

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

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

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

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і
мікробіології

Віктор СТАБНІКОВ

“ 01 ” березня 2023 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

АФЛАТАРЛИ Владислави Олексіївни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи «Біосинтез окситетрацикліну *Streptomyces rimosus*»

керівник роботи ВОРОНЦОВ Олександр Олександрович, доц., к. т. н.
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від 28 березня 2023 року № 193-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 05.06.2023

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Streptomyces rimosus*, цільовий
продукт: окситетрациклін, об'єм ферментера 2,5 м³, коефіцієнт заповнення:
0,6

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) РО-
ЗДІЛ 1. Характеристика окситетрацикліну, РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору
та характеристика біологічного агента, РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрун-
тування, РОЗДІЛ 4. Біосинтез окситетрацикліну, РОЗДІЛ 5. Обґрунтування
вибору технологічної схеми, РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання дофермен-
таційних процесів та виробничого біосинтезу окситетрацикліну, РОЗДІЛ 7.
Опис технологічної схеми виробництва окситетрацикліну, РОЗДІЛ 8. Конт-
роль виробництва окситетрацикліну, РОЗДІЛ 9. Аналіз перспектив впрова-
дження системи екологізації виробництва, РОЗДІЛ 10. Аналіз нормативно-
технічної документації та науковотехнічної літератури

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема виробництва окситетрацикліну – 1 аркуш формату А1 і 1
аркуш формату А2. Апаратурна схема виробництва окситетрацикліну – 1 ар-
куш формату А1.

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання ви- дав	завдання прийняв

7. Дата видачі завдання 01 березня 2023 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Характеристика окситетрацикліну	01.03.2023 – 08.03.2023	
2	Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	09.03.2023 – 13.03.2023	
3	Техніко-економічне обґрунтування	14.03.2023 – 20.03.2023	
4	Біосинтез окситетрацикліну	21.03.2023 – 30.03.2023	
5	Обґрунтування вибору технологічної схеми	01.04.2023 – 08.04.2023	
6	Специфікація обладнання доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу окситетрацикліну	09.04.2023 – 13.04.2023	
7	Опис технологічної схеми виробництва окситетрацикліну	14.04.2023 – 19.04.2023	
8	Контроль виробництва окситетрацикліну	20.04.2023 – 29.04.2023	
9	Аналіз перспектив впровадження системи екологізації виробництва	30.04.2023 – 07.05.2023	
10	Аналіз нормативно-технічної документації та науковотехнічної літератури	08.05.2023 – 15.05.2023	
11	Оформлення пояснювальної записки	16.05.2023 – 20.05.2023	
12	Виконання графічної частини проекту	21.05.2023 – 27.05.2023	

Здобувач

_____ (підпис)

Владслава АФЛАТАРЛИ

_____ (ім'я та прізвище)

Керівник роботи

_____ (підпис)

Олександр ВОРОНЦОВ

_____ (ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена розробці технологічної та апаратурної схем біосинтезу тетрациклінового антибіотику окситетрацикліну *Streptomyces rimosus* sub sp. *rimosus* DSMZ 41439, який за умов росту на поживному середовищі, складовою якого є глюкоза, здатен синтезувати 1412 мг/л даного антибіотику.

Технологічна схема біосинтезу окситетрацикліну включає допоміжні роботи (підготовка повітря, приготування титрувальних розчинів соляної кислоти та натрію гідроксиду, підготовка і стерилізація поживних середовищ) та технологічний процес (три стадії вирощування посівного матеріалу (у колбах на качалках, в інокуляторах об'ємом 30 і 250 л) та біосинтез у ферментері об'ємом 2,5 м³ із коефіцієнтом заповнення 0,6).

Кваліфікаційна складається зі вступу, десяти розділів, списку використаної літератури (72 найменувань), технологічної (формат А1, 1 аркуш, формат А2 1 аркуш) та апаратурної (формат А1, 1 аркуш) схем. Загальний обсяг роботи – 96 сторінок, 18 таблиць, 10 рисунків та 4 додатків.

Ключові слова: окситетрациклін, *Streptomyces rimosus* DSMZ 41439, біосинтез, глюкоза, підживлювальний розчин, технологічна схема, апаратурна схема.

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	4
ВСТУП	7
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ОКСИТЕТРАЦИКЛІНУ	9
РОЗДІЛ 2. БІОЛОГІЧНИЙ АГЕНТ. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ЙОГО ХАРАКТЕРИСТИКА	12
2.1. Вибір найпродуктивнішого біологічного агента. Обґрунтування оптимального складу середовища з метою його культивування	12
2.2. Поживне середовище. Перевірочний розрахунок його складу	17
2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки <i>S.</i> <i>rimosus</i> DSMZ 41439	19
2.4. <i>S. rimosus</i> DSMZ 41439 та його таксономічний статус	20
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ	22
3.1. Потреба в окситетрацикліні у ветеринарному секторі України	22
3.2. потужність проєктованого виробництва окситетрацикліну	24
РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ОКСИТЕТРАЦИКЛІНУ	30
4.1. Шляхи катаболізму глюкози у <i>S. rimosus</i> sub sp. <i>rimosus</i> DSMZ 41439	30
4.2. Біотрансформація глюкози в окситетрациклін	32
РОЗДІЛ 5. ВИБІР ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ТА ЇЇ ОБҐРУНТУВАННЯ	35
5.1. Тип ферментера та обґрунтування способу культивування актиноміцетів у ньому	35
5.2. Підготовка повітря. Основні етапи	37
5.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів	38
5.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища	43
5.4.1. Вирощування інокуляту в колбах на качалках	44

5.4.2. Вирощування інокуляту в посівних апаратах.....	45
5.4.3. Виробничий біосинтез у ферментаторі об'ємом 2,5 м ³	48
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДОФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ТА ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ ОКСИТЕТРАЦИКЛІНУ	50
РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА ОКСИТЕТРАЦИКЛІНУ	54
РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА ОКСИТЕТРАЦИКЛІНУ	64
8.1. Мікробіологічний контроль.....	64
8.2. Показники росту і синтезу цільового продукту	66
8.2.1. Концентрація біомаси.....	66
8.2.2. Активність окситетрацикліну.....	66
8.2.3. Визначення концентрації окситетрацикліну.....	69
8.2.4. Концентрація джерела Карбону і Нітрогену.....	69
РОЗДІЛ 9. АНАЛІЗ ПЕРСПЕКТИВ ВПРОВАДЖЕННЯ СИСТЕМИ ЕКОЛОГІЗАЦІЇ ВИРОБНИЦТВА.....	74
9.1. Характеристика рідких відходів виробництва окситетрацикліна.....	74
9.1.1. Розрахунок об'ємів відходів.....	74
9.1.2. Утилізація рідких відходів.....	75
9.2. Характеристика газоподібних відходів виробництва антибіотику.....	75
9.2.1. Розрахунок об'ємів відходів.....	75
9.2.2. Утилізація газоподібних відходів	76
9.3. Характеристика твердих відходів виробництва	77
9.3.1. Розрахунок об'ємів відходів.....	77
9.3.2. Утилізація твердих відходів	78
РОЗДІЛ 10. АНАЛІЗ НОРМАТИВНО-ТЕХНІЧНОЇ ДОКУМЕНТАЦІЇ ТА НАУКОВОТЕХНІЧНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	79
Список використаної літератури.....	81

ВСТУП

Більшість розроблених антибіотиків зобов'язані своїм існуванням мікробам. Антибіотики, ймовірно, були частиною мікробного світу протягом мільйонів років. Резистентність до антибіотиків є серйозною проблемою в медицині, оскільки вона знижує ефективність лікування і може призводити до ускладнень та набуття хронічних інфекцій. Для подолання резистентності до антибіотиків важливо вживати раціональний підхід до використання антибіотиків, здійснювати контроль за їх використанням і сприяти розвитку нових антибіотиків та альтернативних методів лікування інфекцій [1].

Тетрацикліни, які були відкриті в 1940-х роках, являють собою сімейство антибіотиків, які пригнічують синтез білка, запобігаючи приєднання аміноацил-тРНК до рибосомного акцепторного (А) сайту. Тетрацикліни є агентами широкого спектру дії, які проявляють активність проти широкого спектру грампозитивних і грамнегативних бактерій, атипових мікроорганізмів, таких як хламідії, мікоплазми і рикетсії, і найпростіших паразитів. Сприятливі протимікробні властивості цих засобів і відсутність серйозних побічних ефектів зумовили їх широке застосування в терапії захворювань людей і тварин [1].

Окситетрациклін – антибіотик, що належить до сімейства тетрациклінів. *Streptomyces rimosus* є відомим промисловим виробником окситетрацикліну і спочатку був виділений з ґрунту. Дійсно, більшість відомих мікробних продуцентів різних тетрациклінів є бактеріями.

Актуальність теми. Технологія отримання окситетрацикліну із використанням *Streptomyces rimosus* є достатньо вивченою, продуцент здаєн до росту на відносно недорогих поживних середовищах та утворювати при цьому високі концентрації антибіотику. В Україні окситетрациклін використовують у ветеринарній медицині.

					НУХТ БТЕК 04.03.36 КР ПЗ			
Зм	Арк.	№ докв-	Під-	Ла				
Розроб-	Афлатарпи				ВСТУП	Літе-	Ар-	Арквшів
Керівник	Ворониов						7	96
Н. контр					Кафедра БТМ			
Кон-								
Зав.	Стабніков							

Лікування великої рогатої худоби, овець, кіз, свиней, собак та котів при захворюваннях травного каналу, органів дихання, сечостатевої системи, шкіри, що спричинені мікроорганізмами, чутливими до окситетрацикліну. На сьогодні, найуживанішою маркою виготовлення окситетрацикліну є «Invesa International, Іспанія» [2].

Мастит – одна з найважливіших проблем молочного скотарства багатьох країн світу. Збитки від маститу складаються більше, ніж з 12 категорій, серед яких провідне місце займають зниження продуктивності та погіршення технологічних якостей молока, підвищення витрат на діагностику та лікування. Вихід із проблеми – впровадження виробництва антибіотику, зокрема окситетрацикліну. За даними досліджень, ринок ветеринарних препаратів в Україні становить близько 1 млрд доларів США на рік, а окситетрациклін є одним з найбільш продаваних антибіотиків у цьому сегменті. Однак ціна на окситетрациклін може стати визначним фактором для споживачів, виробників кормів та ветеринарних препаратів, оскільки впливає на ряд етапів, таких як постачання, конкуренція та регулювання цін [3].

