно з KEGG, катаболізм крохмалю у *Streptomyces fradiae* розпочинається з його розкладання під дією α -амілази до декстринів, а потім до мальтози і, нарешті, до D-глюкози. Глюкоза під дією гексокінази (КФ 2.7.1.1) перетворюється на глюкозо-6-фосфат, який далі перетворюється на фруктозо-6-фосфат за участю глюкозо-6-фосфатізомерази (КФ 5.3.1.9). Фосфофруктокіназа (КФ 2.7.1.11) перетворює фруктозо-6-фосфат на фруктозо-1,6-бісфосфат, який розщеплюється фруктозо-бісфосфат альдолазою (КФ 4.1.2.13) на гліцеральдегід-3-фосфат та діоксіацетонфосфат. Останній під дією тріозофосфатізомерази (КФ 5.3.1.1) перетворюється на гліцеральдегід-3-фосфат.

Гліцеральдегід-3-фосфат під дією гліцеральдегідфосфатдегідрогенази (КФ 1.2.1.12) перетворюється на 1,3-бісфосфогліцерат, який далі піддається перетворенню на 3-фосфогліцерат під дією фосфогліцераткінази (КФ 2.7.2.3). Після цього 3-фосфогліцерат під дією фосфогліцератмутази (КФ 5.4.2.12) перетворюється на 2-фосфогліцерат, який під дією енолази (КФ 4.2.1.11) переходить у фосфоенолпіруват. Фосфоенолпіруват під дією піруваткінази (КФ 2.7.1.40) перетворюється на піруват. [29,30]

					НУХТ БТЕК 04.03.45 КР ПЗ						
Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата							
Розроб.	Гребельна Д.Ю.				Розділ 4. Біосинтез цільового продукту			Літ.	Арк.	Акрушіє	
Перевір.	Карлаш Ю.В.								35	113	
Консультант								Кафедра БТМ			
Н. Контр.											
Затверд.		Стабніков В.П.									

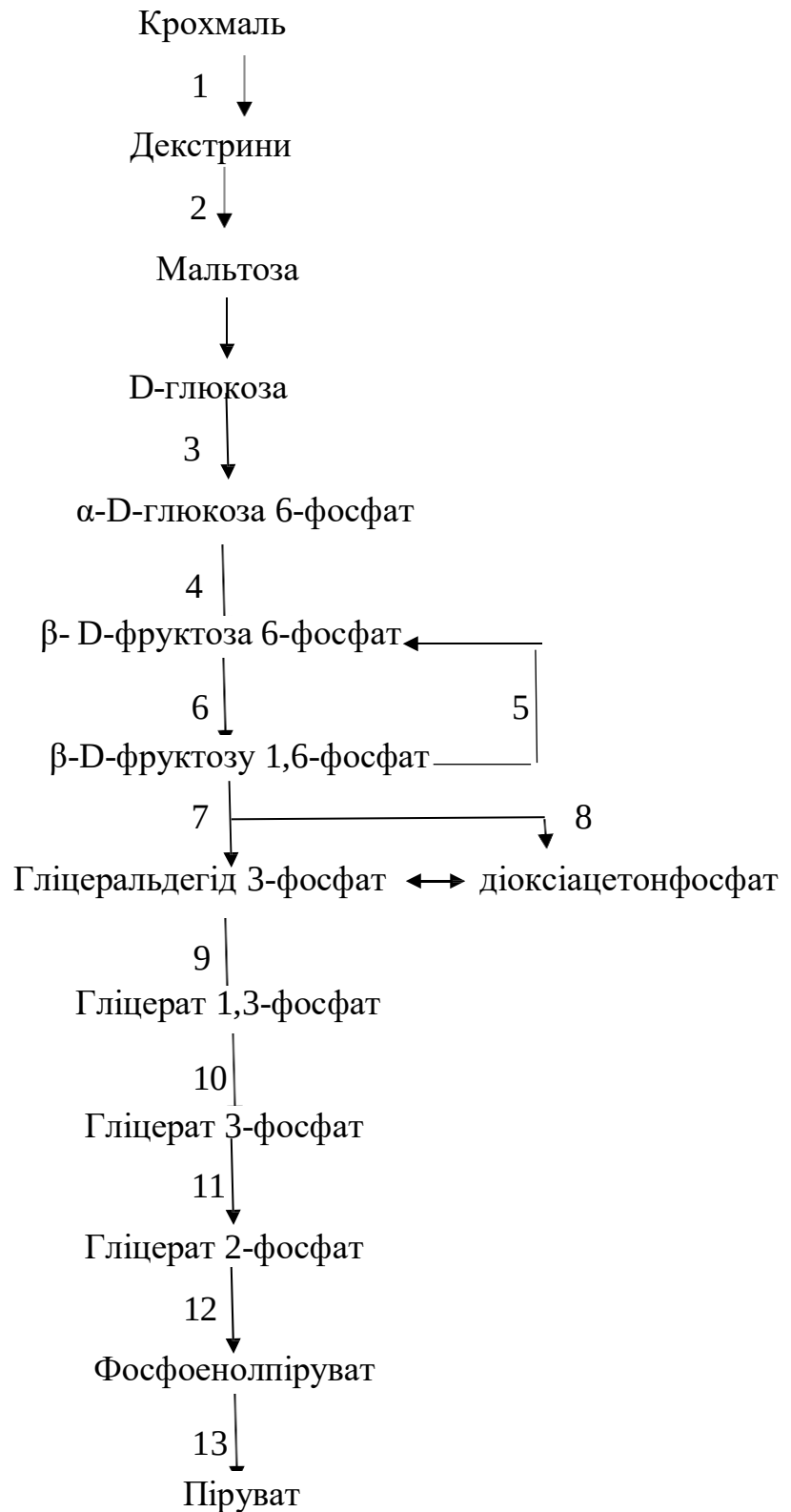


Рис 4.1. Катаболізм глюкози. Шлях Ембдена-Меейргофа-Парнаса

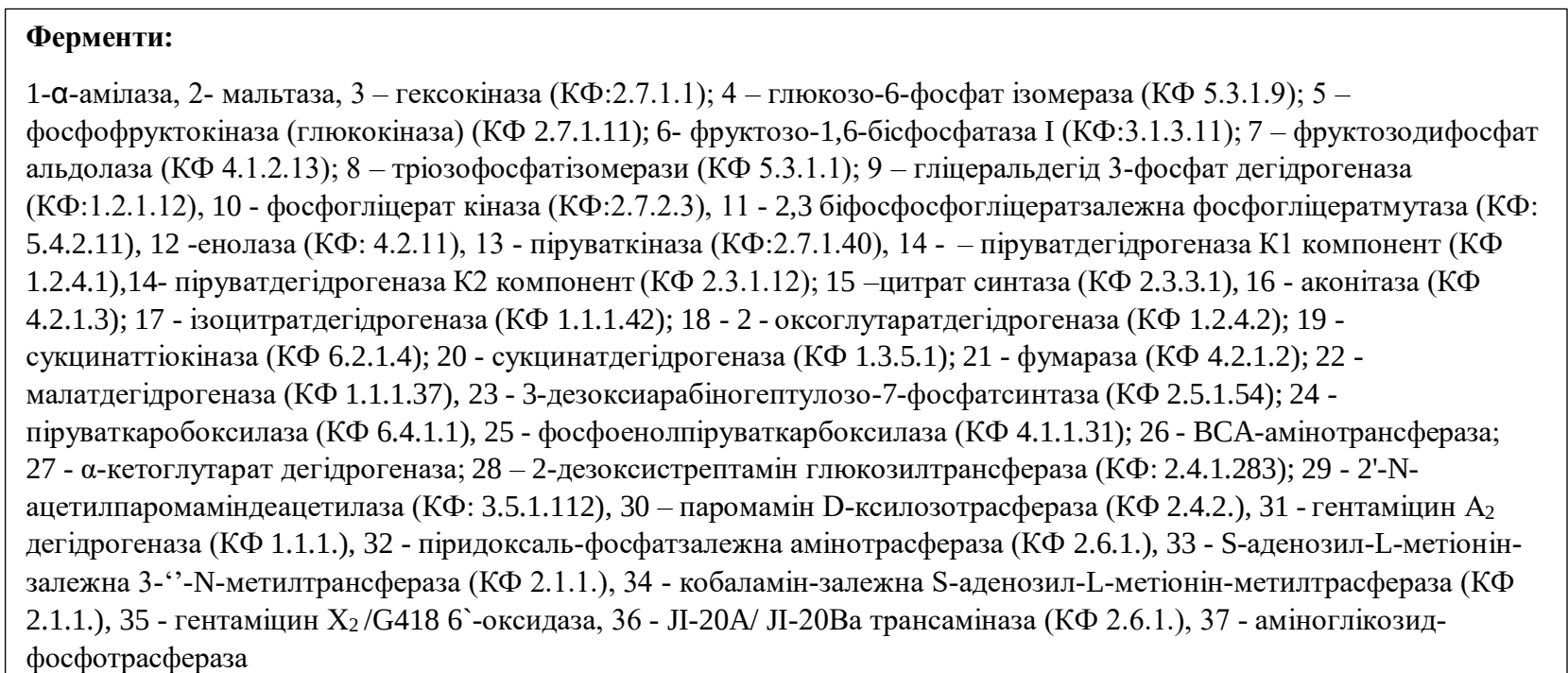
4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт

Під час росту *Micromonospora echinospora* з використанням крохмалю як джерела вуглецю в результаті його катаболізму утворюється ацетил-КоА. Далі ацетил-КоА залучається до циклу трикарбонових кислот (ЦТК).

Гентаміцин належить до антибіотиків аміноглікозидів II покоління. До складу гентаміцину С1 входить аміноцитол 2-дезоксистрептамін, який зв'язаний у 4 положенні з гарозаміном та у 6 положенні з іншим гексозаміном (пурпурозаміном).

З паромаміну і УДФ-D-ксилози за участю паромамін D-ксилозитрансферази (КФ 2.4.2.) утворюється гентаміцин А2, який під дією гентаміцин А2 дегідрогенази (КФ 1.1.1.) трансформується у 3''-оксо-гентаміцин А2. Останній у свою чергу в реакції трансамінування з L-глутаматом як донором аміногрупи перетворюється на 3''-аміно-3''-дезоксигентаміцин А2 (фермент піридоксаль-фосфатзалежна амінотрансфераза КФ 2.6.1.). З 3''-аміно-3''-дезоксигентаміцину А2 і S-аденозил-L-метіоніну як донором метильної групи за участю S-аденозил-L-метіонін-залежної 3-''-N-метилтрансферази (КФ 2.1.1.) утворюється гентаміцин А.

З гентаміцину А і S-аденозил-L-метіоніну як донором метильної групи за участю кобаламін-залежної S-аденозил-L-метіонін-метилтрансферази (КФ 2.1.1.) утворюється гентаміцин Х2, який під дією гентаміцин Х2/G418 6'-оксидази окиснюється до 6'-оксогентаміцину Х2. У наступній трансаміназній реакції з L-глутаматом як донором аміногрупи 6'-оксогентаміцин Х2 трансформується в антибіотик ЛІ-20А (фермент ЛІ-20А/ЛІ-20Ва трансаміназа КФ 2.6.1.). Реакція перетворення антибіотика ЛІ-20А на гентаміцин С1А каталізується аміноглікозид-фосфотрансферазою. [29,30]



РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

5.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

5.1.1. Вибір умов і способу культивування *M. echinospora* NRRL B-2995 – продуцента гентаміцину

Оптимальний вибір умов і способу культивування обраного продуцента суттєво залежать від його фізіолого-біохімічних особливостей.

1. Оскільки актиноміцетний продуцент *M. echinospora* є аеробним мікроорганізмом [31], необхідною є попередня підготовка стерильного аераційного повітря.

2. Зважаючи на температурний режим (34 °C) і рН (7,5), за яких здійснюється виробництво гентаміцину [13], а також вирощування інокуляту, потрібним є забезпечення асептичних умов. У такому рішенні є необхідність, оскільки за вище вказаних умов мають здатність рости більшість мезофільних і нейтрофільних мікроорганізмів, що несуть ризик сторонньої контамінації. Асептичність умов забезпечується шляхом дезінфекції та стерилізації обладнання і комунікацій, стерилізації поживних середовищ і повітря.

3. Відповідно до фізіолого-біохімічних ознак продуцента, а також високого ризику контамінації, обираємо глибинний спосіб культивування. Також для такого способу характерне більш раціональне споживання компонентів поживного середовища, що важко забезпечити для поверхневого типу.

					НУХТ БТЕК 04.03.45 КР ПЗ							
Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Розділ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми			Літ.	Арк.	Акрушів		
Розроб.	Гребельна Д.Ю.										39	113
Перевір.	Карлаш Ю.В.											
Консультант								Кафедра БТМ				
Н. Контр.												
Затверд.	Стабніков В.П.											

4. Виробництво гентаміцину здійснюють як періодичним, так і безперервним способами. Але, оскільки антибіотики є вторинними метаболітами, біосинтез яких проходить одночасно із ростом продуцента, але максимальна концентрація таких продуктів досягається під час стаціонарної фази росту, обираємо саме періодичний спосіб культивування. Тому постійне підтримання штаму-продуцента в експоненційній фазі росту є недоцільним (що є характерним для безперервного способу), оскільки у цьому разі характерним є зниження концентрації антибіотику у культуральній рідині.

Отже, культивування *M. echinospora* NRRL B-2995 – продуцента гентаміцину здійснюється періодично глибинним способом шляхом забезпечення аеробних умов із дотриманням загальної стерильності.

5.1.2. Вибір типу ферментера для культивування *M. echinospora* NRRL B-2995 – продуцента гентаміцину

Конструкція та оснащення ферментаційного обладнання суттєво залежать від умов культивування продуцента. Зважаючи на інформацію викладену у попередньому підрозділі, фізіолого-біохімічні ознаки *M. echinospora* NRRL B-2995, обираємо тип та оснащення ферментера, що дозволять здійснити виробничий біосинтез за оптимальних умов.

1. Відповідно до інформації, наведеної вище (див. підрозділ 3.1), необхідним є забезпечення аерації очищеним повітрям. Аерація здійснюється шляхом подачі повітря через барботер, який є обов'язковою деталлю ферментера. Також біореактор повинен містити газоаналізатор для підтримки концентрації розчиненого кисню на прийнятному рівні.

2. Оскільки процес ферментації проходить за 34 °C і рН 7,5, біореактор повинен бути оснащений датчиками температури і рН для безперервного контролю даних показників.

3. З метою інтенсифікації масообмінних процесів та збільшення гомогенізації культуральної рідини, встановлюють перемішуючий пристрій із частотою обертів 200 об/хв. Оскільки актиноміцетний продуцент здатен до утворення повітряного міцелію [31], використання лопатевої мішалки не є доцільним через її здатність

«розривати» такий міцелій (псевдоміцелій). Тому зупиняємо свій вибір на встановленні аероліфтної мішалки.

4. Під час культивування можливим є утворення великої кількості піни. Для цього використовуємо механічний спосіб її гасіння, принцип дії якого полягає у додатковому встановленні перемішуючого пристрою у верхній частині ферментера. Таким чином, за наявності у ферментері датчика піни, від якого відбуватиметься подача сигналу, мішалка буде обертатися і розбивати утворювану піну.

Зважаючи на широке використання цільового продукту у медицині в якості лікарського препарату, слід обирати ферментер об'ємом 10 – 25 м³ для забезпечення якнайбільшого кола людей даним антибіотиком. Ферментер із такими розмірами можна придбати на замовлення у фірми «Solaris» [32]. Дана фірма випускає високоавтоматизовані біореактори об'ємом 250 л – 30 м³ зі зручним програмним забезпеченням. Значна перевага таких ферментерів – вбудована автоматична стерилізація типу SIP.

5.2. Обґрунтування використання стадій підготовки стерильного повітря

Оскільки актиноміцетний продуцент *M. echinospora* є аеробним мікроорганізмом [33], а також процес біосинтезу гентаміцину здійснюється в асептичних умовах, тому необхідним є етап попередньої підготовки стерильного аераційного повітря.

У мікробіологічних боксах та лабораторіях, де здійснюється підготовка інокуляту та поживного середовища для вирощування культури у колбах на качалці, стерилізація повітря проходить у процесі опромінення ультрафіолетовими променями. Задля цього використовують УФ-лампи.

Процес підготовки стерильного аераційного повітря для вирощування інокуляту у посівних апаратах та виробничого біосинтезу включає в себе такі послідовні етапи:

1. *Забір атмосферного повітря.* Відповідний процес здійснюється через забірну шахту, за використання турбокомпресора. Даний етап проходить на висоті 2-3 метри від найвищої точки будівлі, отже, на висоті близько 16 метрів, при цьому

враховуючи висоту поверху (6 м), кількість поверхів (2), і косий дах будівлі (приблизно 1,5 м).

2. *Проходження повітря через фільтри попереднього очищення.* На такому етапі відділяється великий аерозоль, зокрема пил. Фільтри попереднього очищення не тільки захищають компресори від забруднення, а й істотно знижують кількість контамінантів, які могли б потрапити до наступної підсистеми [34]. В якості фільтрів попереднього очищення можна використати також губчаті фільтри з модифікованого пінополіуретану. Ефективність уловлювання атмосферного пилу на пінополіуретані становить 50-85 %, його пилоємність - 0,2 кг/м². Гранична робоча температура використання пінополіуретану дорівнює 121 °С [35].

3. *Стиснення повітря.* Далі повітря стискається у турбокомпресорі, у якому такий процес відбувається під дією відцентрової сили. Відповідні апарати більш складні в обслуговуванні, але мають високу продуктивність (від 100 до 1000 м³/хв) і не забруднюють повітря маслом [34,35]. Стиснення відбувається до тиску в діапазоні від 0,35 до 0,5 МПа, що призводить до підвищення температури повітря (від 120 до 250 °С) і збільшення його вологості на одиницю об'єму.

4. *Охолодження стисненого повітря.* Аби в подальшому запобігти уникненню злипання волокон і утворення каналів, вологу в повітрі видаляють у спеціальному апараті – краплевловлювачі, тим самим охолоджуючи повітря за допомогою теплообмінного апарату.

5. *Підігрів повітря.* Повітря на наступній стадії проходить етап підігріву у теплообмінниках.

6. *Видалення зайвої вологи.* Конденсована волога, що потрапила з компресора, видаляється за допомогою ресивера. Також на такому етапі проходить процес вирівнювання тиску попередньо очищеного повітря [34].

7. *Очищення повітря на головних фільтрах.* Відповідний етап дозволяє досягти видалення до близько 98% можливих мікроорганізмів. Широкого поширення у якості фільтруючого матеріалу головних фільтрів одержали волокнисті матеріали. Волокнисті фільтри є фільтрами об'ємної дії, тому що вони розраховані на

вловлювання й нагромадження часток не тільки на поверхні фільтруючого матеріалу, але й і глибині шару [35].

8. *Очистка повітря за допомогою індивідуальних фільтрів.* Від головних фільтрів повітря направляється через колектори до індивідуальних фільтрів третього рівня, які встановлені безпосередньо на кожному ферментері і здатні затримати до 99,999% мікроорганізмів [34]. Наприклад, Фірма «Балстон» (Великобританія) випускає фільтри для повітря у вигляді трубок товщиною 3 мм із мікрОВОЛОКОН боросилікатного скла, зв'язаних епоксигумою, володіють високою пропускнуою здатністю та мають дуже широкий спектр стійкості до різних хімічних речовин. Цей фільтруючий матеріал стійкий до кислот, аміаку, хлору, води та може витримувати високі температури до 200 градусів Цельсія і обробку гострою парою. Що особливо важливо для додаткової захисту в чутливих лабораторних та мікробіологічних середовищах. При цьому обслуговування таких фільтрів стає досить простим завдяки можливості заміни тільки фільтруючих трубок, що підвищує їхню ефективність та зручність в експлуатації [35].

5.3 Вибір мийних дезінфікуючих засобів

1. Підготовка персоналу

Навчання персоналу при прийомі на роботу, перевірка цього персоналу на знання санітарної підготовки. Проводження медоглядів, підготовка технічного одягу та ін.

2. Підготовка приміщень

Щоденне та щозмінне прибирання, а також генеральне прибирання.

3. Підготовка обладнання

Перевірка обладнання перед технологічним процесом на справність, миття, огляд, а також дезінфекція цього обладнання.

4. Підготовка миючих та дезінфікуючих засобів

Перевірка засобів на термін придатності та зменшення ризику контамінації.

Мийні та дезінфікуючі засоби

Таблиця 5.1

Назва мийного-дезінфікуючого засобу	Об'єкт миття	Концентрація робочого розчину, %	Джерело
Засіб мийний з дезінфікуючим ефектом «КлінДез 401» («Clean&Dez 401») (діючі речовини: натрію гіпохлорит- 50,0% (вміст активного хлору 5,0%-9,0%)	Поверхні приміщень та обладнання	Вихідний вміст активного хлору в концентрації засобу 6,0% — 9,0%. При інфекціях бактеріальної етіології 0,015% - 30 хв, 0,1% - 15 хв. При інфекціях вірусної етіології 0,05% - 90 хв, 0,1% - 20 хв, 0,15% - 15 хв. Форма випуску: 5 л, 10 л. Вартість 1 л – 70 грн. Використання: на промислових підприємствах, заводах, фабриках, складах і сховищах, включно з архівними установами різних підприємств;	[36,37]
Засіб дезінфекційний «Дезаква –Аноліт» (діючі речовини: хлорнуватиста кислота, високоактивні кисневі сполуки хлору, вільні радикали хлору та кисню (HClO; ClO ₂ ; ClO ⁻ ; O ₃ ; H ₂ O ₂ ; H ₂ O ⁺ ; O ₂ ; ClO; NaCl); масова концентрація активного хлору-0,1%	Поверхні приміщень та обладнання	Склад засобу: хлорнуватиста кислота, пероксидні сполуки, концентрація водневих іонів, рН: 6,0-8,0; мінералізація, г / дм ³ , 1 ± 1,5. Дезінфікуючий засіб для знезараження максимально можливого спектру вірусів, грибків, бактерій. Розчиняє біоплівку, нейтралізує запахи. Не викликає адаптації у мікроорганізмів. Концентрація робочого розчину 0,05 % Вартість: 190 грн Форма випуску: 1 л	[36,38]
Мийний дезінфікуючий засіб Nuwa-SanTR50 (діюча речовина: пероксид водню 49,0-49,9%)	Поверхні приміщень та обладнання	Склад засобу: пероксид водню 49,0-49,9%). Для дезінфекції приміщень та поверхонь використовується водний розчин Nuwa-San у концентрації від 4% до 25%. Для дезінфекції інструментів та обладнання рекомендується додавати 4% розчин Nuwa-San до води. Очищає стіни, підлогу, обладнання та інші поверхні. Ціна: 686,55 Форма випуску: 1, 12, 24 кг	[36,39]

Мийні та дезінфікуючі засоби для обробки поверхонь та приміщень

Продукт для миття та дезінфекції "**КлінДез 401**" доступний у формі рідкого концентрату жовтуватого кольору з характерним ароматом хлору. Вміст активного хлору в концентраті засобу коливається від 6,0% до 9,0%. Робочі розчини мають антикорозійні, стабілізуючі, змочувальні, емульгуючі та мийні властивості. Продукт не завдає шкоди об'єктам, виготовленим з корозійностійких металів, таких як нержавіюча сталь, хромонікелева сталь, низьковуглецева сталь, залізо, алюміній. Рекомендована концентрація: 0,015-2%, залежно від режиму дезінфекції; стерилізація — 0,25-2%

Склад, %:

Іпохлорит натрію — до 50%; допоміжні речовини — антикорозійні, стабілізуювальні домішки; аніонні та неіоногенні ПАВ. Вихідний вміст активного хлору в концентрації засобу 6,0% — 9,0%.[37].

Фасування: 5 л, 10 л.

«**Дезаква –Аноліт**» - дезінфікуючий засіб для знезажарування максимально можливого спектру вірусів, грибків, бактерій. Розчиняє біоплівку, нейтралізує запахи. Не викликає адаптації у мікроорганізмів. Концентрація робочого розчину 0,05 %

Склад: Хлорноватиста кислота, пероксидні сполуки, концентрація водневих іонів, рН: 6,0-8,0; мінералізація, г / дм³, 1 ±1,5. [38].

Huwa-San - це миючий засіб, який виявляє ефективність у боротьбі з бактеріями, грибами, дріжджами, спорами, вірусами і мікобактеріями. Це дозволяє використовувати продукти, які містять Huwa-San, у різних сферах для дезінфекції води, поверхонь, інструментів, а також для обробки великих порожніх приміщень. Здатен знищувати біоплівку. Очищає стіни, підлогу, обладнання та інші поверхні.

Для дезінфекції приміщень та поверхонь використовується водний розчин Huwa-San у концентрації від 4% до 25%. Для дезінфекції інструментів та обладнання рекомендується додавати 4% розчин Huwa-San до води. [39].

Розрахунок ефективності використання дезінфікуючих та миючих засобів

Таблиця 5.2.

Назвазасобу	Об'єкт миття та/або дезінфекції	Концен- трація робо-чого розчину, %	Вартість 1 л (кг) мийногоа бо дез. засобу, Грн/л(кг)	Вартість 1 л робочегор озчинуми йногоабо дез.засобу, Грн/л	Витратироб.ро зчину, л/м ²	Ефективністьвикористан нядез.розчину, Е _{дз} , Грн/м ²
КлінДЕЗ 401	Миття та дезінфекціятехнологі чногообладнання,пов ерхні приміщень	0,2%	70	70	0,1	7
Дезаква –Аноліт	Поверхні, стіни, вікна, Двері	0,05%	190	190	0,1	19
Huwa-San	Миття стін, підлоги, обладнання та інших поверхонь.	4%	685,55	685,55	0,1	68,5

Аналізуючи таблицю можемо сказати, що одним із найкращих є засіб КлінДЕЗ 401 – стосовно ціни та його характеристик. На підприємстві будемо змінювати засоби раз на 3 місяці, задля забезпечення стерильності.

5.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

5.4.1. Обґрунтування способів підготовки складових поживного середовища для культивування *Micromonospora echinospora* NRRL B-2995

З метою одержання посівного матеріалу бактеріального штаму NRRL B-2995 застосовуємо середовище такого складу (г/л):

- глюкоза – 10;
- яловичий екстракт – 2;
- дріжджовий екстракт – 2;
- поліпептон – 2;
- CaCO_3 – 1;
- рН середовища – 7,3.

Для проведення виробничого біосинтезу гентаміцину *M. echinospora* NRRL B-2995 використовують поживне середовище із таким компонентним складом (г/л):

- крохмаль – 10;
- соєвий шрот – 5;
- CaCO_3 – 4;
- K_2HPO_4 – 1;
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,03;
- CoCl_2 – 0,001;
- NaCl – 0,6;
- рН середовища – 7,6 [40].

Виробничий біосинтез антибіотику проводиться у ферментері об'ємом 10 м³ із коефіцієнтом заповнення 0,6. Підготовка посівного матеріалу здійснюється протягом трьох етапів: у колбах на качалках, в інокуляторі об'ємом 25 л та посівному апараті об'ємом 250 л.

Для вирощування інокуляту у колбах на качалках попередньо готуємо середовище, яке далі стерилізуємо в автоклаві через його відносно невеликий об'єм (1,08 л). Стерилізацію поживних середовищ для одержання посівного матеріалу та виробничого біосинтезу проводять у спеціальних реакторах-змішувачах,

безпосередньо в інокуляторі або посівному апараті або в установці безперервної стерилізації (УБС).

5.4.2. Одержання посівного матеріалу у колбах на качалці

Провівши аналіз складу поживного середовища для вирощування *M. echinospora* NRRL B-2995, залежно від режиму стерилізації компонентів, здійснюємо поділ на такі композиції:

Композиція А: глюкоза, яловичий і дріжджовий екстракт, поліпептон (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв).

Композиція Б: CaCO₃ (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв).

Оскільки компоненти композиції А є термолабільними компонентами, то їх стерилізують при більш м'якому режимі. Стерилізацію солей композиції Б здійснюють за стандартної для таких компонентів температури. Стерилізацію вище описаних композицій проводять в автоклаві.

Таблиця 5.3

Склад та об'єми композицій для вирощування посівного матеріалу у колбах на качалці

Вміст компонента поживного середовища, г/л	Необхідна кількість для приготування 950 мл середовища, г	Композиції	Об'єм композиції V, мл
Глюкоза – 10	9,5	А	800
Яловичий екстракт – 2	1,9		
Дріжджовий екстракт – 2	1,9		
Поліпептон – 2	1,9		
Вода	700	Б	150
CaCO ₃ – 1	0,95		
Вода	250		
Усього			950

5.4.3. Отримання посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 25 л

Поживне середовище об'ємом 10,5 л, що необхідне для вирощування інокуляту на даному етапі, стерилізуються у реакторі або безпосередньо в посівному апараті. Поділ композицій зберігається із попередніх стадій:

Композиція А: глюкоза, яловичий і дріжджовий екстракт, поліпептон (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв).

Композиція Б: CaCO_3 (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв).

Глюкоза, яловичий і дріжджовий екстракт, а також поліпептон попередньо розчиняють у реакторі-змішувачі, в якому здійснюють далі стерилізацію. Солі розчиняють в окремому реакторі, з якого потім вони будуть подані у посівний апарат, де проводитиметься стерилізація.

Таблиця 5.4

Склад та об'єми композицій для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі на 25 л

Вміст компонента поживного середовища, г/л	Необхідна кількість для приготування 10,5 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції V, л
Глюкоза – 10	105	А	8
Яловичий екстракт – 2	21		
Дріжджовий екстракт – 2	21		
Поліпептон – 2	21		
Конденсат	0,8		
Вода	7,03	Б	2,5
CaCO_3 – 1	10,5		
Вода	2,5		
Усього			10,5

5.4.4. Культивування *M. echinospora* NRRL В-2995 у посівному апараті на 250 л

Поживне середовище об'ємом 125,5 л, що необхідне для вирощування інокуляту на даному етапі, стерилізуються у реакторі або безпосередньо в посівному апараті. Поділ композицій зберігається із попередніх стадій:

Композиція А: глюкоза, яловичий і дріжджовий екстракт, поліпептон (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв).

Композиція Б: CaCO_3 (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв).

Глюкоза, яловичий і дріжджовий екстракт, а також поліпептон попередньо розчиняють у реакторі-змішувачі, в якому здійснюють далі стерилізацію. Солі розчиняють в окремому реакторі, з якого потім вони будуть подані у посівний апарат, де проводитиметься стерилізація.

Таблиця 5.5

Склад та об'єми композицій для вирощування інокуляту у посівному апараті на 250 л

Вміст компонента поживного середовища, г/л	Необхідна кількість для приготування 125,5 л середовища, кг	Композиції	Об'єм композиції V, л
Глюкоза – 10	1,255	А	80
Яловичий екстракт – 2	0,25		
Дріжджовий екстракт – 2	0,25		
Поліпептон – 2	0,25		
Конденсат	8		
Вода	70	Б	45,5
CaCO ₃ – 1	0,125		
Конденсат	4,55		
Вода	40,8		
Усього			125,5

5.4.5. Виробничий біосинтез гентаміцину у ферментері на 10 м³

Для здійснення виробничого біосинтезу потрібно підготувати 5 960 л поживного середовища. Щоб зменшити витрати води, пари та скоротити час обробки даного об'єму поживного середовища, економічно доцільним буде проведення процесу стерилізації в УБС-5, температурний режим якої складає 131 °С.

Композиція А: крохмаль, соєвий шрот, K₂HPO₄, NaCl, FeSO₄·7H₂O, CaCO₃, CoCl₂ (режим стерилізації: 131 °С, 5 – 7 хв).

Всі компоненти композиції А готують в одному реакторі. Але спочатку заварюють крохмаль (t = 70-80 °С), потім додають усі солі, розчиняють і перекачують відцентровим насосом до збірника УБС-5.

Таблиця 5.6.

Склад та об'єми композицій для стерилізації поживного середовища в УБС

Вміст компонента поживного середовища, г/л	Необхідна кількість для приготування 5960 л середовища, кг	Композиції	Об'єм композиції V, л
Крохмаль – 10	59,6	А	5960
Соєвий шрот – 5	29,8		
K ₂ HPO ₄ – 1	5,96		
NaCl – 0,6	3,58		

FeSO ₄ ·7H ₂ O – 0,03	0,18		
CaCO ₃ – 4	23,84		
CoCl ₂ – 0,001	0,006		
Конденсат	596		
Вода	5240		
Усього			5960

5.5. Обґрунтування вибору піногасника та титрувальних розчинів

Під час культивування можливим є утворення великої кількості піни. Для цього використовуємо механічний спосіб її гасіння, принцип дії якого полягає у додатковому встановленні перемішуючого пристрою у верхній частині ферментера. Таким чином, за наявності у ферментері датчика піни, від якого відбуватиметься подача сигналу, мішалка буде обертатися і розбивати утворювану піну.

Оскільки процес ферментації повинен проходити за нейтрального значення рН ($7,5 \pm 0,2$) [4], то перед внесенням посівного матеріалу поживне середовище підлучнюють стерильним 6%-вим розчином їдкого натру, який стерилізують в автоклаві при 131 °C (0,15 МПа) протягом 40 хв.

Таблиця 5.7.

Необхідні об'єми та особливості приготування розчинів титрувального агента

Об'єм середовища, л	NaOH (6%)	
	Об'єм, мл	Особливість приготування
0,95	–	–
10,5	21	у колбі на 500 мл
125,5	251	
5 960	11 920	у реакторі на 25 л

Отже, для вирощування інокуляту та одержання гентаміцину потрібно передбачити такі реактори:

– для приготування та стерилізації композицій А для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі на 25 л (10 л);

– для приготування та стерилізації композицій А і Б для вирощування інокуляту в посівному апараті на 250 л (100 і 63 л відповідно);

- для заварювання крохмалю і соєвого шроту, а також приготування солей перед стерилізацією в УБС;
- для приготування та стерилізації розчину титрувального агента (25 л).

РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ПРОЕКТОВАНОГО ВИРОБНИЦТВА ГЕНТАМІЦИНУ

Узагальнена інформація щодо обладнання, використовуваного у біотехнологічному виробництві гентаміцину та зображеного у графічній частині проекту (апаратурна схема), наведена у табл. 6.1.

Таблиця 6.1

Специфікація обладнання для виробництва гентаміцину

Позначення позиції	Назва позиції	Кількість	Необхідні характеристики
1	2	3	4
ПЗ-1	Повітрозабірник	1	Повітрозабірник В-6,3. Робоча температура: від -60 до +180 °С. Робочий тиск: 0,8МПа. Габарити: 1400х4565х3600 мм [41].
Ф-2	Фільтр попередньої очистки	1	Фільтр попереднього очищення АФ 036. Ступінь очищення: 3 мкм. Макс. роб. температура: 65 °С. Робочий тиск 16 бар [42].
К-3	Компресор	1	Гвинтовий компресор Лідер ВК 350PS. Потужність від 22 кВт до 250 кВт, при продуктивності від 3.4 до 40.8 м³/хв. Тиск до 8 бар. Робоча температура +5...+40 °С [43].
Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Кожухотрубний теплообмінник. Виробник: ОПЭКС (TRANTER) Робочі температури (°С): -60...+400. Тиск до 4 МПа. Матеріал: нерж. сталь AISI316 [44].
Р-5	Ресивер	1	Ресивер для стисненого повітря 20 м³. Робочий тиск: від 0,6 МПа до 6,3 МПа. Виробник: Укргазкомплект-2010 [45].

					НУХТ БТЕК 04.03.45 КР ПЗ								
Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Розділ 6. Специфікація обладнання проектowanego виробництва				Літ.	Арк.	Акрушіє		
Розроб.	Гребельна Д.Ю.										53	113	
Перевір.	Карлаш Ю.В.								Кафедра БТМ				
Консультант													
Н. Контр.													
Затверд.	Стабніков В.П.												

Т-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Кожухотрубний теплообмінник. Виробник: ОПЭКС (TRANTER) Робочі температури (°C): -60...+400. Тиск до 4 МПа. Матеріал: нерж. сталь AISI316 [44].
ІФ-8, ІФ-17, ІФ-25	Індивідуальний фільтр	3	Фільтр високого тиску ТР QFRH-15. Конструкція Металокерамічний фільтр із сепарацією. Діапазон регулювання тиску: 0,15 - 4 МПа. Країна виробник: Китай [46].
Д-9, Д-14	Ваговий дозатор	2	Дозатор для сипучих продуктів NPF-200-201. Діапазон дозування: 2-200 г. Похибка дози (допустима): до 1% [47].
РЗ-10	Реактор-змішувач для підготовки композиції А	1	Реактор-змішувач на 10 л. Матеріал рами: нержавіюча сталь 304, реакційна ємність з боросилікатного скла. Діапазон температур, у якому може працювати реактор: - 80°C - 250°C. Швидкість мішалки: 0-450 об/хв. Розміри реактора: 780x550x1870 мм [48].
І-11	Інокулятор	1	Реактор-змішувач Bellco 25L. Система постачається з блоком керування, встановленим на мобільному каркасі, який контролює параметри швидкості двигуна (0 – 150 RPM), рН, температури, DO та ваги через термінал ваг. 25-літрово ємність із фланцевою оболонкою з боросилікатного скла приймає головну пластину з нержавіючої сталі 316L та затискач із нержавіючої сталі, з доступними портами для зондів рН, DO та температури, і може поставлятися як з бурштинового, так і з прозорого скла. Розміри: 780x550x1870 мм [49].
Д-12	Ваговий дозатор для зважування глюкози, яловичого і дріжджового екстрактів та поліпептону	1	Ваговий дозатор ФС-75. Похибка дозування: 1 %. Напруга: 220 В. Діапазон зважування: 0,15-40 кг [50].