Новизна роботи – використання актиноміцетного штаму *S. rimosus* sub sp. *rimosus* DSMZ 41439, який при рості на середовищі обраного складу синтезує найбільшу кількість окситетрацикліну (1412 мг/л) [3].

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ОКСИТЕТРАЦИКЛІНУ

Основним продуктом біосинтезу *Streptomyces rimosus* є окситетрациклін.

Окситетрациклін – це тетрациклін, який використовується для лікування інфекцій, спричинених різними грампозитивними та грамнегативними мікроорганізмами. За органолептичними показниками від блідо-жовтого до коричневого кольору кристалічний порошок. Він виконує роль антибактеріального препарату, інгібітора синтезу білка, протимікробного засобу, проти-запального препарату та бактеріального метаболіту [5].

Хімічні властивості. Формула антибіотику - $C_{22}H_{24}N_2O_9$, структура молекули окситетрацикліну наведена на *рис. 1.1*.

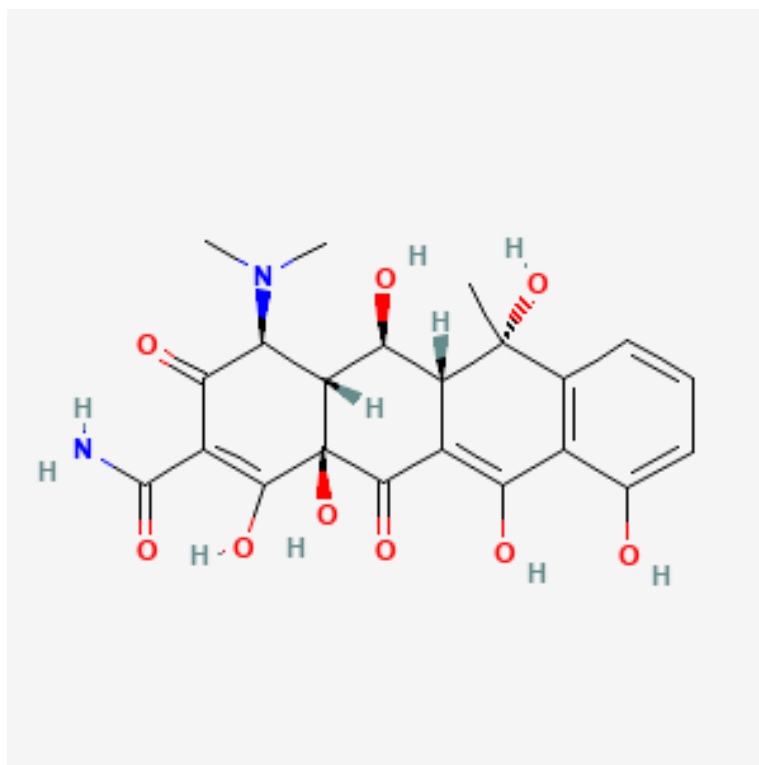


Рис. 1.1. Зображення хімічної структури окситетрацикліну [5].

					НУХТ БТЕК 04.03.36 КР ПЗ		
Зм	Арк.	№ докв-	Під-	Ла			
Розроб-	Афлатарпи				Літе-	Ар-	Арквшів
Керівник	Ворониов					9	99
Н. контр					Кафедра БТМ		
Кон-							
Зав.	Стабніков						

Середня молекулярна маса окситетрацикліну дорівнює $460,4\text{г/моль}^{-1}$. Температура плавлення дорівнює $184,5^{\circ}\text{C}$, розчинність у воді - 313 мг/л (при 25°C), легко розчинний в алкоголі при 25°C . Щільність - $1,634$ при 20°C [6].

Сфери застосування. Антибіотик використовується у ветеринарній медицині та медицині, для лікування симптомів широкого спектру бактеріальних інфекції [6].

Фармакокінетика. Швидко абсорбується після ін'єкції, і терапевтичні концентрації в крові і тканинах зберігаються від трьох до п'яти днів. Він легко проникає в більшість тканин організму, досягаючи високих концентрацій у печінці, жовчі, сечі, кістках і легких, а також дифундує через плаценту в кровотік плоду. У печінки концентрується і метаболізується окситетрациклін, який виводиться з жовчю і фекаліями, а також із сечею, де він залишається у своїй біологічно активній формі [8].

Синтез окситетрацикліну. Хімічний синтез антибіотика є непридатним для промислового отримання, оскільки є багатоетапним (14-18). Крім того, потребує великої кількості хімічних реактивів і є важким у виконанні. Біотехнологічний синтез окситетрацикліну позбавлений наведених вище недоліків та дає змогу отримати стабільний антибіотик та є легким для реалізації у промислових умовах [9].

Виробники антибіотику. На даний момент представлено лише закордонні виробники окситетрацикліну, такі як : компанія «Anglorak» Англія, препарат *Aglocycline*; компанія «Corsa Industries» Індонезія, препарат *Corsamycin*; компанія «Adcock Ingram Pharmaceuticals» Південна Африка, препарат *Oxuran*; компанія «Pfizer» США, препарат *Terrados*. Всі ці препарати є аналогом окситетрацикліну, виділеного з *streptomyces rimosus*; [10]

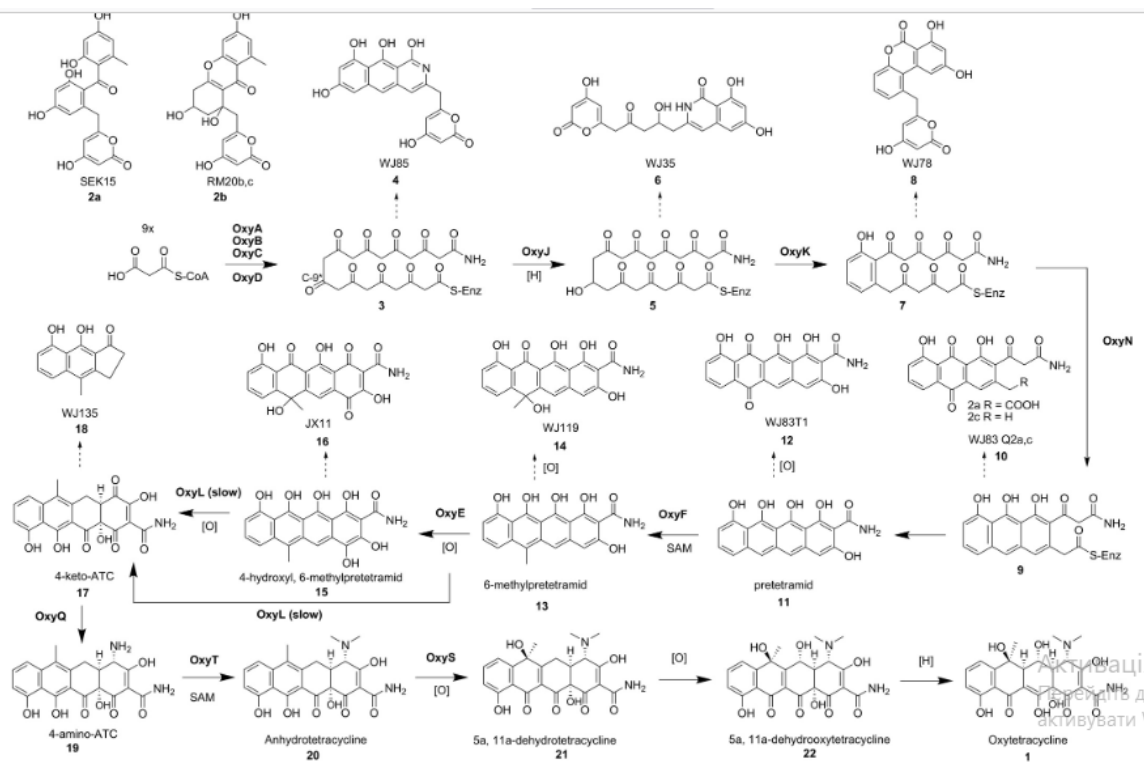


Рис.1.2. Біосинтез окситетрацикліну [5].

РОЗДІЛ 2. БІОЛОГІЧНИЙ АГЕНТ. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ЙОГО ХАРАКТЕРИСТИКА

2.1. Вибір найпродуктивнішого біологічного агента. Обґрунтування оптимального складу середовища з метою його культивування

Окситетрациклін був відкритий у 1950 році А.С. Фінлеєм який разом із Pfizer виділив цей антибіотик із *Streptomyces rimosus* (перша назва антибіотику–Тетраміцин) [11].

На сьогодні відомий лише один продуцент для синтезу окситетрацикліну - *Streptomyces rimosus*. Даний біологічний агент є найбільш охарактеризованим промисловим стрептоміцетом, як продуцент окситетрацикліну та інших тетрациклінових антибіотиків [7].

Синтезувати даний антибіотик також можливо культивування *S. rimosus* спільно із *Streptomyces noursei* [10]. Дані дослідження показали, що ця комбінація є ефективною з точки зору виробництва окситетрацикліну, при цьому один із штамів-учасниць зміг домінувати над своїм партнером з самого початку культивування. Свої домінантні властивості зумів показати *S. rimosus*. Але цей штам не зміг домінувати в спільній культурі, якщо він був введений у вигляді спор до вже розвиненої біомаси *S. noursei*. Результати показали, що навіть надання переваги 24-годинному росту *S. noursei* не можна рекомендувати при культивуванні, що орієнтоване на отримання окситетрацикліну.

Іншими науковцями було досліджено можливість використання *S. rimosus* DSMZ 41439 для отримання окситетрацикліну. Також встановлено оптимальну концентрацію глюкози для виробництва антибіотика, при використанні напівпромислового біореактора (15 л) з використанням різних можливостей введення підживлювальних розчинів [4].

					НУХТ БТЕК 04.03.36 КР ПЗ			
Зм	Арк	№ докв-	Під-	Ла	РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА	Ліме-	Ар-	Арквшів
Розроб-	Афпатарпи						12	99
Керівник	Ворониов					Кафедра БТМ		
Н. контр								
Кон-								
Зав.	Стабніков							

Також, були зроблені спроби підвищити продукцію ОТС після індукованого опромінення мутагенезу *S. rimosus* CN08 за допомогою променів Co(60)- γ [7]. Після скринінгу на середовищі, що містить канаміцин, було отримано 125 колоній, що продукують ОТС. Був відібраний один мутант під назвою *S. rimosus* γ -45, який синтезував найбільшу кількість антибіотика при твердофазному культивуванні.

Узагальнюючу характеристику технологічних особливостей одержання окситетрацикліну із використанням різних продуцентів наведено у табл. 2.1. Відповідно до опрацьованої інформації можна зробити висновок, що найбільш продуктивним культивуванням для синтезу окситетрацикліну є індуковане опромінення мутагенезу *S. rimosus* MKRABC 7490 мг/л.

Таблиця 2.1

Особливості одержання окситетрацикліну різними продуцентами

Продуцент	Склад поживного середовища, г/л	Концентрація окситетрацикліну, мг/л	Умови культивування	Література
<i>S.rimosus</i> ATCC 10970 + <i>S.noursei</i> ATCC 11455	Глюкоза- 20, дріжджовий екстракт- 5, (NH ₄) ₂ SO ₄ -3, KH ₂ PO ₄ -2, K ₂ HPO ₄ -1, MgSO ₄ 7H ₂ O - 0,5.	10,3	Тривалість культивування 48 год, швидкість перемішування 110 об/хв, при 28 °С та рН 7.	Boruta T., Ścigaczewska A. Enhanced Oxytetracycline Production by <i>Streptomyces rimosus</i> in Submerged Co-Cultures with <i>Streptomyces noursei</i> . <i>Molecules</i> . 2021, 26 (19): 6036. doi: 10.3390/molecules26196036.
<i>Streptomyces rimosus</i> DSMZ 41439	Глюкоза 31,0; дріжджовий екстракт 5,0; (NH ₄) ₂ SO ₄ 3,0; KH ₂ PO ₄ 2,0; K ₂ HPO ₄ 1,0; MgSO ₄ 7H ₂ O, 0,5	1412	Тривалість культивування 108 год, швидкість перемішування 400 об/хв, при 28°С та рН 7.	Elsayed E.A., Omar H.G., El-Enshasy H.A. Development of Fed-Batch Cultivation Strategy for Efficient Oxytetracycline Production by <i>Streptomyces rimosus</i> at Semi-Industrial Scale. <i>Agriculture, Agribusiness and Biotechnology Braz. arch. biol. technol.</i> 2015, 58 (5): https://doi.org/10.1590/S1516-89132015050184
<i>Streptomyces rimosus</i> γ-45	Пшеничні висівки – 40; Глюкоза – 10; (NH ₄) ₂ SO ₄ – 10.	298	Тривалість культивування 5 днів, при рН 6.0 та 30°С	Lazim H., Slama N., Mankai H., Barkallah I., Limam F. Enhancement of oxytetracycline production after gamma irradiation-induced mutagenesis of <i>Streptomyces rimosus</i> CN08 strain. <i>World J Microbiol Biotechnol</i> 2010, 26: 1317–1322. DOI 10.1007/s11274-009-0303-0.

Для розрахунку вартості поживних середовищ для культивування вибраних мікроорганізмів потрібно врахувати кількість та тип компонентів, необхідних для складання поживного середовища, а також їх вартість. Крім того, необхідно врахувати кількість та тривалість культивування мікроорганізмів для визначення загальної кількості поживних середовищ, що будуть використовуватись. (табл. 2.2).

Таблиця 2.2.

Поживне середовище для культивування продуцентів окситетрацикліну та вартість компонентів

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Концентрація у ПС, г/л	Вартість компонента, грн/кг	Ціна компонента (грн.) на 1 л середовища	Джерело інформації
<i>S.rimosus</i> ATCC 10970 + <i>S.noursei</i> ATCC 11455	Глюкоза	20	50	1	1
	Дріжджовий екстракт	5	1100	5,5	2
	(NH ₄) ₂ SO ₄	3	60	0,18	3
	K ₂ HPO ₄	1	150	0,15	4
	KH ₂ PO ₄	2	107	0,22	5
	MgSO ₄ *7H ₂ O	0,5	35	0,018	6
Вартість 1 л середовища 7,07 грн					
<i>S. rimosus</i> DSMZ 41439	Глюкоза	31	50	1,55	1
	дріжджовий екстракт	5	1100	5,5	2
	(NH ₄) ₂ SO ₄	3	60	0,18	3
	KH ₂ PO ₄	2	107	0,22	5
	K ₂ HPO ₄	1	150	0,15	4
	MgSO ₄ ,7H ₂ O	0,5		0,018	6
Вартість 1 л середовища 7,6 грн					
<i>S. rimosus</i> γ-45	Пшеничні висівки	40	6	0,24	7
	Глюкоза	10	50	0,5	1
	(NH ₄) ₂ SO ₄	10	60	0,6	3
	K ₃ PO ₄	4	75	0,3	8
	Вартість 1 л середовища 1,64 грн				

Примітка. * – Ціни наведено станом на квітень 2022 р.

1 – <https://prom.ua/ua/p22960204-glyukoza-dekstroza-pischevaya.html?&primelead=Mg>

2 - <https://prom.ua/ua/p1086437845-ekstrakt-drozhzhej.html>

3 - <https://prom.ua/ua/p1033366390-ammonij-sulfat-proizvoditel.html?&primelead=MS41>

4 - <https://prom.ua/ua/p260995616-kalij-fosfornokislyj-zameschennyj.html> ¶

5 - <https://prom.ua/ua/p94207740-kalij-fosfornokislyj-zameschennyj.html?&primelead=MQ>

6 - <https://prom.ua/ua/p1411961188-sulfat-magniya-mgso4.html>

7 - <https://agro-ukraine.com/ru/trade/m-1154688/prodam-pshenichnye-otrubki/>

8 - <https://prom.ua/ua/p1267047719-ortofosfat-kaliya.html>

Передивившись дані наведені у табл. 2.2, середовище для культивування *S. rimosus* γ -45 є найдешевшим. Проте тривалість культивування даного штаму є найбільшою, тому для того, щоб точно визначитись з біологічним агентом ми розраховуємо умовну вартість 1 мг окситетрацикліну – цільового продукту (табл. 2.3).

Таблиця 2.3.

Умовна вартість 1 мг окситетрацикліну

Біологічний агент	Концентрація антибіотику мг/л	Тривалість культивування, год	Кількість утвореного антибіотику за добу, мг/год	Вартість 1 л середовища, грн	Умовна вартість 1 мг антибіотику, грн/мг
<i>S. rimosus</i> ATCC 10970 + <i>S. noursei</i> ATCC 11455	10,3	48	0,214	7,07	0,686
<i>S. rimosus</i> DSMZ 41439	1412	108	13,07	7,6	0,0054
<i>S. rimosus</i> γ -45	298	120	2,48	1,64	0,0055

Проаналізувавши усю інформацію визначаємо, що найкращим біологічним агентом для отримання окситетрацикліну є *S. rimosus* DSMZ 41439, оскільки умовна вартість 1 мг антибіотику є найнижчою, а кількість утвореного антибіотику на добу (13,07 мг/год = 313,68 мг/добу) є найбільшою порівнюючи із двома іншими продуцентами.

2.2. Поживне середовище. Перевірочний розрахунок його складу

Тривалість культивування 108 год, концентрація окситетрацикліну в культуральній рідині становить 1,412 г/л, а концентрація біомаси – 8 г/л.

Вміст джерела вуглецевого живлення в середовищі. Розрахунок

Потреби для синтезу окситетрацикліну. Глюкозу використовуємо як джерело вуглецю. Рахуємо, скільки вуглецю (за елементом С) міститься в 1,412 г окситетрацикліну. Молекулярна маса окситетрацикліну $C_{22}H_{24}N_2O_9$ становить 460 [12]. Отже, у 460 г окситетрацикліну міститься 264 г карбону, а в 1,412 г окситетрацикліну $(264 \times 1,412) / 460 = 0,81$ г Карбону.

Потім рахуємо, у скількох грамах глюкози може бути 0,81 г карбону. Молекулярна маса глюкози ($C_6H_{12}O_6$) - 180. Тому, у 180 г глюкози міститься 72 г Карбону, а 0,81 г Карбону міститься у $(0,81 \times 180) / 72 = 2,025$ г глюкози.

Враховуючи, що при вирощуванні мікроорганізмів на вуглеводах (глюкозі) біля 40 % субстрату окиснюється до CO_2 , щоб одержати енергію, необхідну для конструктивного метаболізму, вміст глюкози в середовищі становитиме $(2,025 \times 0,4) + 2,025 = 2,835$ г/л

Потреби для синтезу біомаси. У біомасі навно 50 % карбону, тому карбону у 8 г біомаси є $8 \times 0,5 = 4$ г. Ця кількість карбону міститься у $(4 \times 180) / 72 = 10$ г глюкози.

Взявши до уваги 40% втрат субстрату на «холосте окислення», для одержання 8 г/л біомаси у середовище потрібно внести $(10 \times 0,4) + 10 = 14$ г/л глюкози. Отже, загальний вміст глюкози у середовищі, потрібний для синтезу біомаси (8 г/л) та окситетрацикліну (1,412 г/л), становить $14 + 2,835 = 16,835$ г/л.

У складі поживного середовища міститься 31 г\л глюкози, що вистачає для синтезу біомаси та антибіютика.

Розрахунок вмісту в середовищі джерела азотного живлення

Потреби для синтезу біомаси. Розглянемо, що у біомасі міститься 10 % нітрогену. Таким чином, у 8 г біомаси вміст азоту (за елементом N) - 0,8 г.

Продуцент може асимілювати як джерела азотного живлення мінеральний (амонійний) Нітроген (сульфат амонію $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) та органічний (дріжджовий екстракт).

Рахуємо скільки сульфату амонію необхідно, щоб одержати 8 г/л біомаси. Молекулярна маса $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ становить 132. Отже, у 132 г сульфату амонію є 28 г нітрогену (N), тоді 0,8 г Нітрогену буде міститись у $(0,8 \times 132) / 28 = 3,8$ г солі. Для одержання 8 г/л біомаси вміст $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ у середовищі культивування повинен становити 3,8 г/л.