РЗ-13	Реактор-змішувач для підготовки композиції А	1	Реактор-змішувач LGR-100L об'ємом 100 л. Матеріал: боросилікатне скло GG3.3, стійке до тепла/холоду/корозії. Широкий діапазон температурних операцій, від -60°C до 250°C. Швидкість перемішування: 0-450об/хв. Розміри: 950 x 750 x 2390 мм [51].
РЗ-15	Реактор-змішувач для приготування розчину кальцію карбонату	1	Реактор-змішувач СЕон 0,063 на 63 л. Матеріал: нержавіюча сталь. Потужність двигуна: 0,75 кВт. Швидкість перемішування: 100 об/хв. Розміри: 1000 x 930 x 2600 мм [52].
Н-16	Насос відцентровий для перекачування розчину кальцію карбонату від РЗ-15 до ПА-17	1	Насос відцентровий САМ INOX 80-HL («Speroni»). Максимальний тиск: до 8 бар; продуктивність: 3 м3/год (50 л/хв); потужність: 600 Вт [53].
ПА-18	Посівний апарат	1	Посівний апарат HyPerforma 250 л. Матеріал: нержавіюча сталь 316L. Обладнаний пробовідбірником, датчиками температури і рН, DO. Швидкість перемішування: 30–200 об/хв. Розміри: 112.8 x 102.2 x 215.5 см [54].
Д-19	Дозатор ваговий для зважування компонентів поживного середовища	1	Ваговий дозатор ФС-1000. Виробник: «ТехноМашСтрой». Похибка дозування: 1 %. Напруга: 220 В. Діапазон зважування: 0,15-50 кг [55].
РЗ-20	Реактор-змішувач для приготування композиції А	1	Реактор-змішувач СЕон 10,0 на 10 м3. Матеріал: нержавіюча сталь. Потужність двигуна: 11 кВт. Швидкість перемішування: 100 об/хв. Розміри: 2600 x 2600 x 5600 мм [52].
Н-21	Насос відцентровий для перекачування композиції А від РЗ-20 до УБС-20	1	Поверхневий відцентровий насос PEDROLLO 5CRm 100. Максимальний робочий тиск:
УБС-22	Установка безперервної стерилізації	1	Установка безперервної стерилізації об'ємом 5 м3. Виготовляється на замовлення
Н-23	Насос відцентровий для перекачування композиції А від УБС-22 до ФР-26	1	Промисловий відцентровий насос TAPFLO CTI AA. Максимальна температура рідини, що перекачується + 90 °С. Максимальний робочий тиск:

РЗ-24	Реактор-змішувач для підготовки натрію гідроксиду (розчин концентрацією 6%)	1	Реактор-змішувач СНУ на 25 л. Виробник: Китай. Швидкість перемішування: 0-450 об/хв. Встановлений температурний діапазон: -80-250 °С. Матеріал: боросилікатне скло. Розміри: 560 x 560 x 2300 мм [58].
-------	---	---	--

ФР-26	Ферментер	1	Ферментер DIN-BE об'ємом 10 м ³ . Виробник: Pfaudler. Матеріал: нержавіюча сталь 304. Оснащений барботером, сорочкою, датчиками кислотності, кисню та температури, пробовідбірником, манометром, турбінною мішалкою: 320 об/хв; максимальний допустимий тиск: 6 бар. Розміри: 2500x5720 мм [59].
Н-27	Насос відцентровий для перекачування культуральної рідини від ФР-26 до збірника	1	Поверхневий насос Карлуа 10-10-0,75 "NPO". Максимальна температура рідини, що перекачується + 40 °С. Максимальний робочий тиск: 7 бар. Корпус насосної камери з чавуну. Оптимальна продуктивність: 17 м ³ /год [60].

РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА ГЕНТАМІЦИНУ

Біосинтез антибіотику гентаміцину за використання *M. echinospora* NRRL В-2995 здійснюється шляхом проведення допоміжних робіт та технологічного процесу. До стадій допоміжних робіт (ДР) у проектованому виробництві відносять: підготовку стерильного аераційного повітря, приготування та стерилізацію розчинів титрувальних агентів (натрію гідроксиду), підготовку компонентів поживних середовищ. Стадії основного технологічного процесу (ТП) включають в себе: підготовку посівного матеріалу і виробничий біосинтез.

ДР 1. Підготовка аераційного повітря

ДР 1.1. Забір атмосферного повітря

Атмосферне повітря забирають за використання повітрозабірника у найвищій точці – на висоті 10 м (висота поверху – 6 м, кількість поверхів – 1, косий дах будівлі (~1,5 м), + 2-3 метри), де розміщують обладнання для стиснення та очищення повітря.

ДР 1.2. Очистка повітря від грубих часток

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

ДР 1.3. Стиснення повітря

Стискання повітря здійснюють у компресорі, з метою забезпечення аерацій та подолання гідравлічного тиску стовпа рідини у ферментері. Умови процесу: тиск – 0,35 МПа, температура – до 250°C.

					НУХТ БТЕК 04.03.45 КР ПЗ			
Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Гребельна Д.Ю.				Розділ 7. Опис технологічної схеми виробництва гентаміцину	Лім.	Арк.	Акрушів
Перевір.	Карлаш Ю.В.						57	113
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							

ДР 1.4. Охолодження повітря і видалення зайвої вологи

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

ДР 1.5. Нагрівання повітря

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

ДР 1.6. Очищення повітря у головному фільтрі

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

ДР 1.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

Повітря (від ДР 1.6) через трубопроводи подається безпосередньо в індивідуальні фільтри кожного з біореакторів до ТП 4.5, ТП 4.6, ТП 5.1. Ступінь кінцевої очистки повітря складає 99,999% та КУО – 0.

ДР 2. Приготування розчинів титрувальних агентів

У табл. 5.7 (див. підрозділ 5.5) представлено узагальнені дані щодо особливостей приготування титрувальних розчинів для одержання посівного матеріалу (3 стадії) та виробничого біосинтезу.

ДР 2.1. Приготування і стерилізація 6%-го розчину натрію гідроксиду

ДР 2.1.1. Приготування і стерилізація 6%-го розчину натрію гідроксиду для підлучення середовища в інокуляторі на 25 л та посівному апараті на 250 л

На даному етапі необхідно приготувати 272 мл 6%-го розчину натрію гідроксиду. На технічних вагах потрібно зважити 16,3 г, таку наважку переносять у колбу об'ємом 500 мл і при використанні мірного циліндра додають 271 мл дистильованої води та ретельно перемішують. Готовий розчин закривають ватно-марлевим корком та стерилізують в автоклаві при 131 °C (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 2.1.2. Приготування і стерилізація 6%-го розчину натрію гідроксиду для підлучення середовища у ферментері об'ємом 10 м³

На даному етапі потрібно приготувати 11,92 л 6%-го розчину натрію гідроксиду. На технічних вагах необхідно зважити 715 г, таку наважку переносять у реактор-змішувач об'ємом 25 л (РЗ-24) і при використанні лічильника подають 11,92 л питної води та вмикають перемішувальний пристрій. Готовий розчин стерилізують у такому реакторі при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 3. Приготування і стерилізація поживних середовищ

ДР 3.1. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу у колбах на качалці

Табл. 5.3 (див. підрозділ 5.4.2.) містить дані щодо необхідних кількостей компонентів для приготування середовища з метою вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках.

ДР 3.1.1. Приготування і стерилізація композиції А

За використання технічних терезів зважують 9,5 г глюкози, по 1,9 г яловичого і дріжджового екстракту та поліпептону. Готові наважки переносять у колбу об'ємом 2 л, додають 800 мл дистильованої води при застосуванні мірного циліндра, перемішують, закривають пробкою і здійснюють стерилізацію в автоклаві при 112 °С (0,05 МПа) протягом 30 хв.

ДР 3.1.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На торсійних терезах зважують 0,95 г СаСО₃. Отриману наважку вносять у колбу об'ємом 250 мл, додають 150 мл дистильованої води за використання мірного циліндра, перемішують, закривають ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 3.2. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 25 л

Варто врахувати, що 10% (1,05 л) від об'єму поживного середовища становить посівний матеріал, а також 10% (0,8 л) буде складати конденсат, який утвориться під час стерилізації композиції А. Табл. 5.4 (див. підрозділ 5.4.3.) містить

розраховані дані щодо потрібних кількостей компонентів у приготуванні середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі на 25 л.

ДР 3.2.1. Приготування і стерилізація композиції А

За використання технічних терезів зважують 105 г глюкози, по 21 г яловичого і дріжджового екстракту та поліпептону. Готові наважки переносять у реактор-змішувач об'ємом 10 л (РЗ-10), додають 7,03 л питної води, вмикають перемішувальний пристрій та здійснюють стерилізацію при 112 °С (0,05 МПа) протягом 30 хв.

ДР 3.2.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних терезах зважують 10,5 г CaCO_3 . Отриману наважку вносять у колбу об'ємом 5 л, додають 2,5 л питної води, перемішують, закривають ватно-марлевым корком та здійснюють стерилізацію в автоклаві при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 3.3. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту у посівному апараті об'ємом 250 л

Варто врахувати, що 10% (12,5 л) від обсягу становить інокулят, а також 10% (12,55 л) буде складати конденсат, який утвориться під час стерилізації поживного середовища у посівному апараті. У табл. 5.5. (див. підрозділ 5.4.4.) наведено розрахункові дані щодо кількостей компонентів, що необхідні у приготуванні середовища для вирощування інокуляту у посівному апараті на 250 л.

ДР 3.3.1. Приготування і стерилізація композиції А

За використання вагового дозатора (Д-12) зважують 1,255 кг глюкози, по 0,25 кг яловичого і дріжджового екстракту та поліпептону. Готові наважки переносять у реактор-змішувач об'ємом 100 л (РЗ-13), додають за допомогою лічильника 70 л питної води, вмикають мішалку і здійснюють стерилізацію при 112 °С (0,05 МПа) протягом 30 хв. Одержаний розчин охолоджують та подають самоплином у посівний апарат на 250 л (ПА-18).

ДР 3.3.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних терезах зважують 125 г CaCO_3 . Одержану наважку переносять у реактор-змішувач об'ємом 63 л (РЗ-15), додають за допомогою лічильника 40,8 л

питної води, вмикають мішалку. Для кращого розчинення компонентів у сорочку реактора подають пару, щоб досягти температури на рівні 40°C. Отриманий розчин перекачують відцентровим насосом (Н-16) у попередньо простерилізований посівний апарат об'ємом 250 л (ПА-18) і здійснюють стерилізацію при 131 °C (0,15 МПа) протягом 40 хв

ДР 3.4. Приготування і стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 10 м³

Варто врахувати, що 2% (120 л) від обсягу становить посівний матеріал, а також 10% (596 л) буде складати конденсат, який утвориться під час стерилізації поживного середовища в УБС. У табл. 5.6 (див. підрозділ 5.4.5.) наведено розрахункові дані щодо кількостей компонентів, що необхідні у приготуванні середовища для виробничого біосинтезу гентаміцину у ферментері на 10 м³.

ДР 3.4.1. Приготування композиції А

При використанні вагового дозатора (Д-19) у реактор-змішувач на 8 м³ (РЗ-20) вносять 59,6 кг крохмалю, 29,8 кг соєвого шроту, додають через лічильник 1038 л питної води, вмикають мішалку. Далі проводять заварювання нагріванням суміші до 70 – 90 °C подачею пари у сорочку апарата. Згодом витримують протягом 30 хв за безперервного перемішування. Потім у той же реактор на 8 м³ через той же ваговий дозатор подають 5,96 кг K₂HPO₄, 3,58 кг NaCl, 0,18 кг FeSO₄·7H₂O та 23,84 кг CaCO₃. На технічних терезах зважують 6 г CoCl₂ та переносять таку наважку також у реактор об'ємом 8 м³, додають через лічильник 4204 л питної води, вмикають мішалку. З метою поліпшення розчинення компонентів у сорочку реактора подають пару, щоб підвищити температуру у збірнику до 40 °C.

ДР 3.4.2. Стерилізація композиції А в УБС

Одержаний розчин (від ДР 3.4.1) перекачують відцентровим насосом (Н-21) у реактор УБС-22 об'ємом 10 м³, де проходить стерилізація гострою парою за температури 131 °C протягом 5-7 хвилин. Стерильний охолоджений розчин перекачують відцентровим насосом (Н-23) до ФР-26.

ТП 4. Підготовка посівного матеріалу

ТП 4.1. Підтримання колекційної культури

Колекційну культуру *M. echinospora* NRRL B-2995 зберігають у пробірці при 2 – 4 °C на скошеному щільному агаризованому середовищі, а саме на середовищі №554 [16]. Для збереження життєздатності культури, пересіви на свіже поживне середовище проводять 1-2 рази на місяць. Всі маніпуляції з колекційною культурою виконуються із обов'язковим дотриманням правил асептики.

ТП 4.2. Одержання робочої культури

Для отримання ізолюваних колоній колекційну культуру *M. echinospora* NRRL B-2995 розсівають на чашки Петрі із середовищем №554. Після посіву, чашки поміщають у термостат із заданою температурою 28 °C на 48 годин для росту культури.

ТП 4.3. Вирощування на щільному середовищі

Для одержання чистих культур *M. echinospora* NRRL B-2995 із ізолюваних колоній (отриманих від ТП 4.2), застосовують метод пересіву на пробірки із середовищем №554. Одна ізолювана колонія пересівається у кожену пробірку, що знаходяться на відстані не менше 1 см одна від одної, і вирощуються за температури 28 °C протягом 48 годин. Для контролю чистоти культури кожні 4 години відбирають проби з пробірок для здійснення мікробіологічного аналізу.

ТП 4.4. Вирощування посівного матеріалу у колбах на качалці

У стерильну колбу об'ємом 250 мл в асептичних умовах додають стерильну композицію А (від ДР 3.1.1). Далі додають простерилізовану композицію Б (від ДР 3.1.2). Потім змішують компоненти та переливають отриману суміш у 8 стерильних колб об'ємом 750 мл, що розташовуються на качалці.

З метою одержання робочої культури *M. echinospora* NRRL B-2995 (від ТП 3.3) додають 5 мл фізіологічного розчину до пробірки, суспендують клітини, відбирають отриману бактеріальну суспензію за допомогою стерильної піпетки і додають її до качалочної колби із поживним середовищем. Для засіву однієї колби використовується бактеріальна суспензія, отримана з однієї пробірки.

Вирощують культуру на качалках при швидкості 200 обертів на хвилину при температурі 34 °С протягом 48 годин. Після цього визначають концентрацію біомаси, яка повинна бути у діапазоні 2,3 – 2,4 г/л, і проводять мікробіологічний контроль. Після мікробіологічного контролю культуральну рідину переливають в засівну колбу об'ємом 250 мл.

ТП 4.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі на 25 л

В інокулятор об'ємом 25 л (І-11) подають самоплином стерильну композицію А (від ДР 3.2.1), простерилізовану композицію Б (від ДР 3.2.2) і вмикають перемішуючий пристрій та доводять 6%-им розчином NaOH (від ДР 2.1.1) рН середовища за значенням датчика до 7,5. Через засівну колбу вносять посівний матеріал від ТП 3.4. Культивування здійснюють за температури 34 °С і концентрації розчиненого кисню ($pO_2 = 20 - 30\%$ від насичення повітря) протягом 48 годин.

Кожні 4 години з інокулятора забирають проби культуральної рідини для здійснення мікробіологічного контролю та вимірюють концентрацію біомаси. Очікувана концентрація біомаси повинна бути у межах від 2,3 до 2,4 г/л.

ТП 4.6. Вирощування інокуляту у посівному апараті об'ємом 250 л

У посівний апарат об'ємом 250 л (ПА-18) зі стерильною композицією В (від ДР 3.3.2) вносять простерилізовану композицію А (від ДР 3.3.1) і вмикають перемішуючий пристрій та доводять 6%-им розчином NaOH (від ДР 2.1.1) рН середовища за значенням датчика до 7,5. Самоплином передають посівний матеріал від ТП 3.5.. Культивування здійснюють за температури 34 °С і концентрації розчиненого кисню ($pO_2 = 20 - 30\%$ від насичення повітря) протягом 48 годин.

Кожні 4 години із посівного апарата проводять відбір проби культуральної рідини для здійснення мікробіологічного контролю та вимірюють концентрацію біомаси. Очікувана концентрація біомаси повинна бути у межах від 2,3 до 2,4 г/л.

ТП 5. Виробничий біосинтез

ТП 5.1. Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 10 м³

У ферментер об'ємом 10 м³ (ФР-26) за використання відцентрового насосу (Н-23) перекачують простерилізоване в УБС-22 середовище (від ДР 2.4.4), вмикають мішалку і доводять самоплином від реактора на 25 л (РЗ-24) 6%-им розчином NaOH

(від ДР 1.1.2) рН середовища за значенням датчика до 7,5. Через трубу перетискування передають посівний матеріал від ТП 3.6.. Культивування здійснюють за температури 34 °С і концентрації розчиненого кисню ($pO_2 = 20 - 30\%$ від насичення повітря) протягом 120 годин (5 діб).

Кожні 4 години із ферментера проводять відбір проби культуральної рідини для здійснення мікробіологічного контролю та вимірюють концентрацію біомаси та гентаміцину. Очікувана концентрація біомаси повинна бути у межах від 4,6 до 4,7 г/л, а гентаміцину – 1,5 г/л.

Після завершення процесу біосинтезу культуральну рідину перекачують з використанням відцентрового насоса (Н-27) у збірник для зберігання, що знаходиться у відділенні цеху для виділення цільового продукту.

РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА ГЕНТАМІЦИНУ

Протягом всього процесу біосинтезу гентаміцину періодично (кожні 4 год) здійснюють аналіз відібраної проби культуральної рідини, посівного матеріалу та поживних середовищ з метою проведення мікробіологічного контролю, визначення концентрації біомаси та гентаміцину, контролю рівня спожитого джерела азоту (соєвий шрот) і джерела вуглецю (крохмаль).

8.1. Мікробіологічний контроль

Вирощування бактеріального штаму *Micromonospora echinospora* NRRL B-2995 здійснюють в асептичних умовах, тому необхідним є забезпечення мікробіологічного контролю у виробництві гентаміцину на всіх його етапах, аби унеможливити наявність сторонньої контамінації.

Мікробіологічний контроль стерильності поживних середовищ та мікробіологічної чистоти посівного матеріалу і культуральної рідини проводять такими способами: прямий висів на агаризовані поживні середовища та мікроскопіювання (експрес-метод). Відібрану пробу об'ємом 1 мл розсівають петлею до ізольованих колоній на чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром (МПА) для виявлення бактерій, із сусло-агаром (СА) або глюкозо-картопляним агаром (ГКА) – для дріжджів і грибів. Після цього чашки інкубують за температурного режиму 37 °С (МПА) та 24 – 26 °С (СА або ГКА). Після завершення часу інкубації (24 год) чашки розглядають на наявність сторонньої мікробіоти [61].

Після поверхневого культивування на середовищі №554 (N-Z-AMINE-MEDIUM) бактеріальний штам *M. echinospora* NRRL B-2995 утворює чорні із червоними нерівними краями гладкі колонії (рис. 5.1) (аналіз посівного матеріалу та культуральної рідини) [62]. Відібрані проби поживного середовища повинні бути стерильними, а отже, мікробіота повинна бути відсутня.

					НУХТ БТЕК 04.03.45 КР ПЗ			
Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Гребельна Д.Ю.				Розділ 8. Контроль виробництва гентаміцину	Літ.	Арк.	Акрушіє
Перевір.	Карлаш Ю.В.						65	113
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							

Мікробіологічний експрес метод культуральної рідини та посівного матеріалу проводять наступним чином. На попередньо підготовлене знежирене предметне скло наносять за використання стерильної бактеріологічної петлі або піпетки краплю досліджуваної проби культуральної рідини. Обережними рухами такий матеріал розподіляють на 1 – 2 см² по центру предметного скла. Отриманий зразок підсушують над вогнем або на повітрі, після чого фіксують за допомогою 1 – 2 крапель метиленового синього [63]. На наступному етапі препарат висушують та мікроскопіюють за використання світлового мікроскопа.

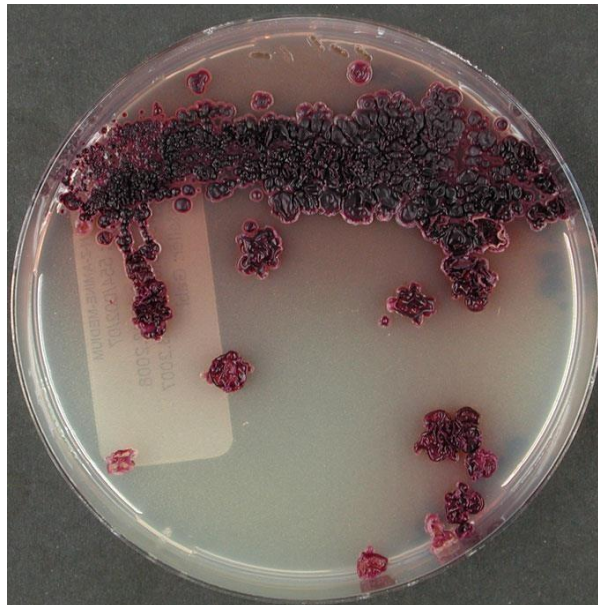


Рис. 8.1. Колонії *M. echinospora* на середовищі 554 при 28 °С [31]

За відсутності контамінації в аналізованій пробі культуральної рідини або посівного матеріалу під час мікроскопіювання можна побачити клітини *M. echinospora* NRRL B-2995 (рис. 5.2). Бактерії діаметром 0,5 – 2 мм утворюють розгалужений та добре розвинений септований міцелій (псевдоміцелій). Клітини є нерухомими, розташовуються поодинокі або на коротких чи довгих спороносіях [62]. Після аналізу поживного середовища шляхом мікроскопіювання, у світловому мікроскопіне повинно спостерігатися мікроорганізмів.



Рис. 8.2. Зображення бактерій роду *Micromonospora* за використання електронного мікроскопу [64]

У разі, якщо значення мікробіологічного контролю в біотехнологічному виробництві не відповідають прийнятим стандартам, необхідно вжити наступних заходів:

1. Виконати додатковий аналіз: перевірити, чи дані з мікробіологічного контролю правильні і достовірні. Перевірити процедури забору проб, методи аналізу та обладнання. Якщо виникають сумніви, повторити аналізи або здійснити додаткові перевірки.

2. Визначити причину: переглянути всі етапи біотехнологічного процесу, включаючи сировину, процес виробництва, умови зберігання, обладнання та процедури очищення. Оцінити можливі джерела контамінації та можливість впливу на процес.

3. Вжити заходів для усунення проблеми: після визначення причини відхилення, розробити та виконати план виправлення. Це може включати зміну процесу виробництва, впровадження додаткових заходів контролю, зміну джерела сировини або удосконалення методів очищення та дезінфекції.

8.2. Показники росту і синтезу гентаміцину

8.2.1. Визначення концентрації біомаси бактерій

Підготовка проб для аналізу

Для проведення аналізу у стерильних умовах здійснюємо відбір проби культуральної рідини об'ємом 1 мл. Якщо проба з ферментера містить субстрати або реактиви, які осідають або розділяються, перед подальшою обробкою необхідно замішати пробу, щоб забезпечити однорідність зразка. Для цього можна використовувати засоби перемішування, такі як магнітні мішалки. рН проби доводять до 2,0 за допомогою H_2SO_4 . Підкислену культуральну рідину перемішують протягом 30 хвилин, а потім центрифугують при $11378 \times g$ протягом 10 хвилин. рН супернатанту доводять до 7,0 за допомогою NaOH .

Для визначення концентрації біомаси *M. echinospora* NRRL B-2995 використовують оптичну щільність супернатанту за довжиною хвилі 600 нм з використанням фотоелектроколориметра. Потім проводять перерахунок на абсолютно суху біомасу за допомогою калібрувального графіка [65].

8.2.2. Визначення концентрації гентаміцину

Для визначення концентрації гентаміцину у культуральній рідині використано метод вискоєфективної рідинної хроматографії (ВЕРХ). В основі ВЕРХ лежить принцип розділення речовин за допомогою їх різної взаємодії з стаціонарною фазою (матеріал колонки) та мобільною фазою (аналізований розчин) [66].

Підготовка проб для аналізу

Для проведення аналізу у стерильних умовах здійснюємо відбір проби культуральної рідини об'ємом 1 мл. Якщо проба з ферментера містить субстрати або реактиви, які осідають або розділяються, перед подальшою обробкою необхідно замішати пробу, щоб забезпечити однорідність зразка. Для цього можна використовувати засоби перемішування, такі як магнітні мішалки. рН проби доводять до 2,0 за допомогою H_2SO_4 . Підкислену культуральну рідину перемішують протягом 30 хвилин, а потім центрифугують при $11378 \times g$ протягом 10 хвилин. рН супернатанту доводять до 7,0 за допомогою NaOH .

Попередньо оброблений супернатант знову центрифугують при $11378 \times g$ протягом 10 хв. Потім супернатант наносять на сильнокислу смолу 001 $\times$ 7 (Shandong Lukang Record Pharmaceutical Co., Ltd). Зв'язані речовини елююють 2 моль/л NH_4OH . Другу катіонообмінну хроматографію проводять на слабокислій смолі D152 (Shandong Lukang Record Pharmaceutical Co., Ltd). Зв'язані речовини елююють градієнтним елююванням NH_4OH (від 0,1 до 1,0 моль/л).

Елюювання кислої смоли використовують як зразок для обернено-фазового аналізу HPLC-ELSD у зворотній колонці C18 при температурі випаровування 45°C , тиску азоту 3,5 бар і рухомій фазі 0,2 моль/л трифторацетатної кислоти. кислота–метанол (97:3) зі швидкістю потоку 0,6 мл/хв. Як стандарт використовується автентичний гентаміцин В, пік якого, а також досліджуваних зразків використовують для побудови калібрувальної кривої, за допомогою якої визначають концентрацію гентаміцину [67].

8.2.3. Визначення концентрації джерела Карбону (крохмаль) у поживному середовищі

Джерелами вуглецю в поживному середовищі є глюкоза та крохмаль. Один з поширених методів визначення концентрації глюкози - використання ферментативного аналізу з використанням глюкозооксидази. У цьому методі глюкоза реагує з ферментом глюкозооксидазою, утворюючи глюконову кислоту і перекис водню. Перекис водню потім реагує з хромогенним реагентом, що призводить до утворення кольорового продукту. Інтенсивність кольору пропорційна концентрації глюкози у супернатанті. Цей метод дозволяє швидко і чутливо виміряти концентрацію такої речовини [68].

Для аналізу концентрації глюкози в пробі культуральної рідини використовують такий підхід: спочатку 20 мл проби центрифугують протягом 10 хвилин при швидкості 10000 g, щоб відділити біомасу та суспендовані частинки. Потім супернатант розділяють на дві рівні частини об'ємом 10 мл кожна. Одну частину використовують для вимірювання концентрації глюкози, а другу - для вимірювання концентрації крохмалю шляхом його кислотного гідролізу до глюкози. До 1 мл отриманого супернатанту додають 3 мл ферментно-хромогенного реактиву і

інкубують при температурі близько 37 °С протягом 20 хвилин. Після інкубації оптичну щільність кольорового розчину вимірюють за допомогою спектрофотометра при довжині хвилі 625 нм або спеціального аналізатора глюкози. Інтенсивність кольору буде пропорційна концентрації глюкози у супернатанті.

Як розчин порівняння використовують стандартний розчин глюкози. Згодом концентрацію глюкози визначають за формулою:

$$C_{\text{досл.}} = \frac{D_{\text{досл.}} \cdot C}{D_{\text{ст}}}$$

де $D_{\text{досл.}}$ – оптична густина дослідної проби; $D_{\text{ст.}}$ – оптична густина розчину стандартного зразка глюкози; C – концентрація глюкози в розчині стандартного зразка [69].

Для визначення концентрації крохмалю використовують такий підхід: до проби додають розчин хлоридної кислоти і нагрівають суміш на водяній бані при температурі 100 °С протягом 30 хвилин для гідролізу крохмалю до глюкози. Після охолодження додають еквівалентний об'єм динітро-розаліцилового реактиву і утримують отриманий розчин на водяній бані при температурі 100 °С протягом 5 хвилин для проходження реакції. Після охолодження реакційної суміші вимірюють її оптичну щільність за допомогою фотоелектроколориметра при довжині хвилі 540 нм. Концентрацію глюкози визначають за допомогою калібрувального графіка. Концентрацію крохмалю розраховують як різницю між значенням концентрації глюкози, отриманого колориметрично, і значенням концентрації, отриманого за допомогою глюкозооксидазного методу [70].

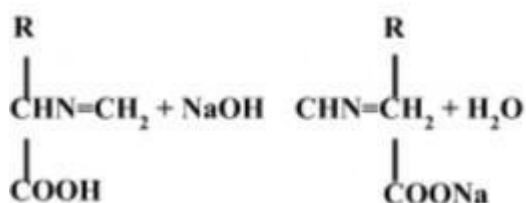
8.2.4. Визначення концентрації джерела азоту (соевий шрот) у поживному середовищі

Соевий шрот у поживному середовищі є джерелом амінного азоту. Аналіз вмісту джерела азотного живлення у соєвому шроті пропонується здійснювати за допомогою методу формольного титрування. Такий метод заснований на нейтралізації карбоксильних груп моноамінодікарбонових кислот білків розчином гідроксиду натрію, кількість якого, витрачений на нейтралізацію, пропорційно масовій частці білка в аналізованій пробі [71].

Принцип методу ґрунтується на здатності формальдегіду зв'язувати вільні аміногрупи з утворенням метиленових похідних амінокислот:



Аміногрупи при цьому втрачають основні властивості, а вільні карбоксильні групи відтитровують розчином лугу:



Для здійснення відповідної методики нам необхідні:

➤ Лабораторний посуд:

1. Колба конічна, 100 мл, 2 шт.
2. Бюретка для титрування.
3. Штатив лабораторний.
4. Піпетка, 2-10 мл, 2 шт.
5. Грушка або піпетдозатор.

➤ Реактиви:

1. Гліцин або гідролізат білка, розчин, 0,25% (зважують 0,25 г гліцину (або гідролізату білка), кількісно переносять у мірну колбу на 100 мл та доведіть дистильованою водою до мітки).
2. Досліджувана проба (20 мл супернатанту після попереднього центрифугування).

3. Фенолфталеїн, спиртовий розчин, 0,1% (зважують 0,1 г фенолфталеїну та кількісно переносять у мірну колбу, додають 10 мл спирту і доводять до мітки дистильованою водою).

3. NaOH, натрій гідроксид, розчин, 0,1 н (наважку масою $(4,0 \pm 0,1)$ г натрій гідроксиду розчиняють дистильованою водою, яка не містить вуглекислого газу. В мірній колбі об'ємом 1 л розчин доводять водою до мітки).

4. Формольна суміш (у конічну колбу на 50 мл наливають 6 мл 20%-го розчину формальдегіду. У присутності фенолфталеїну додають краплями 0,1 н. розчин натрій гідроксиду до почервоніння рідини) [72].

Хід аналізу. До супернатанту об'ємом 20 мл додають розчин формальдегіду об'ємом 5 мл та залишають на 2 хв. Згодом до такого розчину додають 3 краплі фенолфталеїну та проводять процес титрування свіжоприготованим 0,1 М розчином NaOH до появи стійкого блідо-рожевого забарвлення. Концентрацію амінного азоту в мг/мл (г/л) розраховують за витраченим на титрування об'ємом лугу.

Кислотне число (КЧ) обчислюють за формулою:

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

де V – кількість розчину лугу, витраченого у процесі титрування, мл;

C – концентрація використовуваного розчину натрію гідроксиду;

k – коефіцієнт відповідності 1 мл розчину 1 М натрію гідроксиду та масі Нітрогену, що відповідає 14 (мг)/(1 мл 1 М NaOH) [72].

8.3. Карта постадійного контролю

Нижче представлено узагальнену табл. 8.1 із постадійним контролем біотехнологічного виробництва гентаміцину.

Таблиця 8.1

Карта постадійного контролю

Номер та найменування контрольної точки	Об'єкт контролю і показник	Методи та засоби, необхідні для проведення контролю	Періодичність здійснення відбору проби та її контролю	Значення, встановлене нормативом
1	2	3	4	5
Кт 1.1 <i>Забір атмосферного повітря</i>	Повітрозабірник Висота забору повітря	-	Під час купівлі та при встановленні	Н (висота) = 10 м
Кт 1.2 <i>Очистка повітря від грубих домішок</i>	Очищене повітря Ступінь очистки, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення відповідно до показників, зазначених паспортом фільтра	Після закінчення стадії очищення	Е (ступінь очистки) = 90%
Кт 1.3 <i>Стиснення повітря</i>	Стиснене повітря Тиск, температура	Манометр, термометр	Після завершення компресування	Р = 0,35-0,5 МПа, t = 120-250°C
Кт 1.4 <i>Охолодження повітря і видалення зайвої вологи</i>	Охолоджене повітря Температура, вологовміст	Термометр, психрометр	Після охолодження і видалення вологи	t = 25-35°C, W = 60%
Кт 1.5 <i>Нагрівання повітря</i>	Нагріте повітря Температура, вологовміст	Термометр, психрометр	Після закінчення підігріву	t = 40-50°C, W = 50%

Кт 1.6 <i>Очищення повітря у головному фільтрі</i>	Повітря очищене Ступінь очистки, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно з паспортом фільтра	Після проходження через головний фільтр	E = 95%
Кт, Км 1.7 <i>Очищення повітря в індивідуальному фільтрі</i>	Очищене повітря Ступінь очищення, мікробіологічна чистота	Перевірка ступеня очищення згідно з паспортом фільтра, мікробіологічний контроль	Після проходження через індивідуальний фільтр	E = 99,999%, КУО - 0
Кт, Кх, Км 2.1.1 <i>Приготування та стерилізація 6%-го розчину натрію гідроксиду для підлучення середовища в інокуляторі на 25 л та посівному апараті на 250 л</i>	Розчин натрію гідроксиду Тиск, час, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск і тривалість визначаються безперервно протягом стерилізації, мікробіологічний контроль після завершення процесу	P = 0,15 МПа, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Кх, Км 2.1.2 <i>Приготування і стерилізація 6%-го розчину натрію гідроксиду для підлучення середовища у ферментері об'ємом 10 м³</i>	Розчин натрію гідроксиду Тиск, час, температура, стерильність	Манометр, годинник, датчик температури, мікробіологічний контроль	Тиск, температура і тривалість контролюються постійно протягом стерилізації, мікробіологічний контроль після завершення процесу	P = 0,15 МПа, t = 131 °С, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти

Продовження табл. 8.1

КТ, Км 3.1.1 Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу у колбах на качалці Приготування і стерилізація композиції А	Композиція А Тиск, час, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск і тривалість визначаються безперервно протягом процесу стерилізації, мікробіологічний контроль проводять після завершення	Р = 0,05 МПа, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
КТ, Км 3.1.2 Приготування і стерилізація композиції Б	Композиція Б Тиск, час, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск і час здійснюваного процесу визначаються безперервно протягом стерилізації, мікробіологічний контроль проводять після завершення	Р = 0,15 МПа, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
КТ, Км 3.2.1, 3.3.1 Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 25 л та посівному апараті об'ємом 250 л Приготування і стерилізація композиції А	Композиція А Тиск, час, температура, стерильність	Манометр, годинник, датчик температури, мікробіологічний контроль	Тиск, температура і час стерилізації контролюються постійно протягом процесу, мікробіологічний контроль після закінчення відповідного етапу	Р = 0,15 МПа, t = 112 °С, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти

Продовження табл. 8.1

Кт, Км 3.2.2, 3.3.2 <i>Приготування і стерилізація композиції Б</i>	Композиція Б Тиск, час, температура, стерильність	Манометр, годинник, датчик температури, мікробіологічний контроль	Тиск, температура і тривалість контролюються постійно протягом стерилізації, мікробіологічний контроль після завершення процесу	P = 0,15 МПа, t = 131 °С, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км, Кх 3.4.1 <i>Приготування і стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері 10 м³</i> <i>Приготування і стерилізація композиції А в УБС</i>	Композиція А Тиск, температура, час, стерильність	Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Час, температура і тиск, визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль здійснюють після стерилізації	P = 0,15 МПа, t = 131 °С, τ = 5-7 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1 <i>Підтримання колекційної культури</i>	Колекційна культура <i>Micromonospora echinospora</i> NRRL B-2995 Температура, час між пересівами, мікробіологічна частота	Холодильник, мікробіологічний контроль	Температура контролюється постійно під час зберігання, мікробіологічний контроль – кожні 3 – 4 місяці (кожного пересіву)	t = 2 – 4 °С, τ = 3 – 4 місяці, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 4.2 <i>Одержання робочої культури</i>	Робоча культура <i>M. echinospora</i> NRRL B-2995 на чашках Петрі Температура, мікробіологічна частота	Термостат, годинник, мікробіологічний контроль	Температура контролюється постійно протягом вирощування, мікробіологічний контроль – після закінчення часу вирощування	t = 28±1 °С, τ = 48 год, відсутність сторонньої мікробіоти