Потреби для синтезу окситетрацикліну. Нітроген входить до складу не тільки біомаси, а й окситетрацикліну. Рахуємо скільки $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ є у середовищі необхідного для одержання 1,412 г/л антибіотику. Молекулярна маса окситетрацикліну становить 460. У 460 г окситетрацикліну міститься 28 г Нітрогену (N), тоді у 1,412 г окситетрацикліну вміст Нітрогену становить $(1,412 \times 28) / 460 = 0,09$ г. Далі рахуємо, скільки $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ містить ця кількість Нітрогену.

В 132 г сульфату амонію є 28 г нітрогену (N), тоді 0,09 г Нітрогену буде міститись у $(132 \times 0,09) / 28 = 0,42$ г солі. Для одержання 1,412 г/л окситетрацикліну вміст сульфату амонію в середовищі повинен становити 0,42 г/л.

Отже, загальний вміст сульфату амонію у середовищі, необхідний для синтезу біомаси (8 г/л) та окситетрацикліну (1,412 г/л), становить $3,8 + 0,42 = 4,22$. У складі поживного середовища вміст сульфату амонію становить 3 г/л, відповідно це $(3 \times 28) / 80 = 1,05$ г Нітрогену. Проте у складі також є дріжджовий екстракт, який теж містить азот у своєму складі. В складі дріжджового екстракту є 10 % азоту, тому у 5 г дріжджового екстракту міститься відповідно $5 \times 0,1 = 0,5$ г азоту. Таким чином загальний вміст азоту становитиме $1,05 + 0,5 = 1,55$ г Нітрогену. Загальна потреба у Нітрогені для синтезу 8 г/л біомаси та 1,412 г/л тетрацикліну становить $0,8 + 0,09 = 0,89$

Отже, джерело Нітрогену та Карбону забезпечує необхідну кількість для синтезу біомаси та окситетрацикліну обраним біологічним агентом.

2.3. Фізіолого-біохімічні ознаки та морфолого-культуральні *S. rimosus*

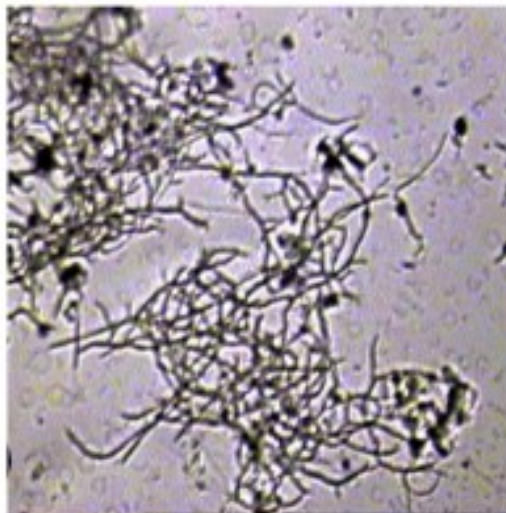
DSMZ 41439

Streptomyces rimosus – це актинобактерія, яка відноситься до сімейства *Streptomyces*. Цей мікроорганізм є грампозитивною бактерією. Стрептоміцети порівняно з іншими бактеріями мають атиповий життєвий цикл, що нагадує цикл грибів. Цикл починається спорою. Проростання цих спор починається в сприятливих умовах середовища, наприклад за оптимальної температури, наявності екзогенних поживних речовин, аеробні умови та відсутність інгібіторних ефектів від інших мікроорганізмів, з метою створення широкої розгалуженої мережі мультинуклеоїдних гіфів, відомих як субстратний (первинний) міцелій. Диференціація починається з формування спеціалізованих повітряних гіф (вторинний міцелій), які ростуть у повітрі з поверхні колонії. Пізніше ці повітряні гіфи проходять септацію в ненуклеодидних відділеннях і метаморфізуються в ланцюги спор (спорофори), які рідко фрагментують. Кількість спор в ланцюзі коливається від 3 до багатьох [13,14].

Streptomyces rimosus вирощують на середовищі Мурасіге-Скуга (MS medium), утворюючи споровий ланцюг у вигляді спірил, який переходить у білий повітряний міцелій [15]



Puc.2.1. Streptomyces rimosus [16]



Puc 2.2. Мікроскопічне спостереження. *Streptomyces rimosus* Y8 під світловим мікроскопом (1000X) [16]

Streptomyces rimosus є аеробною бактерією. Тип живлення хемоорганогетеротрофія. Для отримання енергії та як джерело вуглецю використовує органічні сполуки. При культивуванні необхідний кисень для дихання. Джерелом вуглецю для них може бути глюкоза, арабіноза, маноза, фруктоза і целюлоза.

Бактерію вирощують 7 днів при оптимальній для нього температурі 28°C (мезофіл). Оптимальне рН для даного мікроорганізму є 7,5(алкалофільний мікроорганізм). Оптимальна концентрація NaCl для виробництва антимікробної активності та біомаси виробництва становить 10 г/л.

Streptomyces rimosus здатний продукувати різні типи ферментів, наприклад лецитиназа, амілаза, ліпаза, пектиназа, каталаза. Також проводить деградацію ексуліну, відновлення нітрату ксантину та гіпоксантину. Після проведення оксидазного тесту було досліджено зростання культури в присутності хімічних інгібіторів 0,001% телурит калію, 7% NaCl, 1% фенол та 0,01% азиду натрію [16].

2.4. *S. rimosus* DSMZ 41439 та його таксономічний статус

Домен *Бактерії*

Тип *Актинобактерії*

Клас *Актинобактерії*

Порядок *Streptomycetales*

Родина *Streptomycetaceae*

Рід *Streptomyces*

Вид *Streptomyces rimosus* [17].

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

3.1. Потреба в окситетрацикліні у ветеринарному секторі України

Окситетрациклін – антибіотик широкого спектру дії, який є достатньо ефективним проти широкого кола грампозитивних і грамнегативних бактерій і може бути використаний для успішного лікування ряду різних бактеріальних інфекцій [18]. Механізм антимікробної дії тетрациклінів включає зв'язування з 16S рРНК в 30S рибосомальної субодиниці, яка інгібує приєднання аміноацил-тРНК до рибосомного комплексу мРНК і порушує синтез білка. На додаток до антибіотичної активності, тетрацикліни виявляють багато інших фармакологічних властивостей, наприклад, протизапальну, імуномодуючу, нейропротекторну, протиракову та антиметастатичну [19].

Окситетрациклін є активним проти різних мікроорганізмів, включаючи грампозитивні бактерії, такі як *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Actinomyces* spp., *Bacillus anthracis*, *Clostridium perfringens* та tetani, *Listeria monocytogenes* та *Nocardia*, а також грамнегативні бактерії, такі як *Brucella* spp., *Haemophilus* spp., *Bordetella* spp., *Bartonella* spp., *Pasteurella multocida*, *Shigella* spp., *Yersinia* spp., *Salmonella* spp., *E. coli*. Він також ефективний проти протозойних організмів (*Protozoa*), мікоплазм (*Mycoplasma* spp.), рикетсій (*Rickettsia* spp.) та хламідій (*Chlamydia* spp.). [20].

Згідно з державним реєстром ветеринарних препаратів [21], на ринку України представлено антибіотичні препарати, у складі яких наявний окситетрациклін. Ветеринарні препарати окситетрацикліну використовують для лікування великої рогатої худоби, свиней, овець, кіз, собак і кішок при захворюваннях:

- 1) шлунково-кишкового тракту;
- 2) органів дихання;
- 3) сечостатевої системи;

					НУХТ БТЕК 04.03.36 КР ПЗ			
Зм	Арк	№ докв-	Під-	Ла	РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ	Літе-	Ар-	Арквшів
Розроб-	Афлатарпи						22	09
Керівник	Ворониов							
Н. контр								
Кон-								
Зав.	Стабніков					Кафедра БТМ		

4) шкіри, викликаних мікроорганізмами, чутливими до окситетрацикліну [22].

Лікування великої рогатої худоби (ВРХ), телят, овець, кіз, свиней, собак, кішок таким препаратом проводять внутрішньом'язово в дозі 1 мл препарату на 10 кг маси тіла. Застосовують препарат окситетрацикліну з інтервалом 24 години, курс лікування - 3 - 5 діб. Зокрема, препарат окситетрациклін використовують для лікування маститу, який у молочної худоби призводить до зниження надоїв і якості молока, а отже завдає колосальних фінансових збитків молочним тваринникам [23].

За офіційними даними станом на 2022 рік, загальна кількість сільськогосподарських тварин (ВРХ, овець, кіз та свиней) складала 2644 тис. голів у тому числі корів 1544 тис. голів (дані взяті із Державної служби статистики України <http://www.ukrstat.gov.ua/>) [24]. Приймаємо до уваги, що 70 % молочної худоби ($1544 \cdot 0,7 = 1081$ тис. голів) здатні до зараження маститом через доїння [25, 26]. Також препарат окситетрацикліну бажано використовувати із профілактичною метою. Тому загальна кількість тварин на території України, що потребують до застосування ветеринарного препарату окситетрацикліну для усунення маститу складає 1081 голів.

Таблиця 3.1

Потреба окситетрацикліну

Категорія хворих	Маса 1 тварини, кг	Доза препарату на добу, мл	Вміст окситетрацикліну в 1 дозі препарату, мг	Курс лікування, діб	Максимальна кількість окситетрацикліну на 1 голову, г	Кількість хворих тварин станом на 2022 рік, тис. голів	Загальна потреба в окситетрацикліні на всіх хворих, кг
Корови	550	55	200	4	0,8	1081	864,8

Примітка. Для розрахунку було взято до уваги, що для лікування пропонується препарат Окситетрациклін 200, що випускається у вигляді розчину

для ін'єкцій (У 1 мл препарату міститься 200 мг окситетрацикліну гідрохлориду, що є діючою речовиною)

Отже, відповідно до даних *табл. 3.1* загальна потреба окситетрацикліні для лікування маститу у корів складає 864,8 кг

3.2. Потужність проєктованого виробництва окситетрацикліну

Відповідно до Державного реєстру ветеринарних препаратів України [22], переважна частина із доволі невеликого переліку препаратів окситетрацикліну, що представлені на ринку нашої держави, є власного виробництва (*див. табл. 3.2*). На українських підприємствах виробляються як розчини для ін'єкцій, так і спреї для зовнішнього застосування у вигляді суспензій.