Кт, Км 4.3 <i>Вирощування на щільному середовищі</i>	Робоча культура <i>M. echinospora</i> NRRL B-2995 у пробірках Температура, мікробіологічна частота	Термостат, годинник, мікробіологічний контроль	Температура контролюється постійно протягом вирощування, мікробіологічний контроль – після закінчення часу вирощування та кожні 4 години встановленого терміну	$t = 28 \pm 1$ °C, $\tau = 48$ год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 4.4 <i>Вирощування посівного матеріалу у колбах на качалці</i>	Посівний матеріал Температура, час, швидкість обертів, концентрація біомаси, мікробіологічна частота	Термометр, годинник, тахометр, центрифуга, фотоелектроколориметр, мікробіологічний контроль	Температура і частота обертів мішалки контролюються автоматично під час вирощування, визначення концентрації біомаси і мікробіологічний контроль проводять після вирощування і кожні 4 год	$t = 34 \pm 1$ °C, $\tau = 48$ год, $w = 200$ об/хв, $Сб = 2,3 - 2,4$ г/л, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 4.5, 4.6 <i>Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі на 25 л та у посівному апараті на 250 л</i>	Посівний матеріал Температура, час, швидкість обертів, концентрація розчиненого кисню, рН, концентрація біомаси, мікробіологічна частота	Годинник, датчики температури, рН і pO_2 , тахометр, центрифуга, фотоелектроколориметр, мікробіологічний контроль	Температура, рН, концентрація розчиненого кисню і частота обертів мішалки контролюються автоматично під час вирощування, визначення концентрації біомаси і мікробіологічний контроль проводять після вирощування і кожні 4 год	$t = 34 \pm 1$ °C, $\tau = 48$ год, $pO_2 = 20 - 30\%$, $pH = 7,5$, $w = 200$ об/хв, $Сб = 2,3 - 2,4$ г/л, відсутність сторонньої мікробіоти

Закінчення табл. 8.1

Кт, Км 5.1 <i>Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 10 м³</i>	Культуральна рідина Температура, час, швидкість обертів, концентрація розчиненого кисню, рН, концентрація біомаси та гентаміцину, мікробіологічна частота	Годинник, датчики температури, рН і рО₂, тахометр, центрифуга, фотоелектроколориметр, хроматограф, мікробіологічний контроль	Температура, рН, концентрація розчиненого кисню і частота обертів мішалки контролюються автоматично під час вирощування, визначення концентрації біомаси, гентаміцину і мікробіологічний контроль проводять після вирощування і кожні 4 год	t = 34±1 °С, τ = 48 год, рО₂ = 20 – 30%, рН = 7,5, w = 200 об/хв, Сб = 4,6 – 4,7 г/л, Сг = 1,5 г/л, відсутність сторонньої мікробіоти
--	--	--	--	--

РОЗДІЛ 9. ОБГРУНТУВАННЯ СТАДІЙ ВИДІЛЕННЯ І ОЧИЩЕННЯ СУБСТАНЦІЇ ГЕНТАМІЦИНУ

Річна потужність виробництва гентаміцину становить $G_{\text{гп}} = 64$ кг/рік. Біологічний агентом для мікробного виробництва гентаміцину є штам *Micromonospora echinospora* NRRL B-2995, який утворює розгалужений та добре розвинений септований міцелій (псевдоміцелій).[73].

Враховуючи такі вихідні дані, слід підібрати оптимальну технологію отримання субстанції гентаміцину після його біосинтезу.

Після вирощування продуцента антибіотика проводять розділення культурального середовища на біомасу та культуральну рідину, а далі виділення та очистка антибіотика. З культурального середовища антибіотики виділяють екстракцією органічними розчинниками, осадженням, адсорбцією. Очищення антибіотиків проводять повторною заміною розчинника, адсорбційно-хроматографічними методами. Від ступеня чистоти препарату, вологості, температури, рН розчинника залежить стабільність антибіотика. Далі одержують препаративну форму антибіотика. До технологічних операцій цієї стадії можна віднести: концентрування, стабілізацію, а також зневоднення, якщо препарат одержують у сухому вигляді [74].

У літературі наведено спосіб одержання гентаміцину високої чистоти, який включає наступні стадії: додавання фільтруючої добавки до ферментаційної рідини гентаміцину та фільтрування; введення фільтрату в колонку макропористої смоли з великим діаметром частинок і виконання роздільної обробки; введення елюату в колонку макропористої смоли з малим діаметром частинок і виконання роздільної обробки; а також концентрування та проведення сублімаційної сушки для отримання гентаміцину високої чистоти.

					НУХТ БТЕК 04.03.45 КР ПЗ						
Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата							
Розроб.	Гребельна Д.Ю.				Розділ 9. Обґрунтування стадій виділення і очищення субстанції			Літ.	Арк.	Акрушіє	
Перевір.	Карлаш Ю.В.									79	113
Консультант								Кафедра БТМ			
Н. Контр.											
Затверд.	Стабніков В.П.										

За способом приготування гентаміцину високої чистоти продукт має високу чистоту і ступінь виходу, а якість продукту відповідає вимогам фармакопеї [75].

Отже, розглянемо основні стадії одержання гентаміцину.

9.1. Відділення культуральної рідини та біомаси

Для відділення біомаси від рідкої фракції, що містить антибіотик, використовують різні методи, такі як флотація, осадження, сепарування, центрифугування та фільтрація. Однак флотація та осадження не є ідеальними варіантами, оскільки ці процеси вимагають значного часу та застосування додаткових речовин, як-от флотатори чи осаджувальні агенти. Основна проблема з цими методами полягає в тому, що вони не завжди здатні ефективно відокремити біомасу від рідкої фракції, і це може призвести до значних втрат [76].

Сепарування є більш економічно ефективним методом, у порівнянні з флотацією чи осадженням, проте даний спосіб не підходить для відокремлення міцеліальної біомаси. Тому для розділення біомаси і рідкої фракції застосовують такі оптимальні методи як центрифугування та фільтрацію.

Фільтрування – це розділення твердої та рідкої фаз суспензії при її пропусканні через пористу перегородку. Кінцева мета фільтрування – одержання твердої або рідкої фази (коли одна з них належить до відходів) або одночасне одержання обох фаз. Фільтрування – гідродинамічний процес, швидкість якого прямо пропорційна різниці тисків, яка виникає по обидва боки від фільтрувальної перегородки, й обернено пропорційна опору, якого зазнає рідина при проходженні через пори перегородки та шар осаду, що утворився [77].

При фільтруванні культуральної рідини утворюються здебільшого драглисті пластівчасті або дрібнозернисті осадки, що характеризуються більшим опором. Середня швидкість фільтрації при цьому становить лише 50 л/м² за годину.

Центрифугування – це розділення неоднорідних систем під дією поля відцентрових сил. Для центрифугування застосовують центрифуги різних конструкцій. Центрифуги, що мають високий фактор розділення й оснащені тарілчастим барабаном, називають сепараторами. У мікробіологічній промисловості вони є одним з найпоширеніших типів центрифуг. Сепаратори

дозволяють сконцентрувати осад до вологості 60–90 %. Також існують спеціальні герметичні сепаратори, що дозволяють проводити процес сепарування у автоматизованому режимі, оптимально підбраному для специфічних умов конкретних культуральних рідин.

Недоліки центрифугування:

1. Складність конструкції, висока енергоємність і вартість.
2. Складність експлуатації (ненадійність, вібрація, шум тощо).
3. Вплив на клітини відцентрової сили, нагрівання, труднощі герметизації та забезпечення асептичних умов [77].

Підсумовуючи, центрифугування підходить для відділення клітин бактерій та дріжджів, але менш ефективно для міцеліальної біомаси. Фільтрація вважається кращим вибором для розділення міцеліальної біомаси, оскільки вона використовує менше енергії і дозволяє отримати чистіший супернатант.

Продукт гентаміцину *Micromonospora echinospora* утворює розгалужений міцелій (псевдоміцелій), тому в такому разі центрифугування не підходить для відділення біомаси біологічного агента. Кращим варіантом є застосування фільтрування для відділення біомаси *Micromonospora echinospora*.

Далі слід здійснити вибір фільтруючого обладнання.

Різноманітні фільтруючі системи (барабанні, стрічкові, тарілчасті, мембранні фільтри, карусельні вакуум-фільтри, фільтри-преси) засновані на однаковому принципі – затримці біомаси на пористій фільтруючій перегородці. Недоліком способу є налипання клітин на фільтр, шар яких знижує швидкість протікання рідини під час фільтрування. Для фільтрів безперервної дії передбачаються системи автоматичного очищення від біомаси, що забиває пори. Біомаса може видалятися з поверхні фільтрів стрімким потоком стисненого повітря або спеціальними ножами [78].

Найпоширенішим видом фільтрації є фільтрування з утворенням осаду. У промислових умовах застосовують різноманітні за конструкцією фільтри [79].

Для відділення біомаси грибів та бактерій, найкращим є використання фільтр-пресу ФПАКМ (фільтр-прес автоматичний камерний модернізований).

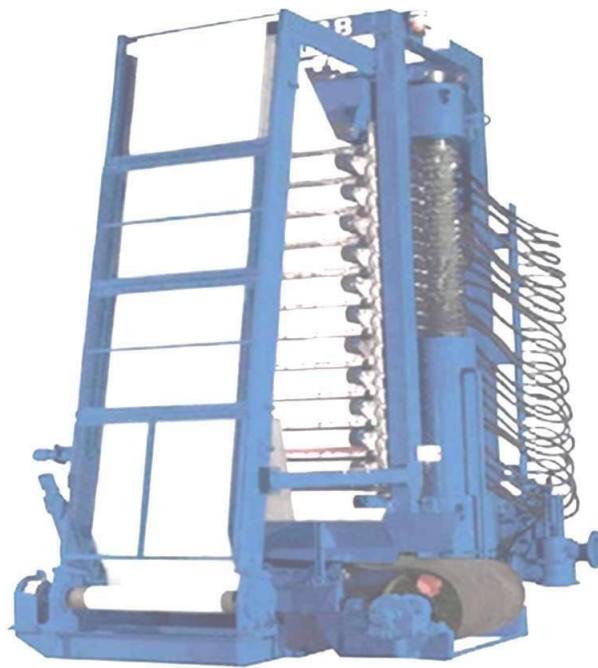


Рис. 9.1. Фільтр-прес ФПАКМ (фільтр-прес автоматичний камерний модернізований) [79].

На рис. 9.2. наведено схему роботи такого фільтра.

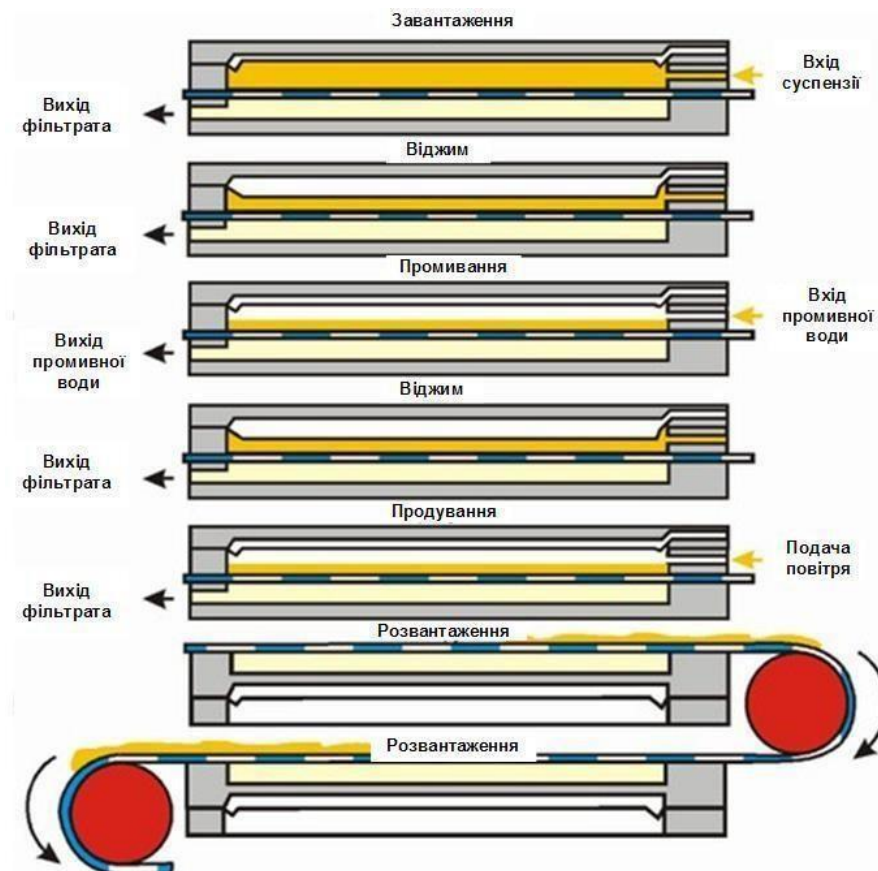


Рис.9.2. Схема циклів роботи ФПАКМ [79].

Отже, для фільтрування культуральної рідини обираємо фільтр-прес ФПАКМ.

Згідно патенту [75], до культуральної рідини гентаміцину додавали додаткові фільтруючі матеріали (ДФМ), перемішували та відфільтровували, отримуючи фільтрат, що містить гентаміцин.

Описані на етапі ДФМ можуть бути представлені перлітом або діатомітом, при цьому концентрація переважно становить від 0,5 до 5%. Додавання перліту або діатоміту під час процедури фільтрації може покращити швидкість фільтрації, скоротити цикл процесу, а також зменшити вміст сторонніх речовин у фільтраті, покращуючи якість фільтрату [75].

Інформаційні дані засвідчують, що використання перліту є більш економічно вигідним варіантом, у порівнянні з діатомітом [80].

Приймаємо, що будемо додавати перліт у концентрації 1% до культуральної рідини для наступного фільтрування. Приймаємо швидкість перемішування отриманої суміші культуральної рідини з флокулянт 100 об/хв, тривалість – 30 хв [75].

Після перемішування суміш фільтрують на фільтр-пресі ФПАКМ, як визначено вище. Фільтрат передають на наступну стадію виділення гентаміцину.

9.2. Адсорбція гентаміцину на макропористій смолі

У патенті [75] вказано, що після фільтрування проводили адсорбцію гентаміцину на макропористій смолі.

Адсорбція – мимовільне концентрування речовини на поверхні поділу фаз. Речовина, яка адсорбує на своїй поверхні іншу речовину носить назву адсорбента; речовина, яка адсорбується з об'єму має назву адсорбтив; ця ж речовина, яка вже адсорбувалася називається адсорбатом. Тобто для адсорбованої речовини використовують терміни адсорбтив (до адсорбції) та адсорбат (після адсорбції) [81].

За даними патенту [75], використовували колонку LX-50 з макропористою смолою, швидкість потоку завантаження складала 2400 мл/год. Після цього проводили градієнтне елюювання аміачним розчином, вміст аміаку в градієті складав 0,1 моль/л, швидкість потоку – 1200 мл/год. Елюат збирали, упарювали до

необхідної концентрації гентаміцину, додавали 3 М водну сірчану кислоту до рН 4,0, таким чином отримуючи неочищений гентаміцин.

В статті [82] розглянуто умови адсорбції гентаміцину на макропористій слабкокислій смолі Amberlite FPC3500. Оптимальні умови адсорбції були досягнуті при рН 7,0 протягом 1 години за кімнатної температури. Коефіцієнт виділення склав 94,8% за рН 7,6, при швидкості потоку 0,6 мл/хв та елююванні розчином аміаку в концентрації 7%. Результати засвідчили, що адсорбційна здатність такої смоли була кращою, порівняно з широко використовуваною сильнокислою смолою гелевого типу [82].

Отже, серед розглянутих способів, для адсорбції гентаміцину краще обрати слабкокислу смолу Amberlite FPC3500. Умови адсорбції – рН 7,0, тривалість 1 година, при швидкості потоку 0,6 мл/хв та елюювання розчином аміаку в концентрації 7%.

9.3. Друга стадія виділення гентаміцину та отримання гентаміцину сульфату

Далі проводять другий етап виділення гентаміцину. Згідно патенту [75], виконують елюювання 1 М розчином аміаку, швидкість потоку становить 1200 мл/год. Елюат збирають та випарюють до концентрації гентаміцину 10000 мкг/мл.

Випарювання – це процес утворення парової фази, який відбувається в усій масі рідини і, головним чином, на межі між паровою бульбашкою і рідиною. Випарювання настає при температурі кипіння, за якої тиск насиченої пари рідини дорівнює зовнішньому тиску [79].

Сучасним напрямом використання випарних апаратів для концентрування розчинів БАР є використання роторно-плівкового випарника (РПВ).

Основними перевагами роторно-плівкового випарника є:

- на нагрівачі не утворюються відкладення при температурі випарювання середовища аж до 150°C;
- використання великої різниці температур між гріючою парою та розчином, що випарюється, дозволяє повністю зберегти склад первинного продукту;

- висока теплонапруженість теплообмінної поверхні та низька металоємність конструкції;
- модульність і технологічність конструкцій;
- високий енергетичний потенціал вторинної пари;
- малий час перебування вихідного продукту в апараті при його вертикальному компонуванні;
- високий ступінь випарювання [79].

Таким чином, для упарювання елюату гентаміцину до концентрації антибіотика 10000 мкг/мл оберемо роторно-плівковий випарник.

Автори патенту [75] зазначили, що після випарювання додають 3 М водний розчин сірчаної кислоти до рН 4,0, таким чином отримуючи гентаміцину сульфат.

Зважаючи на це, будемо слідувати даній технології та використовувати 3 М водний розчин сірчаної кислоти.

9.4. Додаткове очищення гентаміцину сульфату

Осадженням називають процес, в якому додавання певних реагентів або зміна фізико-хімічних умов викликає випадання розчиненої речовини в осад [79].

Так, патент [83] засвідчує, що гентаміцин очищували шляхом осадження. До концентрату гентаміцину (концентрацією 600 г/л) додавали до метанолу у співвідношенні 1:5. Осадження відбувалось протягом 30 хвилин при кімнатній температурі. Аморфний осад гентаміцину, який утворюється, легко фільтрується за допомогою стандартного дискового фільтра [83].

Таким чином, після адсорбції гентаміцину сульфат в складі елюату будемо осаджувати метанолом у співвідношенні 1:5 протягом 30 хв.

9.5. Відділення осадженого гентаміцину сульфату

При осадженні проходить фізико-хімічний процес переходу гентаміцину із розчинного стану в осад під дією метанолу і таким чином утворюється осад гентаміцину. Тому далі слід відділити осад гентаміцину від рідкої фази [84].

Вибір методу розділення неоднорідних систем залежить головним чином від розмірів завислих частинок. Застосовують наступні методи розділення неоднорідних систем:

- осадження (відстоювання);
- фільтрування;
- центрифугування.

Осадження представляє собою процес розділення, при якому завислі в рідині або газі тверді або рідкі частинки відділяються від суцільної фази під дією сили тяжіння, сил інерції (в тому числі відцентрових) або електростатичних сил. Осадження, яке відбувається під дією сил тяжіння називається відстоюванням. В основному відстоювання застосовується для попереднього, грубого розділення неоднорідних систем.

Фільтрування—процес розділення з допомогою пористої перегородки, здатної пропускати рідину або газ, але затримувати завислі в середовищі тверді частинки. Воно здійснюється під дією сил тиску або відцентрових сил і застосовується для більш тонкого розділення суспензій і пилу, ніж шляхом осадження.

Центрифугування—процес розділення суспензій і емульсій в полі відцентрових сил. Під дією цих сил осадження поєднується з ущільненням утвореного осаду, а фільтрування—з ущільненням і механічною сушкою осаду

Фільтрування з утворенням осаду найбільш поширене. У більшості випадків тверді частинки в початкові моменти з початку фільтрування проходять через пори фільтрувальної перегородки, але скоро накопичуються на ній, і через фільтр починає протікати тільки освітлена рідина—фільтрат. Таким чином, у цьому процесі утворений шар осаду грає роль основного фільтруючого середовища [84].

Зважаючи на вищезазначене, для концентрування гентаміцину слід здійснювати фільтрування осадженого осаду антибіотика.

Як зазначено вище, аморфний осад гентаміцину легко фільтрується за допомогою стандартного дискового фільтра. Оскільки це питання вже було досліджено науковцями, що підтверджується літературними даними, для відділення осаду гентаміцину оберемо дисковий фільтр.

9.6. Висушування гентаміцину сульфату

Патент [75] засвідчує використання сублімаційної сушки для отримання гентаміцину високої чистоти. Однак слід розглянути особливості цього способу сушіння, а також альтернативних методів зневоднення субстанції гентаміцину.

Зважаючи на термолабільність, сушіння антибіотиків може бути ліофільне, розпилювальне, у вакуум-сушильних шафах [85].

Сублімаційне (ліофільне) сушіння. Метод сублімаційного зневоднення дає можливість отримати продукти найвищої якості, оскільки в них повністю зберігається біологічна активність.

У процесі основного зневоднення матеріал перебуває в замороженому стані, тому мікроструктура і властивості матеріалу зберігаються максимально. Препарати, висушені цим методом, зберігають початковий об'єм і легко поглинають вологу під час зволоження, зберігають колір, запах та ін.

Переваги:

- ✓ волога видаляється при низьких температурах, що практично виключає термоінактивацію продукту;
- ✓ зберігається стабільна структура матеріалу (не відбувається руйнування або конгломерація частинок);
- ✓ практично не видаляються леткі компоненти висушуваного матеріалу, не порушується його хімічний склад;
- ✓ полегшується можливість отримання сухого продукту, упакованого у стерильному вигляді.

Недоліки:

- ✓ складність сублімаційного обладнання;
- ✓ тривалість;
- ✓ енергоємність процесу.

Розпилювальне сушіння. Відбувається при високих температурах. Розчин антибіотика пневматично розпилюється до мікрокраплинок у камері з потоком нагрітого повітря. Процес сушіння антибіотиків триває кілька секунд. За таких умов зберігаються навіть термолабільні препарати.

Вакуумне сушіння. Відбувається при низьких температурах (30-35 °С). Дешевий та ефективний метод.

Недоліки: отримання матеріалу у вигляді коржа; не можна піддавати такому сушінню рідини; малоефективний, оскільки потребує великого об'єму площ [85].

Спосіб сушіння, при якому розчин продукту перегрівають перед розпиленням, має свої переваги. Даний метод дозволяє підвищити ефективність розпилення, зменшити розміри установки, знизити питомі витрати. У деяких випадках підвищуються технологічні показники готового продукту. При необхідності висушити дорогі термочутливі продукти застосовують ультразвукові розпилювачі і генератори ультразвукового поля в сушильних камерах. Процес розпилювальної сушіння може бути здійснений для будь-яких продуктів, які можливо подати до розпилювальних пристроїв за допомогою насоса або під тиском. Найважливішою умовою для правильного сушіння є розпилення матеріалу для отримання частинок, максимально однакових за розміром. Це може бути досягнуто підбором відповідної розпилювальної форсунки або диска, регулюванням тиску рідини або повітря в форсунці, швидкості обертання розпилювального диска, в'язкості і температури матеріалу, а також вмісту в ньому сухих речовин [86].

Однак розпилювальне висушування не підходить для сушіння осаду гентаміцину сульфату через особливості процесу. Тому обираємо сублімаційне сушіння для зневоднення субстанції гентаміцину сульфату, адже при цьому зберігаються основні властивості антибіотика без втрат його біологічної активності.

9.7. Подрібнення та просіювання субстанції гентаміцину сульфату

Оскільки для ліофільного сушіння гентаміцину його осад розміщують на піддонах, а після висушування утворюється суцільна висушена маса гентаміцину, виникає потреба у подрібненні та просіюванні висушеного гентаміцину.

Здрібнювання матеріалу проводиться за допомогою спеціальних подрібнювальних машин (дробарок та млинів), які можуть класифікуватись: за призначенням (машини попереднього і остаточного подрібнення), способом подрібнення (різальні машини (траворізки, коренерізки), чавильні та розтиральні машини (валки, бігуни, жорна), ударно-відцентрові млини (молоткові, хрестобійні,

дезінтегратор, дисмембратор), ударно-розтиральні млини (кульові й стрижневі), машини надтонкого подрібнення (вібромлини, колоїдні і струменеві млини)), ступенем здрібненості матеріалу (дробарки великого, середнього і дрібного дроблення, млини тонкого і колоїдного подрібнення), характером робочого інструменту (машини дискові, кульові, ножові, роторні тощо) [87].

В подрібнювачах ударної дії руйнування матеріалу відбувається за рахунок ударних навантажень. Дані навантаження виникають при дії подрібнюючих тіл на матеріал, зіткненні леткого матеріалу з нерухомою поверхнею, зіткненні матеріалу та подрібнюючих тіл на льоту, зіткненні на льоту здрібнюючих часток один з одним [88].

До числа молоткових подрібнювачів відносяться молоткові дробарки, бильні та шахтні млини. Основними робочими елементами молоткових подрібнювачів є ротор з молотками та статор – корпус. Молоткова дробарка складається з футерований корпусу 1, який стальними відбійними плитами 4, на валу 2 вставлені диски 3, між якими шарнірно підвішені молотки 5. Матеріал подрібнюється під дією ударних навантажень молотків. Частинки матеріалу, які досягли певного розміру проходять через колошникову решітку 6 та виводяться з дробарки. Молотки, плити та решітка виготовляються з зносостійкої сталі (вуглецевої з твердосплавними напайками або марганцевистої). Молоткові використовуються для подрібнення різних крихких матеріалів низької та середньої міцності. Ступінь подрібнення в молоткових дробарках досягає 10-15 при кінцевому розмірі часток 3-5мм [88].

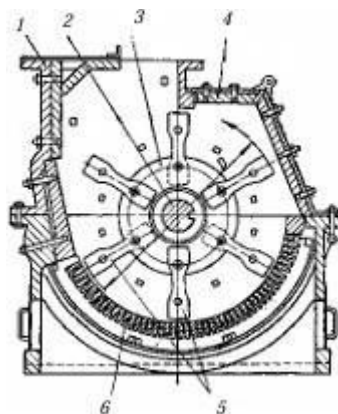


Рис. 9.3. Молоткова дробарка: 1 – корпус; 2 – вал; 3 – диск; 4 – відбійна плита; 5 – молотки; 6 – колошниковая решітка [88].

Переваги молоткових подрібнювачів в порівнянні з щокowymi і конусними є знижена витрата енергії та висока ступінь подрібнення [88].

Таким чином, для подрібнення висушеної маси гентаміцину варто використати молоткову дробарку.

Просіювання подрібненого матеріалу проводять за допомогою ситових механізмів різної конструкції: обертові, хитні і вібраційні. За конструкцією вібропристрою розрізняють три види вібраційних грохотів: електромагнітні, гіроційні та інерційні [87].

Просіювання сипкого матеріалу здійснюється при русі кусків (або часток) по робочій поверхні грохота. Існує багато типів грохотів, які за формою сит можна розділити на дві групи: плоскі та барабанні (циліндричні) і в залежності від положення сит – на похилі та горизонтальні. Плоскі грохоти підрозділяють на решітчасті, ситові, колошникові та валкові. Для попереднього просіювання (відділення дріб'язку або занадто великих кусків) використовують нерухомі грохоти з кутом нахилу $30 - 50^\circ$. Найпоширеніші схеми (способи) ситових грохотів для механічного сортування (просіювання) матеріалу наведені на рис. 3.2. За першим способом сортування (просіювання) вихідного матеріалу «від дрібного до крупного» починають з решета (сита) із найменшими отворами і закінчують на решеті (ситі) з найбільшими отворами. Розміщені таким чином сита зручно

ремонтувати, а також знімати з них готовий продукт. Однак якість просіювання погіршується через стирання дрібних сит та кришення матеріалу [88].

За другим способом сортування (просіювання) « від крупного до дрібного » сита розміщують один над одним. Верхнє сито має найбільші отвори, а нижнє – найменші.

Переваги другого способу: менше стирання сит та кришення матеріалу, висока ефективність просіювання. Недоліки схеми: велика висота встановлення, незручність ремонту сит та вузький фронт розвантаження сортів.

Третій спосіб сортування (просіювання) – комбінований, коли суміш надходить спочатку на решето з отворами середнього розміру, а частки які пройшли через отвори в першому решеті, надходять на розміщене під ним решето із найменшими отворами, тоді як шматки великих розмірів надходять на друге решето із найбільшими отворами. Ця схема поєднує в собі недоліки і переваги двох перших схем.

За конструктивними особливостями і обладнанням приводу ситові грохоти поділяють на коливні, гіраційні та вібраційні [88].

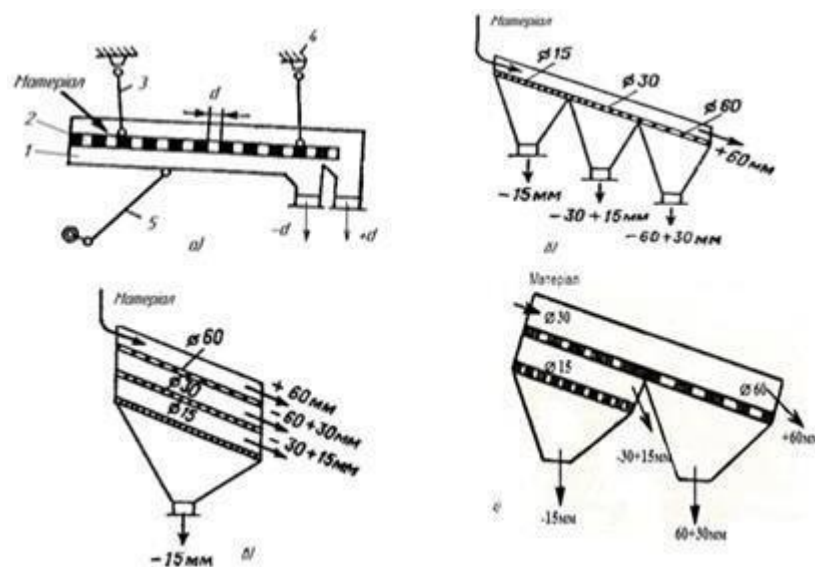


Рис. 9.4. Схеми ситових грохотів: а – односитовий; б – багатоситовий з горизонтальним розташуванням сит; в – багатоситовий з вертикальним розташуванням сит; г – комбінований; 1 – короб; 2 – сито; 3 – підвіски; 4 – опорна рама; 5 – привід [88].

Таким чином, для просіювання подрібненої субстанції гентаміцину варто використати односитовий грохот, що забезпечить оптимальне просіювання кожної виробленої серії даного антибіотику.

9.8. Фасування, стерилізація та пакування гентаміцину сульфату

Після подрібнення та просіювання субстанція гентаміцину повністю готова до стадій фасування.

Тому завершальний етап роботи — розфасування та пакування готового препарату у пакети. Сухий антибіотик стерилізують іонізуючим випромінюванням.

На упаковці стерильного антибіотика вказують біологічну активність, дату виготовлення і термін зберігання [85].

9.9. Процесуальна схема післяферментаційних стадій виробництва гентаміцину сульфату

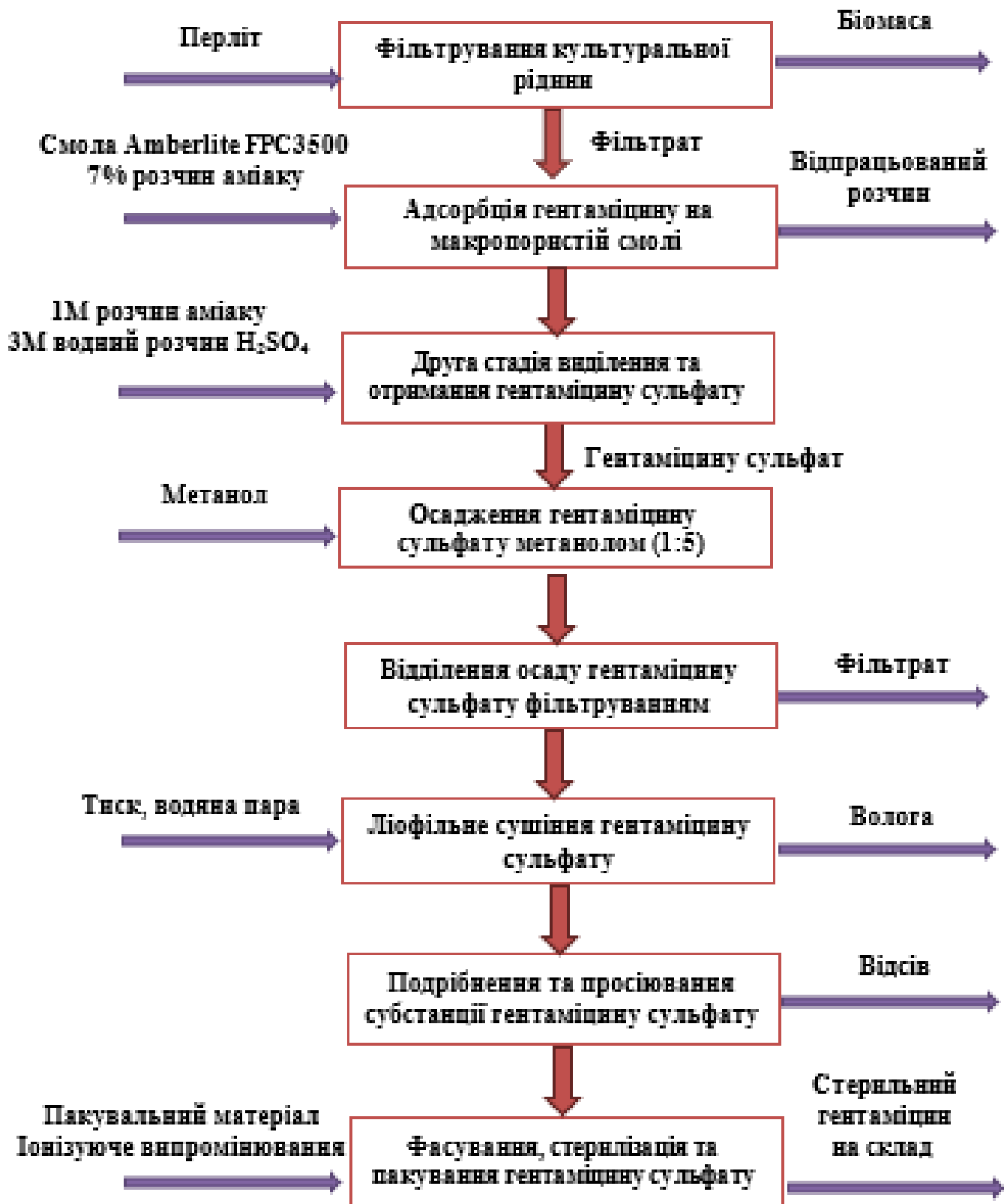


Рис. 9.5. Процесуальна схема післяферментаційного одержання гентаміцину сульфату.

РОЗДІЛ 10. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ

Рідкі відходи, що утворюються під час виробничого процесу гентаміцину з *Micromonospora echinospora*, є важливим аспектом екологічної стійкості та сталого виробництва антибіотиків. Під час виробництва гентаміцину з цієї мікроорганізми виникає ряд відходів, які потребують уважного контролю та управління для зменшення негативного впливу на довкілля та забезпечення дотримання вимог екологічних стандартів.

Одним з основних компонентів рідких відходів є водні розчини, що містять різні органічні та неорганічні сполуки, такі як залишки органічних реагентів, розчинники, іони металів та інші хімічні речовини, які використовуються у процесі синтезу гентаміцину. Ці розчини часто мають високий рівень токсичності та можуть бути небезпечними для довкілля, якщо їх викинути без належної обробки.

Додатково, рідкі відходи можуть включати біологічні залишки, такі як відмерлі клітини *Micromonospora echinospora* та інші мікроорганізми, які використовуються в процесі ферментації для виробництва гентаміцину. Ці біомаси також потребують спеціальної обробки та утилізації, щоб запобігти забрудненню ґрунту та водойм.