Таблиця 3.2

Ветеринарні препарати окситетрацикліну, зареєстровані в Україні

Назва препарату	Лікарська форма	Виробник
Мазь окситетрациклінова 5%	Мазь	Індустріал Ветерінарія, С. А.; АніМедіка Херстелунгс ГмбХ; АніМедіка ГмбХ, Іспанія
Мазь окситетрациклінова 1%	Мазь	Інтервет Продакшенс С. р. І., Італія
ОКСИТЕТРАЦИКЛІН 200 L. А.	Розчин для ін'єкцій	Дослідна станція епізоотології ІВМ НААН; ТОВ «ДЕВІЕ», Україна
Окситетрациклін 200 П. Д.	Розчин для ін'єкцій	Приватне підприємство «O.L. KAR-АгроЗооВет-Сервіс», Україна
Окситетрациклін спрей	Спрей для зовнішнього застосування, суспензія	ТОВ «Укрветпромстач», Україна

Враховуючи, що на ринку України офіційно представлено доволі малий обсяг препаратів окситетрацикліну, а також той факт, що в нашій державі від загального обсягу виробників 60 % підприємств виробляє подібний лікарський засіб, планується виробництво антибіотику для задоволення потреб тварин обсягом 5 %. Потрібно також звернути увагу на те, що для ефективно-

го лікування слід чергувати лікарські препарати, аби не зростала резистентність, пропонується. Отже, на обраний термін лікування потрібно:

$$864,8 \cdot 0,05 = 43,24 \text{ кг/рік}$$

Тому для забезпечення фармацевтичного ринку ветеринарних засобів України ефективним препаратом, потрібно одержувати 43,24 кг окситетрацикліну в рік.

1.3. Об'єм ферментера та кількість виробничих циклів, необхідних для виробництва окситетрацикліну

Потужність нашого виробництва антибіотику окситетрацикліну становить $G_{гп} = 43,24$ кг/рік. Субстанцію антибіотику отримують сухою. Активоміцетний продуцент – *Streptomyces rimosus* sub sp. *rimosus* DSMZ 41439 синтезує 1,412 г окситетрацикліну на 1 л культуральної рідини [4].

За попереднім плануванням, обрана кількість субстанції буде вироблятися за $T_{рд} = 193$ робочих трудодні. Тому, виробничих циклів на рік є:

$$N_{цк} = 24 \cdot T_{рд} / T_{цф} = 24 \cdot 193 / 116 = 39,93, \text{ а отже } 40 \text{ циклів,}$$

де $T_{цф}$ – цикл роботи ферментера, що включає тривалість виробничого біосинтезу (108 год) і час підготовки ферментера до роботи (8 год):

- миття та огляд апарата (1,5 год);
- перевірка на герметичність (1 год);
- підігрів (0,5 год);
- стерилізація апарату (1 год);
- охолодження (1 год);
- завантаження середовища (1,5 год);
- засів (0,5 год);
- вивантаження культуральної рідини (1 год).

Кількість продукту за цикл складає:

$$G_{цк} = G_{нт} / N_{цк} = 43,24 / 40 = 1,081 \text{ кг/цикл.}$$

Із врахуванням сумарних втрат цільового продукту при виділенні (40 %), об'єм культуральної рідини, що буде зливатися за один цикл:

$$V_{кр} = K_1 \cdot G_{цк} \cdot C_{гп} / R_{кр}(1 - E_{св}) = 1,1 \cdot 1,081 \cdot 1 / (1,412 \cdot (1 - 0,4)) = 1,4 \text{ м}^3,$$

де K_1 – це коефіцієнт запасу, який ми можемо приймати для нестерильних операцій в коефіцієнті $K_1=1,1-1,5$.

Можна зробити попередній висновок, що за виробничий цикл отримують $V_{кр} = 1,4 \text{ м}^3$ культуральної рідини.

При одержанні культуральної рідини враховуємо її втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, що становлять від 10 до 15%.

$1,4 \text{ м}^3$ культуральної рідини ($V_{кр}$) можемо отримати у ферментері, робочий об'єм якого становить:

$V_{г} = V_{кр} / (1 - E_{ф}) = 1,4 / (1 - 0,1) = 1,5 \text{ м}^3$, де $E_{ф}$ – втрати культуральної рідини під час біосинтезу.

Можливий геометричний об'єм ферментера при $K_3 = 0,6$

$$V_{мф} = V_{рф} / K_3 = 1,5 / 0,6 = 2,5 \text{ м}^3$$

Знаходимо найближчий за геометричним об'ємом стандартний ферментер $V_{ф} = 2,5 \text{ м}^3$.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення

$$K_{зф} = V_{кр} / V_{ф} = 1,5 / 2,5 = 0,6 \text{ – не перевищує заданого значення.}$$

1.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для біосинтезу окситетрацикліну

Кількість посівного матеріалу (доза) для ферментера = 10 % від об'єму поживного середовища.

Тоді кількість поживного середовища у ферментері буде:

$$V_{пс1} = V_{роб.1} / (1 + X_{ф}) = 1,5 / (1 + 0,1) = 1,36 \text{ м}^3,$$

де $X_{ф} = 0,1$ – доза поживного середовища для ферментера.

$$\text{Кількість посівного матеріалу: } V_{пм1} = V_{роб.1} - V_{пс1} = 1,5 - 1,36 = 0,14 \text{ м}^3.$$

Для одержання $0,14 \text{ м}^3$ інокуляту в посівному апараті враховуємо втрати у результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 до 15%.

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

$$V_{роб.2} = V_{пм1} / (1 - E_{па}) = 0,14 / (1 - 0,1) = 150 \text{ л.}$$

Кількість посівного матеріалу (доза) становить 10 % від об'єму поживного середовища.

Тому кількість поживного середовища у посівному апараті буде:

$$V_{пс2} = V_{роб.2} / (1 + X_{па}) = 150 / (1 + 0,1) = 136 \text{ л,}$$

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

Кількість посівного матеріалу для інокулятора: $V_{пм} = V_{роб2} - V_{пс2} = 15 - 13 = 14 \text{ л.}$

Кількість посівного матеріалу $V_{роб2} = 150 \text{ л}$ можна одержати під час культивування актиноміцетів в інокуляторі з геометричним об'ємом $V_{ін2} = V_{роб.2} / K_{зап} = 150 / 0,6 = 250 \text{ л}$. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний інокулятор $V_{сін} = 250 \text{ л}$ та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{зап2} = V_{роб.2} / V_{сін} = 150 / 250 = 0,6.$$

Для одержання 14 л посівного матеріалу в інокуляторі враховуємо втрати у результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря (від 10 до 15%).

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

$$V_{роб3} = V_{пм2} / (1 - E_{ін}) = 14 / (1 - 0,1) = 15 \text{ л.}$$

Кількість посівного матеріалу (доза) є 10 % від об'єму поживного середовища.

Тоді кількість поживного середовища в інокуляторі буде:

$$V_{пс3} = V_{роб.3} / (1 + X_{ін}) = 15 / (1 + 0,1) = 13,6 \text{ л,}$$

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

Кількість посівного матеріалу для інокулятора: $V_{пм3} = V_{роб3} - V_{пс3} = 15 - 13,6 = 1,4 \text{ л.}$

Кількість посівного матеріалу $V_{роб.3} = 15 \text{ л}$ отримуємо під час культивування бактерій в інокуляторі з геометричним об'ємом $V_{ін3} = V_{роб3} / K_{зап} =$

$15 / 0,6 = 25$ л. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний інокулятор $V_{\text{сін}} = 30$ л та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{\text{зап}} = V_{\text{роб.3}} / V_{\text{сін}} = 15 / 30 = 0,5.$$

Кількість інокуляту для засіву меншого інокулятора $V_{\text{пм3}} = 1,4$ л одержуємо культивуванням актиноміцеті у колбах на качаці. Для цього використовують качалочні колби об'ємом $V_{\text{колб}} = 750$ мл та коефіцієнтом заповнення $K_{\text{зк}} = 0,2$.

Тоді кількість колб для отримання посівного матеріалу:

$$N_{\text{колб}} = V_{\text{пм3}} / (V_{\text{колб}} \cdot K_{\text{зк}}) = 1360 / (750 \cdot 0,2) = 9,1.$$

Отже, для одержання посівного матеріалу необхідно 10 качалочних колб.

Робимо висновок, що процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу окситетрацикліну у ферментері об'ємом $2,5 \text{ м}^3$ із коефіцієнтом заповнення 0,65 буде у три етапи. Узагальнена інформація щодо стадій виробництва окситетрацикліну наведена у табл. 3.3.

Таблиця 3.3

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

№ 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 поживного середовища, $V_{\text{пс}}$, л	Об'єм посівного матеріалу, $V_{\text{пм}}$, л
1	2	3	4	5	6
1	2500	0,6	1500	1360	140
2	250	0,6	150	136	14
3	30	0,5	15	13,6	1,4
4	0,75×10 колб	0,2	–	1,36	0,14

Таким чином, за результатами вищенаведених розрахунків для біосинтезу окситетрацикліну *S. rimosus* sub sp. *rimosus* DSMZ 41439 приймаємо, що один ферментер об'ємом $2,5 \text{ м}^3$, один посівний апарат об'ємом 250 л і один інокулятор об'ємом 30л.

Стадії культивування:

I стадія – вирощування у лабораторних умовах (у колбах на качалці);

II стадія – вирощування в інокуляторі об'ємом 30 л;

III стадія – вирощування у посівному апараті об'ємом 250 л;

IV стадія – виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 2,5 м³.

РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ОКСИТЕТРАЦИКЛІНУ

4.1. Шляхи катаболізму глюкози у *S. rimosus sub sp. rimosus* DSMZ 41439

Джерелом вуглецю та енергії при вирощуванні *Streptomyces rimosus* є глюкоза [4].

В електроній базі KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) знаходимо інформацію про шляхи метаболізму, які функціонують у *S. Rimosus*. Споживання глюкози відбувається відповідно до гліколізу (шляху Ембдена-Меєргофа-Парнаса). Відповідно до схеми метаболізму представленої у KEGG для даного виду, наведено схему перетворення глюкози (рис 4.1).