Для зменшення негативного впливу рідких відходів на довкілля існують різні стратегії, включаючи використання технологій очищення води, які дозволяють видалити токсичні речовини та забезпечити повторне використання води у виробничому процесі. Також можуть застосовуватися методи біологічної обробки відходів, наприклад, використання мікроорганізмів для біорозкладання органічних сполук.[89,90]

					НУХТ БТЕК 04.03.45 КР ПЗ		
Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Розділ 10. Охорона довкілля		
Розроб.	Гребельна Д.Ю.						
Перевір.	Карлаш Ю.В.						
Консультант							
Н. Контр.							
Затверд.	Стабніков В.П.				Кафедра БТМ		
					Літ.	Арк.	Акрушів
						94	113

10.1.1 Розрахунок орієнтовного об'єму стічних вод

Залишки мийно-дезінфікуючих засобів. Відомо, що для миття та дезінфекції обладнання за допомогою мобільної циркуляційної СІР-мийки необхідно приготувати робочі розчини із розрахунку 20-30% від об'єму ємкісного обладнання. Відповідно до специфікації обладнання, для цього розрахунку будемо використовувати реактори-збірники, інокулятори та ферментери.

$$V_{\text{ємностей}} = V_{\text{реактор}} + V_{\text{інокулятор}} + V_{\text{реактор}} + V_{\text{інокулятор}} + V_{\text{реактор}} +$$

$$V_{\text{ферментер}} = 10 + 25 + 100 + 63 + 250 + 10\,000 + 25 + 10\,000 = 20\,473 \text{ л}$$

Тоді об'єм мийно-дезінфікуючих засобів становитиме:

$$V_{\text{засобів}} = 20\,473 \cdot 0,2 = 4\,094,6 \text{ (4\,095) л}$$

$$V_{\text{засобів}} = 20\,473 \cdot 0,3 = 6\,141,9 \text{ (6\,142) л}$$

Приймаємо, що об'єм відпрацьованих залишків засобів дорівнює об'єму цих засобів, тобто 4 095-6 142л.

Відпрацьована вода після ополіскування обладнання. Об'єм води для ополіскування, так само як і мийно-дезінфікуючого розчину, становить 20-30% від об'єму ємнісного обладнання. Як і розраховано вище, цей параметр дорівнює 4 095-6 142л. Таким чином, в сумі орієнтовна кількість стічних вод за один цикл виробництва становитиме: 6 142+6 142 = 12 284 л.

Виходячи з розрахунків курсового проекту відповідно ТЕО виробництво є дрібнотонажним орієнтовний об'єм стічних вод на 1 т готової продукції дорівнює 85 000 м³.

10.1.2 Визначення середніх витрат стічних вод від промислового підприємства

Для розрахунку виробничих стічних вод візьмемо до уваги данні з ТЕО потужність виробництва становить 64 кг ($66,88 \text{ м}^3$) гентаміцину за 60 днів.

Кількість трудоднів прийнято за 60, тоді об'єм культуральної рідини за добу становить:

$$V_d = V_{\text{гп}} / T_{\text{тр}} = 66,88 / 60 = 1,12 \text{ м}^3$$

Тоді,

$$Q_e = q_e \cdot n;$$

де q_e - норма водовідведення в л на одиницю продукції, яку випускає підприємство (орієнтовно можна прийняти відповідно до пройденої практики тобто 50-100 л); n - кількість одиниць продукції, що виробляється за зміну (розраховується у масових одиницях випуску готової продукції на добу).

$$Q_e = 100 \cdot 1120 \approx 112\,000 \text{ л/доба.}$$

Середні за зміну витрати побутових стічних вод становлять:

$$Q_n = q_n \cdot N = 25 \cdot 5 = 125 \text{ л/зміну,}$$

де q_n – норма відведення побутових стічних вод в л/зм на одного робітника (приймаємо для холодного цеху $0,025 \text{ м}^3/\text{зм}$ люд); N – кількість робітників, що працюють у зміну, приймаємо 5:

1. Технолог цеху (біотехнолог): ця особа буде відповідати за процес культивування, збір та очищення біомаси з ферментера.
2. Мікробіолог ВКЯ (відповідальний за контроль якості): відповідає за контроль якості на різних етапах виробництва та забезпечує виконання стандартів GMP і вимог затверджених регулюючими органами.
3. Технік з обслуговування та ремонту обладнання: ця особа буде відповідати за обслуговування та ремонт обладнання в разі необхідності.
4. Керівник зміни: ця особа буде відповідати за керування роботою всіх працівників на зміні та вирішення питань, пов'язаних з виробництвом біомаси бактерій.

5. Санітарний робітник: цей працівник забезпечує дотримання правил санітарної гігієни чистоти в цеху. Він займається підготовкою приміщень, дезінфікує обладнання та поверхні, контролює виконання правил особистої гігієни працівників, дотримання ними правил переодягання та захисту від шкідливих впливів, що забезпечує безпеку продукту та працівників

Саме таку кількість робітників ми приймаємо, бо відповідно до вимог GMP варто мінімізувати кількість робітників на зміні, адже персонал це головне потенційне джерело контамінації. Також, якщо правильно провести процес оптимізації виробництва, то зменшення кількості робітників може допомогти знизити рівень помилок та підвищити рівень якості продукції. [91]

Середні за добу витрати побутових стічних вод становлять:

$$Q_n = Q_n \cdot N_{зм} = 125 \cdot 3 = 375 \text{ л/добу},$$

де $N_{зм}$ – кількість змін на добу ($N_{зм} = 4$).

Загальна за добу витрата атмосферних стічних вод становлять:

$$Q_a = Q_n/15 = 375/15 = 25 \text{ л/добу}.$$

Загальні витрати стічних вод, що утворюються на підприємстві, становлять:

$$Q = Q_e + Q_n + Q_a = 112\,000 + 375 + 25 = 112\,400 \text{ л/добу}.$$

Зважаючи на отримані данні пропонується використовувати систему фільтрації AquasanaRhino. Дана система має приблизну продуктивність 30 000 л на добу, що підходить під потреби виробництва. Також, AquasanaRhino здійснює запатентовану 4х ступеневу систему очистки води:

1-й ступінь: фільтрація будь-якого осаду, що може бути водопровідна вода. Коли цей осад видалено, він не може засмітити головний фільтр, таким чином збільшуючи термін служби фільтра.

2-й ступінь: гранули цинку та міді створюють окисно-відновний потенціал, що змінює молекулярну структуру хлору та перетворює його на нешкідливий хлорид. Враховуючи, що для дезінфекції виробництва ми будемо використовувати засоби, що містять хлор в складі (хлорамін-Б, новохлор екстра), дана система очищення доволі актуальна.

3-й та 4-й ступінь: гранули активованого вугілля різного розміру. Вугільні фільтри використовуються для видалення органічних забруднень, таких як хлор, бензол та інші хімічні речовини. Також, допомагають відфільтрувати бактеріальні клітини. Активне вугілля є ефективним поглиначем запахів, хімічних та органічних забруднень, що дозволяє очищувати стічні води від цих речовин. Активне вугілля після регенерації знову набуває своїх фільтраційних властивостей.

Данна фільтраційна система забезпечує очистку води від бактерій, хімічних речовин, запахів та інших забруднень. Також, додатковою перевагою AquasanaRhino є його компактні розміри. Це дозволяє встановити фільтраційну систему в будь-яке місце, щоб забезпечити максимальну ефективність очищення стічних вод.

Також, до рідких відходів підприємства можна віднести супернатант, отриманий під час виділення біомаси бактерій центрифугуванням.

Залишки супернатанту після отримання цільового продукту пропонується використати для потреб промисловості чи сільського господарства. *M. echinospora* NRRL B-2995 може бути використана як джерело високоякісного білка для кормів тварин. Цей продуцент містить значні кількості білка з усіма необхідними амінокислотами для здорового росту та розвитку тварин, особливо молодняку, тварин у період лактації або вирощування.[92]

Крім того, *Micromonospora echinospora* NRRL B-2995 відома своєю здатністю накопичувати масла. Ці масла можуть бути використані як джерело енергії для тварин у кормах, забезпечуючи енергію для фізіологічних процесів та активностей тварин.

Micromonospora aechinospora виробляє різноманітні ферменти, такі як ліпази, амілази та протеази. Додавання таких ензимів до кормів поліпшує перетравлення складних компонентів кормів та забезпечує краще засвоєння поживних речовин тваринами [93]

10.2. Система знешкодження газоподібних відходів

Утворення газоподібних відходів, що містять аерозоль клітин у вигляді відпрацьованого повітря після аерації культуральної рідини на стадіях:

- отримання посівного матеріалу в інокуляторі 25 л
- отримання посівного матеріалу в посівному апараті 250 л
- отримання посівного матеріалу в ферментері 10м3

Розрахуємо об'єм відпрацьованого повітря, знаючи, що він приблизно дорівнює об'ємам аераційного повітря

1. В інокуляторі 25 л, робочий об'єм 10,5 л, отже аераційного повітря потрібно 21л/хв, тобто 1 260 л/год. Процес отримання посівного матеріалу займає 48 год, для цього необхідно 60,48 м3 аераційного повітря на виробничий цикл.

2. В посівному апараті 250 л, робочий об'єм 125,5 л, отже аераційного повітря потрібно 2 л/хв, тобто 751 л/хв . Процес отримання посівного матеріалу займає 48 год, для цього необхідно $48 \cdot 60 \cdot 751 = 2\,162\,880$ л аераційного повітря на виробничий цикл.

3. В ферментері 10 000 л, робочий об'єм 5960 л, отже аераційного повітря потрібно $60 \cdot 2 = 120$ л/год, тобто $5960 \cdot 120 = 715\,200$ л/год. Процес отримання посівного матеріалу займає 120 год, для цього необхідно $715\,200 \cdot 120 = 85\,824\,000$ л аераційного повітря на виробничий цикл.

Система "циклон + фільтр сітчастий (Ц-ФС)" використовується на стадіях культивування виробництва гентаміцину для ефективного очищення газоподібних відходів. Під час першого етапу проходження газоподібних відходів через циклон відбувається їх відділення за допомогою центробежної сили. Це призводить до відокремлення великих часток від газового потоку, які осідають на стінках циклона і збираються внизу для подальшого видалення.

На другому етапі газ, який проходить через циклон, подається через фільтр сітчастий. Фільтр сітчастий діє, як бар'єр для дрібних та твердих частинок, які

можуть залишитися в газовому потоці. Сітка фільтру затримує ці частки, а чистий газ проникає через неї, забезпечуючи подальше очищення.

Управління процесами цієї системи дуже просте і здійснюється за допомогою двох основних параметрів - часу та температури. Це дозволяє операторам ефективно контролювати процеси очищення з мінімальними зусиллями.

Однією з головних переваг цієї системи є безпека, оскільки вона не вимагає роботи з хімікатами. Це дозволяє підвищити рівень безпеки для персоналу і запобігти можливим аваріям або витокам небезпечних речовин.

Крім того, система "циклон + фільтр сітчастий" компактна і може бути легко розміщена у будь-якому приміщенні заводу без значних змін у вже існуючій інфраструктурі. Це забезпечує ефективне очищення газоподібних відходів у будь-яких умовах виробництва.

10.3. Системи знешкодження твердих відходів

Системи знешкодження твердих відходів при отриманні гентаміцину зазвичай орієнтовані на ефективну обробку та утилізацію відходів, що виникають під час процесу виробництва цього антибіотику. Оскільки в процесі синтезу гентаміцину може утворюватися ряд твердих відходів, важливо мати системи, які забезпечують їх безпечну обробку та подальше використання або утилізацію.

Одним із типових твердих відходів є відходи від фільтрації та відділення, що містять відстій, осади та інші тверді частинки, що утворюються під час очищення розчинів та суспензій у процесі виробництва гентаміцину. Ці відходи зазвичай потребують обробки та утилізації для забезпечення їх безпечності та зменшення впливу на довкілля.

Одним з можливих методів знешкодження твердих відходів є їх обробка за допомогою технологій, таких як термічна обробка чи піроліз. Ці методи можуть включати в себе згоряння відходів при високих температурах з подальшим відновленням енергії, або розкладання їх до більш простих складових частин за допомогою нагрівання в абсенсії кисню. Такі процеси дозволяють перетворити

тверді відходи на менш токсичні чи навіть корисні продукти, такі як енергія або сировину для інших процесів.

Крім термічної обробки, існують і інші методи знешкодження, наприклад, біологічне розкладання твердих відходів за допомогою мікроорганізмів або комбінація різних фізико-хімічних методів, таких як фільтрація, осадження, або хімічне оброблення. Вибір конкретного методу знешкодження твердих відходів зазвичай залежить від різних факторів, таких як склад відходів, обсяги, доступність технологій та екологічні аспекти. [94]

Тверді відходи виробництва гентаміцину можна класифікувати за декількома критеріями, такими як хімічний склад, фізичні властивості та ступінь небезпеки для здоров'я та навколишнього середовища. Основні категорії твердих відходів включають:

Органічні відходи: Це можуть бути залишки біомаси, включаючи мікроорганізми, які використовуються під час ферментації для виробництва гентаміцину, а також залишки сировини та продуктів реакцій.

Неорганічні відходи: Це можуть бути різноманітні відходи, такі як використані фільтри, устаткування, що вийшло з ладу, або інші матеріали, що використовуються під час процесів очищення та виробництва.

Упаковочні матеріали: Це включає у себе упаковку сировини, реагентів, обладнання та інші матеріали, що використовуються під час виробництва гентаміцину.

Контаміновані відходи: Це можуть бути відходи, які містять залишки хімічних речовин або забруднення, що можуть бути небезпечними для здоров'я або навколишнього середовища.

Для знешкодження твердих відходів виробництва гентаміцину може застосовуватися метод термічної обробки, зокрема інкунація або піроліз. Ці методи передбачають високу температуру і часткове згоряння відходів з метою зниження їх обсягу та знешкодження потенційно небезпечних речовин. Після процесу термічної обробки залишки можуть бути відновлені до безпечного стану або використані для виробництва енергії.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ:

1. Chandra N., Kumar S. Antibiotics Producing Soil Microorganisms. *Antibiotics and Antibiotics Resistance Genes in Soils*. 2017, 1–18. doi: 10.1007/978-3-319-66260-2_1.
2. Towne T.G. Aminoglycosides. *Encyclopedia of Toxicology*. 2014, 191 – 193. doi: 10.1016/B978-0-12-386454-3.00234-7.
3. Wei Z., Shi X., Lian R., Wang W., Hong W., Guo S. Exclusive Production of Gentamicin C1a from *Micromonospora echinospora* by Metabolic Engineering. *Antibiotics*. 2019, 8 (4): 267. doi: 10.3390/antibiotics8040267.
4. Проблема щодо інфекційних хвороб в Україні. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.unian.ua/health/country/82630-problema-schodo-infektsiynih-hvorob-v-ukrajini.html>.
5. Barka E. A., Vatsa P., Sanchez L., Gaveau-Vaillant N., Jacquard C., Klenk H.-P., van Wezel G. P. Taxonomy, Physiology, and Natural Products of *Actinobacteria*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2015, 80 (1): 1–43. doi: 10.1128/MMBR.00019-15.
6. Chang Y., Chai B., Ding Y., He M., Zheng L., Teng Y., Liu T. Overproduction of gentamicin B in industrial strain *Micromonospora echinospora* CCTCC M 2018898 by cloning of the missing genes *genR* and *genS*. *Metabolic Engineering Communications*. 2019, 24 (9): e00096. doi: 10.1016/j.mec.2019.e00096.
7. Hifnawy M. S., Fouda M. M., Sayed A. M., Mohammed R., Hassan H. M., AbouZid S. F., Abdelmohsen U. R. The genus *Micromonospora* as a model microorganism for bioactive natural product discovery. *RSC Advances*. 2020, 10 (35): 20939 – 20959. doi: 10.1039/d0ra04025h.
8. Armstrong E. S., Kostrub C. F., Cass R. T., Moser H. E., Serio A. W., Miller G. H. Aminoglycosides. *In Antibiotic discovery and development*. 2021, 229-269. doi: 10.1007/978-1-4614-1400-1_7.
9. Посохова К. А., Вікторов О. П. Антибіотики (властивості, застосування, взаємодія): Навчальний посібник. — Тернопіль: ТДМУ, 2005. — 296 с.
10. «Державна Фармакопея України» Харків , 2021.

11. Trujillo M. E., Hong K., Genilloud O. The family *Micromonosporaceae*. *The Prokaryotes: Actinobacteria*. 2014, 4: 499-569.
12. Kumar C., Himabindu M., Jetty A. Microbial Biosynthesis and Applications of Gentamicin: A Critical Appraisal. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2008, 28 (3): 173 – 212. doi: 10.1080/07388550802262197.
13. Chan A., Cross J., He Y., Lippa B., Ryan D. Antibacterial Drugs. *Drug Discovery: Practices, Processes, and Perspectives*. 2013, 389 - 438. doi: 10.1002/9781118354483.ch10.
14. Simpkin V. L., Renwick M. J., Kelly R., Mossialos E. Incentivising innovation in antibiotic drug discovery and development: progress, challenges and next steps. *The Journal of Antibiotics*. 2017, 70 (12): 1087 – 1096. doi: 10.1038/ja.2017.124.
15. Wencewicz T. A. Crossroads of Antibiotic Resistance and Biosynthesis. *Journal of Molecular Biology*. 2019, 431 (18): 3370 – 3399. doi: 10.1016/j.jmb.2019.06.033.
16. Li S., Guo J., Reva A., Huang F., Xiong B., Liu Y., Sun Y. Methyltransferases of gentamicin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2018, 115 (6): 1340 – 1345. doi: 10.1073/pnas.1711603115.
17. Gentamicin C1. [Электронный ресурс] – режим доступа: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/72395>.
18. Интернет джерело: [Режим доступа:] <https://studfile.net/preview/5797775/page:6/>
19. Интернет джерело: *Micromonospora echinospora* subsp. *echinospora* DSM 43816 is a mesophilic bacterium that builds an aerial mycelium and produces antibiotic compounds. [Режим доступа:] <https://bacdiv.dsmz.de/strain/7972>
20. Chaves B.J., Tadi P. Gentamicin. Study Guide from StatPearls Publishing, Treasure Island (FL). 2022. PMID: 32491482.
21. Chen C., Chen Y., Wu P., Chen B. Update on new medicinal applications of gentamicin: Evidence-based review. *Journal of the Formosan Medical Association*. 2014, 113(2): 72–82. doi:10.1016/j.jfma.2013.10.002

22. ГЕНТАМІЦИН [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://mozdocs.kiev.ua/likiview.php?id=3374>.
23. Гентаміцину сульфат-Дарниця розчин для ін'єкцій 40 мг/мл ампула 2 мл, №10. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://compendium.com.ua/dec/271247/13568/>.
24. ІНФЕКЦІЙНА ЗАХВОРЮВАНІСТЬ НАСЕЛЕННЯ УКРАЇНИ. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://phc.org.ua/kontrol-zakhvoryuvan/inshi-infekciyni-zakhvoryuvannya/infekciyna-zakhvoryuvanist-naselennya-ukraini>.
25. Study: High Rate of Skin Diseases in Europe. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.dermatologytimes.com/view/high-rate-of-skin-diseases-in-europe>.
26. Держстат розрахував портрет середньостатистичного українця [Електрон-ний ресурс] – режим доступу: https://lb.ua/society/2021/08/10/491375_derzhstat_rozrahuvav_portret.html.
27. Державний реєстр лікарських засобів України [Електронний ресурс] – режим доступу: <http://www.drlz.com.ua/ibp/ddsite.nsf/all/shlist?opendocument&sklad=%C3%E5%ED%F2%E0%EC%B3%F6%E8%ED>.
28. Shaza Y. A. Qattan, Khattab A. A. Gentamicin production by cultural optimization system and genetically improved mutants of *Micromonospora echinospora*. *Pharmacophore*. 2020, 11 (1): 15 – 26.
29. https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?mil00010
30. https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?sfb00524
31. *Micromonospora echinospora* subsp. *echinospora*. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://bacdive.dsmz.de/strain/7972>.
32. Customized process-scale bioreactors / fermentors - I Series. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.lpp-group.com/products/reactors/bioreactors-fermentors/pilot-plant/customized-process>.
33. *Micromonospora echinospora* subsp. *echinospora*. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://bacdive.dsmz.de/strain/7972>.

34. Пирог Т.П., Ігнатова О. А. Загальна біотехнологія: підручник / К. :НУХТ, 2009. – 336 с.

35. Головей О. П. , Гуляєв В. М. Конспект лекцій з дисципліни «Асептика біотехнологічних виробництв» освітньопрофесійної програми другого (магістерського) рівня вищої освіти зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» усіх форм навчання / Укл.: Головей О. П., Гуляєв В. М. – Кам'янське, ДДТУ, 2017 р., 140 с.

36. Інтернет джерело: Державний реєстр дезінфекційних засобів 2023 р [Режим доступу:]<https://moz.gov.ua/uploads/ckeditor/%D0%94%D0%B5%D1%80%D0%B6%D1%80%D0%B5%D1%94%D1%81%D1%82%D1%80%20%D0%B4%D0%B5%D0%B7%D0%B7%D0%B0%D1%81%D0%BE%D0%B1%D1%96%D0%B2/10-11-2023/%D0%A0%D0%B5%D1%94%D1%81%D1%82%D1%80%20%D0%B4%D0%B5%D0%B7%D0%B7%D0%B0%D1%81%D0%BE%D0%B1%D1%96%D0%B2%20908.xlsx>

37. Інтернет джерело: КлінДез 401, засіб мийний з дезінфікувальним ефектом, 5 л [Режим доступу:] <https://cleanstore.com.ua/ua/p1141733312-klindez-401-sredstvo.html#:~:text=%D0%9A%D0%BB%D0%B8%D0%BD%D0%94%D0%B5%D0%B7%20401%2C%20%D1%81%D1%80%D0%B5%D0%B4%D1%81%D1%82%D0%B2%D0%BE%20%D0%BC%D0%BE%D1%8E%D1%89%D0%B5%D0%B5%20%D1%81%20%D0%B4%D0%B5%D0%B7%D0%B8%D0%BD%D1%84%D0%B8%D1%86%D0%B8%D1%80%D1%83%D1%8E%D1%89%D0%B8%D0%BC%20%D1%8D%D1%84%D1%84%D0%B5%D0%BA%D1%82%D0%BE%D0%BC%2C%205%D0%BB,-%D0%92%20%D0%BD%D0%B0%D0%BB%D0%B8%D1%87%D0%B8%D0%B8&text=%D0%A1%D1%80%D0%B5%D0%B4%D1%81%D1%82%D0%B2%D0%BE%20%D0%BC%D0%BE%D1%8E%D1%89%D0%B5%D0%B5%20%D1%81%20%D0%B4%D0%B5%D0%B7%D0%B8%D0%BD%D1%84%D0%B8%D1%86%D0%B8%D1>

[%80%D1%83%D1%8E%D1%89%D0%B8%D0%BC%20%D1%8D%D1%84%D1%84%D0%B5%D0%BA%D1%82%D0%BE%D0%BC,%25%20%2D%209%2C0%25](#)

38. Інтернет джерело: Дезінфікуючий засіб Дезаква Аноліт 1 л Режим доступу: <https://apg-pharm.com/uk/products/dezinficirujuszee-sredstvo-dezak>

39. Інтернет джерело: Huwa-San TR 50 Agro (Хува-Сан) 12кг (10л.) Режим доступу: [https://mirsemyan.com.ua/ru/pers_shop/sredstvazashitirasteniyszr/332598.htm#:~:text=Huwa%2DSan%20%E2%80%94%D0%B4%D0%B5%D0%B7%D0%B8%D0%BD%D1%84%D0%B8%D1%86%D0%B8%D1%80%D1%83%D1%8E%D1%89%D0%B5%D0%B5%20%D1%81%D1%80%D0%B5%D0%B4%D1%81%D1%82%D0%B2%D0%BE%20%D0%BD%D0%B0,\)%20%D0%B8%20%D0%BA%D0%B8%D1%81%D0%BB%D0%BE%D1%80%D0%BE%D0%B4%20\(O2\).](https://mirsemyan.com.ua/ru/pers_shop/sredstvazashitirasteniyszr/332598.htm#:~:text=Huwa%2DSan%20%E2%80%94%D0%B4%D0%B5%D0%B7%D0%B8%D0%BD%D1%84%D0%B8%D1%86%D0%B8%D1%80%D1%83%D1%8E%D1%89%D0%B5%D0%B5%20%D1%81%D1%80%D0%B5%D0%B4%D1%81%D1%82%D0%B2%D0%BE%20%D0%BD%D0%B0,)%20%D0%B8%20%D0%BA%D0%B8%D1%81%D0%BB%D0%BE%D1%80%D0%BE%D0%B4%20(O2).)

40. Shaza Y. A. Qattan, Khattab A. A. Gentamicin production by cultural optimization system and genetically improved mutants of Micromonospora echinospora. Pharmacophore. 2020, 11 (1): 15 – 26.

41. Повітрозбірник вертикальний В-6,3-0,8 (8,0). [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://kyiv.prom.ua/ua/p925733958-vozduhosbornik-vertikalnyj.html?&primelead=M14xNQ>.

42. Фільтри стисненого повітря af німеччина, фільтр магістральний компресо-ра. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://k-m-s.all.biz/uk/filtry-stysnenogo-povitrya-af-nimechchyna-filtr-g15274387?utm_currency=UAH&utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=shopping_ua_personal&utm_content=123279&gclid=CjwKCAiAmsurBhBvEiwA6e-WPF26bKlZniKanFSprdUsRrsNjvovuh7eWhG48ffV6TgnQXi3PCej6gx0CzvYQAvD_BwE.

43. Гвинтовий компресор Лідер ВК 350PS 8 бар. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://tusk.ua/ua/product/vintovoj-kompresor-lider-vk>

350ps/?utm_source=cpc_tusk&gad_source=1&gclid=CjwKCAiAmsurBhBvEi wA6e-WPLZCrlYzSiNHgheiJNXRarx-ana4Yp7G5Th34uUMeSMqjC9xnQl9LBoCeisQAvD_BwE.

44. Кожухотрубні охолоджувачі. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://opeks.ua/ua/kozhuxotrubni-oxolodzhuвачи/?utm_source=google&utm_content=&utm_term=&utm_medium=cpc&utm_campaign=SPM_1&gclid=CjwKCAiAmsurBhBvEiwA6e-WPDyPIEV19UBQ3eQ_DAsZ_q0Z0Q8DOQnAsIgMZUftEK7NojkiN0Yc7BoCrK4QAvD_BwE.

45. Ресивер для стисненого повітря від 100 до 20000л. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://kyiv.prom.ua/ua/p1354114839-resiver-dlya-szhatogo.html?&primelead=Mt42ODc1>.

46. Фільтр високого тиску TP QFRH-15. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://tusk.ua/ua/product/filtr-vyisokogo-davleniya-tpqfrh-15/?utm_source=cpc_tusk&gad_source=1&gclid=CjwKCAiAmsurBhBvEiwA6e-WPAt1dw3RUHtYzOglnpnCUEJ7_dDhBXDxVRKd-sKY_y64Y8s98RcCDxoCsUQAvD_BwE.

47. Дозатор для сипучих продуктів NPF-200-201 Hualian. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://cicada.in.ua/dozator-dlya-sipuchih-produktiv-npf-200-201-hualian#_ga=2.169538529.1779019606.1702409084-2022342521.1697911497&_gac=1.219324907.1702409084.CjwKCAiApuCrBhAuEiwA8VJ6JoqakntrZO40MWH6BzWKyEHQ5XSHGiegaZxZ7IApcDIQB8POeXpRHRoCF1wQAvD_BwE.

48. Reactor 10L. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://bm-chemistry.com.pl/product/reactor-10l/>.

49. 25L Jacketed Bioreactor System. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://bellcoglass.com/product/25l-jacketed-bioreactor-system/>.

50. Ваговий дозатор ФС-75. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://prom.ua/ua/p1258432678-vesovoj-dozator.html?&primelead=My42>.
51. 100L Jacketed Glass Reactor. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.laboao.com/products/jacketed-glass-reactor/100l-jacketed-glass-reactor>.
52. Апарати сталіні емальовані з механічним змішуючим пристроєм. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://euromash.kiev.ua/ua/aparati_email_mehanicheskim_perem_ustroystvom_ua.php.
53. Насос поверхневий Speroni CAM INOX 80-HL. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://teploradost.com.ua/nasos-poverhnostnyj-speroni-cam-inox-80hl>.
54. HyPerforma 2:1 250 L Single-Use Bioreactor. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/hyperforma-2-1-250l-single-use-bioreactor-data-sheet.pdf>.
55. Ваговий дозатор ФС-1000. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://prom.ua/ua/p1252631920-vesovoj-dozator-1000.html?&primelead=Ny4y>.
56. Поверхневий відцентровий насос PEDROLLO 5CRm 100. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://hotline.ua/ua/dacha_sad-nasosy-vodosnabzheniya/pedrollo-5crm-100/?tab=about.
57. Промисловий відцентровий насос TAPFLO CTI AA купити за вигідною ціною з доставкою по Україні. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://tapflo.ua/products/centrifugal/centrifugal-industrial-pumps/cti-cth-pumps/cti-aa>.
58. Electric stirrer jacket chemical mixed 5l 20l 25l 30l 50l 10l 100l 200l lab glass reactor. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://www.alibaba.com/product-detail/Electric-stirrer-jacket-chemical-mixed-5l_1600471888876.html.
59. Pfaudler DIN BE Reactors. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.gmmpfaudler.com/uploads/files/pfaudler-din-be-reactors-1.pdf>.

60. Поверхневий насос Kaplya 10-10-0,75 "NPO". [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://xem.ua/poverkhnevyi-nasos-kaplya-10-10-075-npo/>.
61. Красінько В.О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобув. освіт. ступ. «бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» освіт.-проф. програми «Біотехнологія» ден. і заоч. форм навч. / В.О. Красінько. – К.: НУХТ, 2019. – 252 с.
62. *Micromonospora echinospora*. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://bacdiv.dsmz.de/strain/7972#ref11289>.
63. Пирог Т. П., Ключка Л. В. Загальна мікробіологія і вірусологія: [Електронний ресурс] лабораторний практикум для здобувачів освітнього ступеня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» освітньо-професійної програми «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна» денної форми навчання. / уклад. Т.П. Пирог, Л.В. Ключка. – К.: НУХТ, 2021. – 100 с.
64. 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. doi: 10.1038/ja.2015.57.
65. Yuan Y., Xu Q.-M., Yu S.-C., Sun H.-Z. Control of the polymyxin analog ratio by domain swapping in the nonribosomal peptide synthetase of *Paenibacillus polymyxa*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2020. doi: 10.1007/s10295-020-02275-7.
66. Steiner F., Paul C., Dong M. HPLC autosamplers: Perspectives, principles, and practices. *LCGC North America*. 2019, 37 (8): 514 - 529.
67. 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). doi: 10.1186/s12934-015-0402-6.

68. Zhang Y., Tan C., Fei R., Liu X., Zhou Y., Chen J., Hu Y. Sensitive Chemiluminescence Immunoassay for *E. coli* O157:H7 Detection with Signal Dual-Amplification Using Glucose Oxidase and Laccase. *Analytical Chemistry*. 2014, 86 (2): 1115–1122. doi: 10.1021/ac4028774.
69. Пирог Т.П., Антонюк М.М., Ігнатенко С.В. Лабораторний практикум для студ. напряму підготовки 6.051401 "Біотехнологія" ден. форми навч. — Київ : НУХТ, 2010. — 127 с.
70. Garriga M., Almaraz M., Marchiaro A. Determination of reducing sugars in extracts of *Undaria pinnatifida* (harvey) algae by UV-visible spectrophotometry (DNS method). *Actas de Ingenieria*. 2017, 3: 173-179.
71. Методи визначення кількості білка. [Електронний ресурс] – режим доступу:
<https://ir.nmu.org.ua/bitstream/handle/123456789/1855/milk%20sugar.pdf?sequence=1&isAllowed=y#:~:text=%D0>.
72. Визначення Нітрогену аміних груп методом формольного титрування. [Електронний ресурс] – режим доступу:
<https://stemua.science/%D0%9C%D0%B5%D1%82%D0%BE%D0%B4%D0%B8%D0%BA%D0%B8/2807-2/>.
73. Shaza Y. A. Qattan, Khattab A. A. Gentamicin production by cultural optimization system and genetically improved mutants of *Micromonospora echinospora*. *Pharmacophore*. 2020, 11 (1): 15 – 26.
74. Конспект лекцій з дисципліни „Технології біофармацевтичних препаратів” для здобувачів вищої освіти за освітньо-професійною програмою «Біотехнології та біоінженерія» першого (бакалаврського) рівня спеціальності: 162 «Біотехнології та біоінженерія» / Укл.: професор, д.т.н. Гуляєв В.М., старший викладач Філімоненко О.Ю. – Кам'янське, ДДТУ, 2019. – 156 с.

75. Preparation method of high-purity gentamycin: CN103012515B China : CN 102617666 A; заявл. 01.08.2012 ; опубл. 21.01.2015. 7 с.
76. Мельничук М.Д. Загальна (промислова) біотехнологія: навчальний посібник/ М.Д. Мельничук, О.Л.Кляченко, В.В.Бородай, Ю.В.Коломієць. – Київ: ФОП Корзун Д.Ю., 2014. - 252 с.
77. Георгіянц В.А. (2013). Фармацевтична хімія. Аналіз препаратів біотехнологічного виробництва. Навчальний посібник для студентів вищих навчальних закладів III-IV рівня акредитації. Харків: 215 с.
78. Кравченко О. О., Савчук О. М., Остапченко Л. І. Загальна біотехнологія : навчальний посібник / О. О. Кравченко, О. М. Савчук, Л. І. Остапченко. – К. : ВПЦ "Київський університет", 2019. – 269 с.
79. Карлаш Ю.В., Красінко В.О. Основи проєктування біотехнологічних виробництв Електронний ресурс: Навч. посібник. –К.:НУХТ, 2022. –373 с.
80. Perlite Filter Aids Explained [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.perlite.org/perlite-filter-aids-explained/#:~:text=Perlite%20has%2030%2D50%25%20less,better%20permeability%20and%20filtration%20fluxes%2C>.
81. Основні закономірності адсорбції [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://chemeducation.pnu.edu.ua/wp-content/uploads/sites/14/2020/02/%D0%9B%D0%B5%D0%BA%D1%86%D1%96%D1%8F_4_%D0%90%D0%B4%D1%81%D0%BE%D1%80%D0%B1%D1%86%D1%96%D1%8F.pdf
82. De-q, J. (2013). Study on adsorption and separation of gentamicin by macroporous weakly acidic ion exchange resin. *Science and Technology of Food Industry*. 23, 233-236.

83. Process for precipitating aminoglycosides: US4256876A United States: C07H 1/06, 536/12; 536/9; 536/10, 536/17 A; 536/17 R, 536/10, 12, 17 R, 9, 536/17 A; № 118,408; заявл. 04.02.1980 ; опубл. 17.03.1981. 3 с.

84. Лекція:6. Розділення неоднорідних систем. Відстоювання. Фільтрування. Центрифугування. Відстійники. Будова, порівняння і вибір фільтрів і центрифуг. Перемішування в рідких середовищах. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://kc.pnu.edu.ua/wp-content/uploads/sites/11/2021/02/Processes-and-apparatus-of-chemical-productionLecture6.pdf>

85. Буценко Л.М., Пенчук Ю.М., Пирог Т.П. Технології мікробного синтезу лікарських засобів: Навч. посіб. — К.: НУХТ, 2010. — 323 с.

86. Конспект лекцій з дисципліни «Сучасні технології сушіння та випалювання матеріалів» для здобувачів вищої освіти другого (магістерського) рівня зі спеціальності 144 Теплоенергетика / Укл. доцент Долгополов І.С. - Кам'янське, ДДТУ, 2018. - 75с.

87. Промислова технологія лікарських засобів. Навчальний посібник для самостійної роботи студентів: опрацьоване та доповнене. / Сост. О.А. Рубан, В.Д. Рибачук, Л. М. Хохлова, Ю. С. Маслій та ін. – Х.: НФаУ, 2015. - 120 с.

88. Тertiшний О.О., Опарін С.О., Рябік П.В. Механічні процеси в хімічній технології. – Дніпропетровськ: ДВНЗ УДХТУ, 2015. – 215 с.

89. Barka E. A. и др. Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2016. Т. 80. № 1. С. 1–43.

90. GmbH S. D. Micromonospora echinospora [Электронный ресурс]. URL: <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/DSM-43816>.

91. Himabindu M., Potumarthi R., Jetty A. Enhancement of gentamicin production by mutagenesis and non-

nutritional stress conditions in *Micromonospora echinospora* // *Process Biochem.* 2007. Т. 42. № 9. С. 1352–1356.

92. Chang Y. и др. Overproduction of gentamicin in industrial strain *Micromonospora echinospora* CCTCC M by cloning of the missing genes *genR* and *genS* // *Metab. Eng. Commun.* 2019. Т. 9.

93. Wei Z. и др. Exclusive Production of Gentamicin C1a from *Micromonospora purpurea* by Metabolic Engineering. // *Antibiot. (Basel, Switzerland)*. 2019. Т. 8. № 4. С. 57–71

94. Чуєшов В. І., Гладух Є.В. Технологія ліків промислового виробництва. Том 2: підручник для фарм. ф-тів ВМНЗ IV р.а. – Вінниця: Нова Книга, 2014 – 664 с.