Глюкоза із поживного середовища під дією фосфоенолпіруватзалежної фосфотрансферази (КФ 2.7.1.199) перетворюється на глюкозо-6-фосфат. Фермент глюкозо-6-фосфатізомераза (КФ 5.3.1.9) каталізує взаємне перетворення α -D-глюкозо-6-фосфату та β -D-фруктозо-6-фосфату з фруктозо-6-фосфату під дією 6-фосфофруктокінази I (КФ 2.7.1.11) утворюється фруктозо-1,6-дифосфат, частина якого за допомогою фруктозо-1,6-дифосфатази II (КФ 3.1.3.11) зворотно перетворюється на попередню сполуку.

Фермент фруктозодифосфатальдолаза, клас II (КФ 4.1.2.13) здійснює перетворення фруктозо-1,6-дифосфату на дві сполуки: гліцеральдегід-3-фосфат та діоксиацетонфосфат. Фермент триозофосфатізомераза (КФ 5.3.1.1) здійснює ізомеризацію гліцеральдегід-3-фосфату та діоксиацетонфосфату. Перетворення гліцеральдегід-3-фосфату на 1,3-дифосфогліцерат здійснюється гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназою (КФ 1.2.1.12).

Фермент фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3) здійснює перетворення 1,3-дифосфогліцерату на 3-Фосфогліцерат, а фермент 2,3-дифосфатзалежна фосфогліцератмутаза (КФ 5.4.2.11) здійснює перетворення 3-фосфогліцерату на 2-фосфогліцерат.

					НУХТ БТЕК 04.03.36 КР ПЗ			
Зм	Арк	№ докв-	Під-	Ла	РОЗДІЛ 4. БІОСИН- ТЕЗ ОКСИТЕТРА-	Літе-	Ар-	Архів
Розроб-	Афпатарпи							
Керівник	Ворониюв						30	96
Н. контр								30
Кон-								
Зав.	Стабніков					Кафедра БТМ		

Фермент енолаза (КФ 4.2.1.11) здійснює перетворення 2-фосфогліцерату на фосфоенолпіруват.

Заключною реакцією гліколізу є перетворення фосфоенолпіруват на піруват, що каталізуються ферментом піруваткіназою (КФ 2.7.1.40) [27].

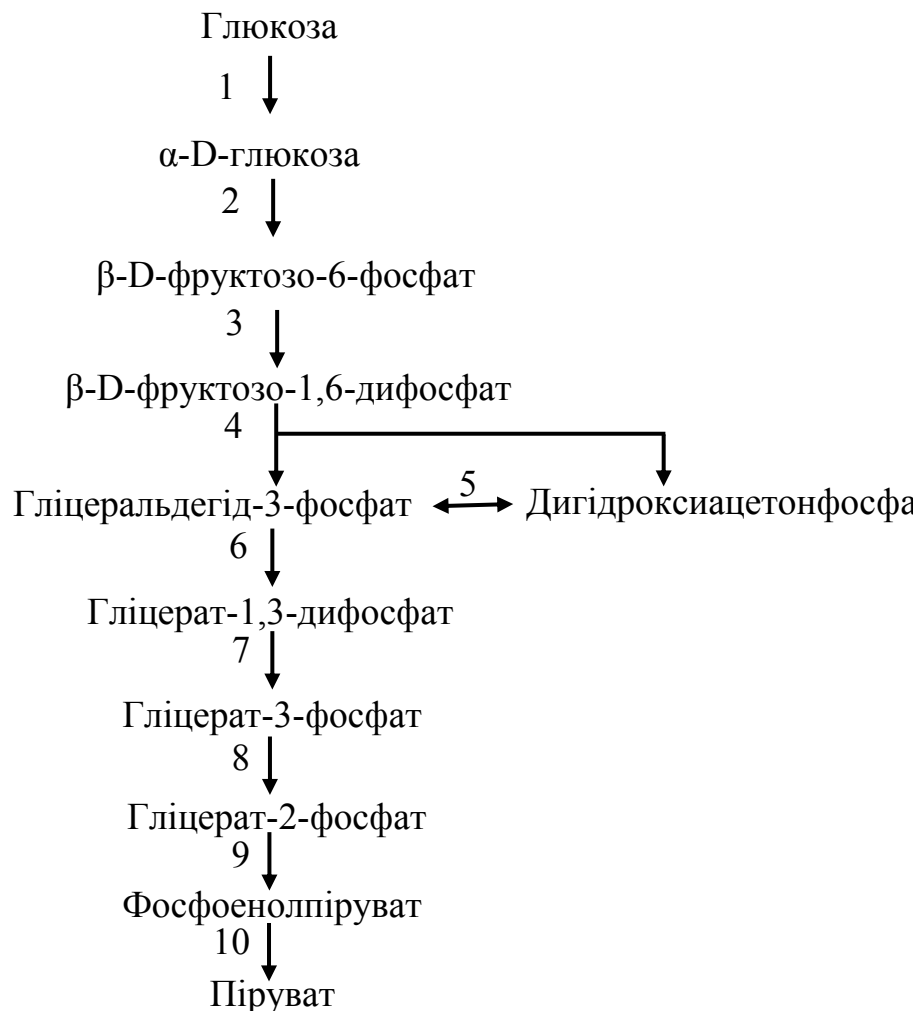


Рис 4.1. Катаболізм глюкози за шлях гліколізом

Ферменти: 1 – фосфоенолпіруват-залежна цукрова фосфотрансфераза (КФ 2.7.1.199); 2 – глюкозо-6-фосфат ізомераза (КФ 5.3.1.9); 3 – АТФ-залежна фосфотруктокіназа (КФ 2.7.1.11); 4 – фруктозодисфосфат альдолаза, (КФ 4.1.2.13); 5 – тріозофосфат ізомераза (КФ 5.3.1.1); 6 – гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12); 7 – фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3); 8 – 2,3-дифосфогліцератзалежна фосфогліцератмутаза (КФ 5.4.2.11); 9 – енолаза (КФ 4.2.1.11); 10 – піруваткіназа (КФ 2.7.1.40).

4.2. Біотрансформація глюкози в окситетрациклін

Джерелом вуглецю під час вирощування продуцента *Streptomyces rimosus* є глюкоза, що у свою чергу залучається до гліколізу, кінцевим інтермедіатом якого є піруват, який залучається до метаболізму за участі специфічної піруватдегідрогенази E1 (КФ 1.2.4.1) або дигідроліпоамід S-сукцинілтрансферази (КФ 2.3.1.12) [27]. Ацетил-КоА залучається до циклу трикарбонових кислот (ЦТК).

Анаплеротична реакція, яка функціонує у даного продуцента при рості на глюкоз є реакції карбоксилювання фосфоенолпірувату під дією фосфоенолпіруваткарбоксикіназа (КФ 4.1.1.32) [28].

Загальним попередником окситетрацикліну є метилпрететрамід, що синтезується шляхом конденсації однієї малонамідної і восьми малонатних одиниць. Попередниками біосинтезу окситетрацикліну є L-аспарагін та ацетил-КоА [29].

Ацетил-КоА під дією ацетил-КоА карбоксилази (КФ 6.4.1.2) перетворюється на малоніл-КоА. Фермент S-малонілтрансфераза (КФ 2.3.1.39) перетворює отриману сполуку на малоніл-АПБ (АПБ – ацил переносний білок) [30].

Фермент аспаратамінотрансфераза (КФ 2.6.1.1) перетворює оксалоацетат на L-аспартат, який за участі фермента аспарагінсинтази (КФ 6.3.5.4) перетворюється на L-аспарагін [31]. Фермент аспарагін-оксокислота-трансаміназа перетворює аспарагін на 2-оксосукцинамат [29].

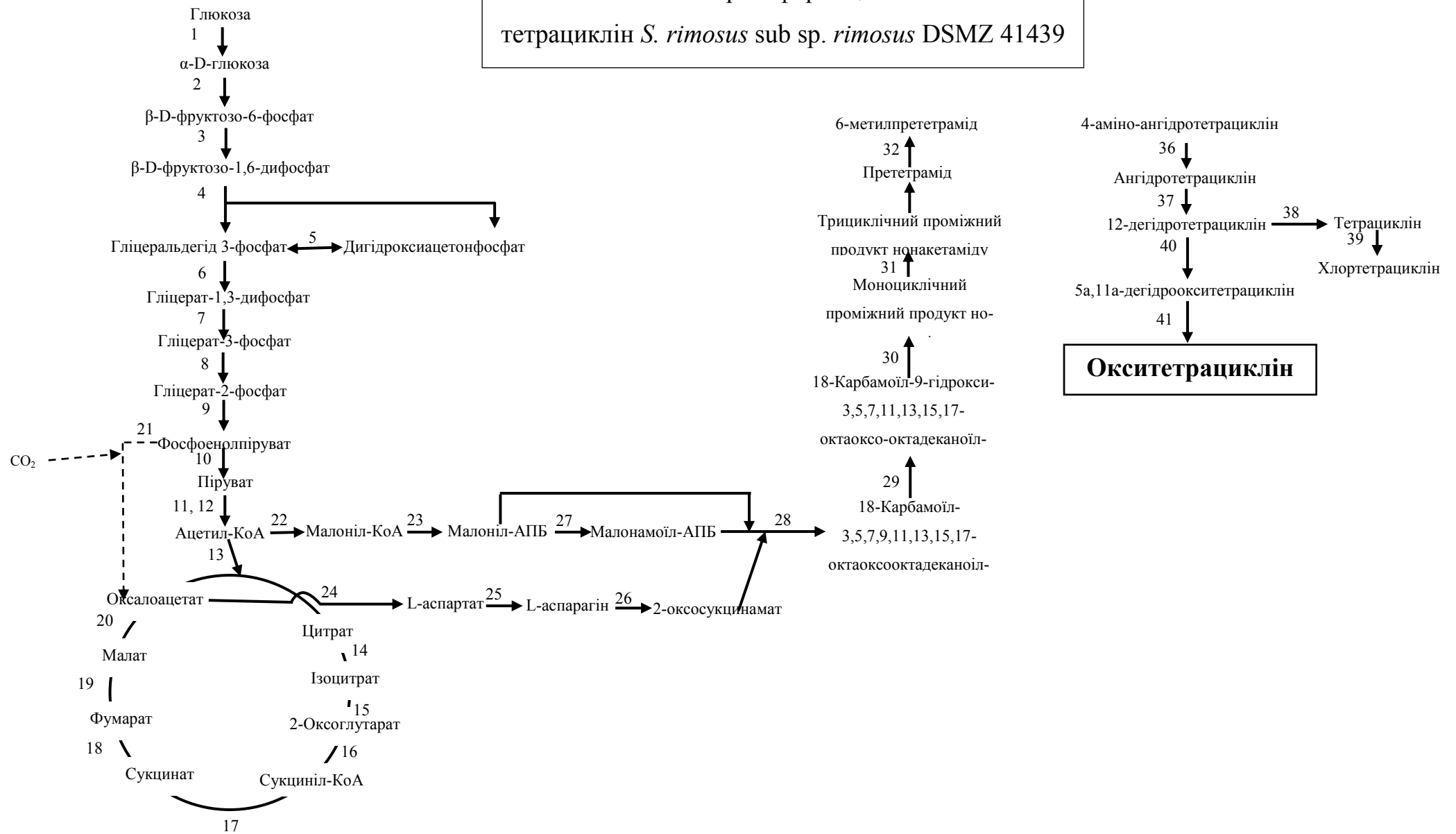
Із малоніл-АПБ утворюється малонамоїл-АПБ за участі амідотрансферази (КФ 6.3.5.-). Фермент мінімальна PKS кетосинтаза (KS/KS альфа) (КФ 2.3.1.- 2.3.1.260 2.3.1.235) каталізує конденсацію малонамоїлу-АПБ, малоніл-АПБ та похідної 2-оксосукцинамату з утворенням 18-Карбамоїл-3,5,7,9,11,13,15,17-октаоксооктадеканоїл-АПБ. Фермент кеторедуктаза (КФ 1.1.1.-) перетворює утворену сполуку на 18-Карбамоїл-9-гідрокси-3,5,7,11,13,15,17-октаоксо-октадеканоїл-АПБ, що перетворюється на моноциклічний проміжний продукт нонакетаміду за участі біфункціональної циклази (КФ 4.2.1.-). Наступним етапом є перетворення утвореного моноцикліч-

ного проміжного продукту на трициклічний проміжний продукт нонакетаміду під дією циклази. Утворена сполука перетворюється на прететрамід без участі ферментів. Фермент С-метилтрансфераза (КФ 2.1.1.-) перетворює прететрамід на 6-метилпрететрамід. Фермент 6-метилпрететрамід 4-монооксигеназа (КФ 1.14.13.232) каталізує перетворення 6-метилпрететрамід на 4-гідрокси-6-6-метилпрететрамід, який перетворюється на 4-кето-ангідротетрациклін за участі 4-гідрокси-6-метилпрететрамід 12а-монооксигенази (КФ 1.14.13.233). Фермент амінотрансфераза перетворює 4-кето-ангідротетрациклін на 4-аміно-ангідротетрациклін. 4-аміно-ангідротетрациклін N4-метилтрансфераза (КФ 2.1.1.335) перетворює 4-аміно-ангідротетрациклін на ангідротетрациклін. Фермент ангідротетрациклін 6-монооксигеназа (КФ 1.14.13.38) перетворює ангідротетрациклін на 12-дегідротетрациклін. Починаючи із цієї сполуки відбувається розгалуження біосинтезу.

Під дією 5а,11а-дегідротетрациклінредуктази (КФ 1.3.98.4) 12-дегідротетрациклін перетворюється на тетрациклін, який за участі ферменту флавінредуктази (НАДН) (КФ 1.5.1.36) може перетворитися на хлортетрациклін.

Під дією 5а,11а-дегідротетрациклін 5-монооксигеназа (КФ 1.14.13.234) 12-дегідротетрациклін перетворюється на 5а,11а-дегідроокситетрациклін. Фермент 5а,11а-дегідротетрациклінредуктаза (КФ 1.3.98.4) перетворює 5а,11а-дегідроокситетрациклін на окситетрациклін [32].

Рис. 4.2. Схема біотрансформації глюкози в окситетрациклін *S. rimosus* sub sp. *rimosus* DSMZ 41439



Умовні позначення: - основний шлях біосинтезу;
- анаплеротичні реакції;

Ферменти: 1 – фосфоенілпіруват-залежна цукрова фосфотрансфераза (КФ 2.7.1.199); 2 – глюкозо-6-фосфат ізомераза (КФ 5.3.1.9); 3 – АТФ-залежна фосфоглюкокіназа (КФ 2.7.1.11); 4 – фруктозодисфосфат альдолаза, (КФ 4.1.2.13); 5 – тріозофосфат ізомераза (КФ 5.3.1.1); 6 – гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12); 7 – фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3); 8 – 2,3-дисфосфогліцератзалежна фосфогліцератмутаза (КФ 5.4.2.11); 9 – енолаза (КФ 4.2.1.11); 10 – піруваткіназа (КФ 2.7.1.40); 11 – піруватдегідрогеназа E1 (КФ 1.2.4.1); 12 – дигідроліпоамід S-сукцинілтрансферази (КФ 2.3.1.12); 13 – цитратсинтаза (КФ 2.3.3.1); 14 – аконітат гідратаза (КФ 4.2.1.3); 15 – ізоцитратдегідрогеназа (КФ 1.1.1.42); 16 – 2-оксоглутарат ферредоксин оксидоредуктаза субодиниця бета (КФ 1.2.7.3, 1.2.7.11); 17 – сукциніл-КоА-синтетаза бета-субодиниця (КФ 6.2.1.5); 18 – сукцинатдегідрогеназа (КФ 1.3.5.1); 19 – фумарат гідратаза, клас II (КФ 4.2.1.2); 20 – малатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.37); 21 – фосфоенілпіруваткарбоксікіназа (КФ 4.1.1.32); 22 – ацетил-КоА карбоксилаза (КФ 6.4.1.2); 23 – S-малонілтрансфераза (КФ 2.3.1.39); 24 – аспаратамінотрансфераза (КФ 2.6.1.1); 25 – аспарагінсинтаза (КФ 6.3.5.4); 26 – аспарагін-оксокислота-трансаміназа; 27 – амідотрансфераза (КФ 6.3.5.-); 28 – мінімальна PKS кетосинтаза (KS/KS альфа) (КФ 2.3.1.- 2.3.1.260 2.3.1.235); 29 – кеторедуктаза (КФ 1.1.1.-); 30 – біфункціональна циклаза (КФ 4.2.1.-); 31 – циклаза; 32 – C-метилтрансфераза (КФ 2.1.1.-); 33 – 6-метилпрететрамід 4-монооксигеназа (КФ 1.14.13.232); 34 – 4-гідрокси-6-метилпрететрамід 12a-монооксигенази (КФ 1.14.13.233); 35 – амінотрансфераза; 36 – 4-аміно-ангідротетрациклін N4-метилтрансфераза (КФ 2.1.1.335); 37 – ангідротетрациклін 6-монооксигеназа (КФ 1.14.13.38); 38 – 5a,11a-дегідротетрациклінредуктаза (КФ 1.3.98.4); 39 – флавінредуктаза (НАДН) (КФ 1.5.1.36); 40 – 5a,11a-дегідротетрациклін 5-монооксигеназа (КФ 1.14.13.234); 41 – 5a,11a-дегідротетрациклінредуктаза (КФ 1.3.98.4).

РОЗДІЛ 5. ВИБІР ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ТА ЇЇ ОБҐРУНТУВАННЯ

5.1. Тип ферментера та обґрунтування способу культивування актиноміцетів у ньому

Умови і спосіб культивування безпосередньо залежать від фізіолого-біохімічних особливостей *Streptomyces rimosus*.

1. Культивування *S. rimosus* можна здійснюватися поверхневим або глибинним способами. Однак глибинне культивування має свої переваги в порівнянні з поверхневим культивуванням на природних субстратах. Глибинне культивування зазвичай здійснюється в контрольованих умовах, що дозволяє більш точний контроль параметрів культивування, таких як температура, рН, концентрація поживних речовин та інші, а також тривалість глибинного культивування є меншою (108 год) порівняно із поверхневою (12 діб). Відповідно, для отримання окситетрацикліну застосовується глибинний спосіб культивування [4, 7].

2. Оскільки цільовим продуктом є антибіотик, який є вторинним метаболітом можливе лише періодичне культивування продуцента.

3. Виробниче культивування та вирощування посівного матеріалу вимагають дотримання асептичних умов, оскільки це дозволяє запобігти контамінації і забезпечити безпечні умови для зростання та розвитку мікроорганізмів. Одним із методів забезпечення асептичності є стерилізація обладнання, комунікацій, поживних середовищ і розчину титрувального агента. Стерилізація обладнання, такого як інокулятори, збірники, реактори, ферментери, здійснюється для усунення мікроорганізмів та забезпечення стерильного середовища.

4. *S. rimosus* є аеробним мікроорганізмом, тому при культивуванні необхідна подача стерильного повітря та перемішування.

					НУХТ БТЕК 04.03.36 КР ПЗ			
Зм	Арк.	№ доку-	Під-	Да	РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ	Ліме-	Ар-	Арк.шіт
Розроб-	Адфатарпи						6	96
Керівник	Воронцов							35
Н. контр						Кафедра БТМ		
Кон-								
Зав.	Стабніков							

Перемішування проводиться за допомогою двох 6-лопатевих турбін Раштона наступних розмірів: d_t (діаметр бака) = 215 мм; d_i (діаметр робочого колеса) = 86 мм; $d_i/d_t = 0,4$. Перемішування регулювали на 400 об/хв і аерацію проводили, використовуючи фільтроване стерильне повітря зі швидкістю 1 об/об/хв [4].

5. Чітко було помічено, що максимальна питома швидкість росту поступово зменшувалася тоді як функція концентрації глюкози збільшувалася. Для культури концентрація глюкози нижче 20 г/л була повністю спожита наприкінці культивування. Також відмічено незначне пригнічення синтезу антибіотика при використанні глюкози у концентрації більше ніж 20 г/л. Проте при внесенні додаткової глюкози у концентрації глюкози 8 г/л на 36 і 90 години культивування при зменшенні початкової концентрації глюкози спостерігалось збільшення концентрації окситетрацикліну [4].

6. Середовище для культивування містить піноутворюючі речовини (дріжджовий екстракт 5 г/л), тому в конструкціях ферментера та інокулятора має бути передбачений механічний піногасник.

Спосіб культивування та фізіолого-біохімічні властивості *S. rimosus* обумовлюють вимоги відносно ферментера, у якому має відбуватись культивування даного продуцента.

Для культивування використовується біореактор об'ємом 2,5 м³. Модель: DIN-VE із нержавіючої сталі 316L. Габаритні розміри, мм: 1700x4050 [33]. Прилад оснащений механічним перемішувальним приладом.

Аеробні умови культивування вимагають наявності перемішувального пристрою та барботера для подачі повітря. Біореактор оснащений перемішувальним пристроєм, барботером та датчиком розчиненого кисню.

Для підтримання температури ферментер оснащений сорочкою та датчиком температури. Для піногасіння використовується механічний спосіб, який полягає у встановленні мішалки у верхній частині апарата. Мішалка обертається за допомогою команди від датчика і розбиває утворену піну.

Для контролю значення рН культуральної рідини в ферментері використовується датчик рН. Крім того, у ферментера є пробовідбірник.

5.2. Підготовка повітря. Основні етапи

Оскільки продуцент окситетрацикліну – *Streptomyces rimosus* DSMZ 41439 є аеробною бактерією [7], тому є необхідність під час процесу біосинтезу у безперевній подачі стерильного повітря через барботер.

Підготовка стерильного аераційного повітря проходить таким чином:

1. Атмосферне повітря забирається за допомогою турбокомпресора через забірну шахту, розташовану на висоті 2-3м від найвищої точки будівлі, що складає приблизно 10 м (враховуючи висоту поверху в 6 м, кількість поверхів - 1 та косий дах будівлі, що досягає 1,5 м).

2. Використання фільтрів попереднього очищення повітря є важливим кроком для зниження кількості контамінантів, зокрема грубого аерозолі або пилу. Ці фільтри здатні утримувати тверді частинки, такі як пил, пилові клітинки, волокна і інші частки, які можуть бути присутні в повітрі.

3. Стиснення повітря у турбокомпресорі до тиску в діапазоні 0,35 - 0,5 МПа призводить до підвищення його температури в діапазоні 120 - 250 °С. Цей процес супроводжується збільшенням вмісту вологи на одиницю об'єму повітря.

4. Для запобігання злипанню волокон і утворенню каналів, волога в повітрі випадає в краплевловлювачі за допомогою охолодження повітря через теплообмінний апарат.

5. Видалення конденсованої вологи у ресивері, що потрапила із компресора.

6. Підігрів повітря у теплообмінниках.

7. Очищення повітря на головних фільтрах.

8. Індивідуальні фільтри третього рівня, які встановлені безпосередньо на кожному ферментері, забезпечують очищення повітря від мікроорганізмів на високому рівні. Вони функціонують як додатковий етап очищення після головних фільтрів повітря і здатні затримувати до 99,999% мікроорганізмів.

Це дозволяє забезпечити максимально чисте повітря в околиці ферментерів і уникнути забруднення процесу біосинтезу. Індивідуальні фільтри відіграють важливу роль у забезпеченні стерильних умов та якості продукції.

Для стерилізації індивідуального фільтра, конструкція якого залежить від типу фільтрувального матеріалу, є найефективнішим способом використання нагрівання вологою парою та витримувannya його протягом певного часу за температури 28 °С. Цей процес дозволяє знищити мікроорганізми і забезпечити стерильність фільтра для подальшого використання. Важливо дотримуватись рекомендацій та протоколу стерилізації, щоб забезпечити надійну і ефективну очистку фільтра [34].

Так, в мікробіологічних боксах та лабораторіях, де проводиться підготовка посівних культур для вирощування інокуляту у колбах на качалках, одним з методів стерилізації повітря є використання ультрафіолетових (УФ) променів за допомогою УФ-ламп. УФ-випромінювання в даному випадку використовується для знищення мікроорганізмів, які можуть бути присутні в повітрі, забезпечуючи біологічну безпеку під час роботи з мікроорганізмами.

5.3. Вибір дезінфікуючих та мийних засобів

Дезінфекція – заходи знезараження об'єктів зовнішнього середовища, спрямованна на усунення або знищення мікроорганізмів, які можуть бути шкідливими для людей. Ці заходи мають на меті перервати шляхи передачі інфекційних захворювань від джерела інфекції до осіб, які можуть бути вразливими до цих захворювань. Система знезараження може включати повне, часткове або селективне знищення мікроорганізмів, залежно від конкретної ситуації та потреб [35].

Цілі проведення дезінфекції.

Основною метою заходів з дезінфекції є профілактика поширення інфекційних захворювань для формування і підтримання безпечних умов життя.

Проведення дезінфекції має завданням переривання шляхів поширення інфекції від її джерела до інших об'єктів.

Види дезінфекції.

Виділяють наступні види дезінфекції:

- профілактичний,
- осередковий, що підрозділяється на поточні і заключні комплекси

заходів по знезараженню.

Методи дезінфекції.

Є чотири основні методи проведення дезінфекції:

- **Механічний метод** – проводиться очищення повітря та поверхонь шляхом провітрювання, вентиляції, прання та очищення поверхонь. Також до цього методу належить фільтрація повітря, води, видалення зараженого ґрунту. Механічний метод використовують в поєднанні з іншими методами (хімічний або фізичний).

- **Хімічний метод** – дезінфекція за допомогою дезінфікуючих засобів, що вбивають хвороботворні організми і руйнують токсини. Для хімічної дезінфекції використовуються хлоровмісні і спиртові препарати, перекис водню, формалін.

- **Фізичний метод** - дезінфекція під час якої застосовують високо-температурна обробку матеріалів та ультрафіолетове випромінювання. Цей метод є найефективнішим та екологічно безпечним.

- **Біологічний метод** – застосовують для стічних вод, зливних споруд, каналізаційних вод та для очищення септиків. Суть методу полягає в тому, що відбувається взаємодія різних мікроорганізмів.

- **Комбіновані методи** – два або більше вище сказаних методів для більше кращого результату. Зазвичай використовують механічний метод та хімічний чи фізичний.

Засоби дезінфекції.

Засоби дезінфекції розрізняються за призначенням і формою випуску. Серед основних вимог до сучасних засобів дезінфекції виділяють наступні:

- високу ефективність, що забезпечує цільовий специфічний вплив агента в короткий термін;

- безпеку;
- сумісність і нешкідливість для матеріалів оброблюваних поверхонь і виробів;
- спеціалізовану очищаючу дію для органічних і неорганічних видів забруднення;
- стабільність при використанні;
- можливість контролю концентрації засобів дезінфекції в розчині [36];

Таблиця 5.1

Дезінфікуючі та миючі засоби

Назва засобу	Діюча речовина	Застосування
«Ефір С-12»	%: гідроксид натрію (CAS №1310-73-2) -25; гіпохлорит натрію (CAS №7681-52-9) - 5	для очищення і дезінфекції будь-якого обладнання з нержавіючої сталі, викладених кахлем стін і підлогових покриттів
«Контек ПроХлор»	Кальцій гіпохлорит <1 % (Contec ProChlor) масова концентрація активного хлору 0,19%	використовують для проведення дезінфекцій поверхонь, інфетарю, обладнання, чистих кімнат на фармацевтичних та біотехнологічних підприємствах. [37]
«Клінідез»	дихлорізоціанурова кислота з додаванням ПАР	для дезінфекції технологічного обладнання та устаткування в харчовій, фармацевтичній, мікробіологічній, біотехнологічній, парфюмерно-косметичної промисловості [38].
Миючий засіб «PUR-285»	- - -	для видалення тяжких білково-жирових забруднень з поверхонь стін і підлоги, і виробничого обладнання та інвентарю. [39]
Миючий засіб «СІР 1073»	- - -	для безрозбірного миття різноманітного харчової промисловості. Ефективно очищає поверхні і внутрішні вузли обладнання від органічних забруднень. [40]

Розрахунок необхідних об'ємів. Виробництво окситетрацикліну здійснюється упродовж 190 днів. З метою забезпечення чистоти виробничих приміщень, миття підлоги проводиться щодня, тобто 190 разів. Також, раз на місяць здійснюється генеральне прибирання (оброблюють стіни, підлогу, вікна тощо), тобто 7 разів. Для розрахунку приблизної площі оброблення мийними та дезінфікуючими засобами, необхідно врахувати площу підлоги виробничого приміщення та площу стін на висоті 2,5м. За допомогою отриманої площі оброблення ми розраховуємо кількість мийних і дезінфікуючих засобів, враховуючи рекомендовану дозу засобу на одиницю площі, яку вказує виробник на упаковці. Оптимальна площа підлоги цеху виробничого біосинтезу та вирощування інокулянту : $20 \times 17 = 340 \text{ м}^2$, площа стін – $((20 \times 2,5) + (17 \times 2,5)) \times 2 = 185 \text{ м}^2$, загальна площа – $340 + 185 = 525 \text{ м}^2$. Загальна площа поверхні обробки мийними засобами наведена у *табл. 5.2*.

Кількість виробничих циклів для синтезу окситетрацикліну становить 40. Якщо миття обладнання відбувається перед кожним циклом, то загальна кількість процесів миття за весь період виробництва становить 40 (додаткове миття після останнього циклу). Тоді загальний об'єм миття:

$$41,12 \times 40 = 1685,92 \text{ м}^3$$

Таблиця 5.2

Розрахунок загальної площі стін та підлоги виробничих приміщень

Приміщення	Площа підлоги, м²	Площа стін, м²	Загальна площа, м²
Цех виробничого біосинтезу та вирощування інокулянту	340	185	525
Мікробіологічна лабораторія	15	30	45
Приміщення з качалками	10	25	35
Загальна площа	365	240	605

Загальні дані відносно розрахунку площі миття та/або дезінфекції за весь період виробництва наведено у *табл. 5.3*.

Таблиця 5.3

Об'єкт дезінфекції та/або миття	Площа (об'єм) об'єкту, що піддається обробці, м ² (м ³)	Кількість процесів миття та/або дезінфекції за весь період виробництва	Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м ² (м ³)
Обладнання	41,12	11	1685,92
Підлога	365	60	21900
Стіни, двері, вікна	240	2	480

Для вибору миючого та дезінфікуючого засобу важливо враховувати як вартість продукту, так і витрати на обробку потрібної площі виробничого приміщення. За методичними рекомендаціями, для обробки 1 м² площі необхідно приблизно 100 мл робочого розчину мийного чи дезінфікуючого засобу.

Підготовка виробничих приміщень включає такі етапи: вологе прибирання, дезінфекцію і ультрафіолетове опромінення підлог, стін, стелі, поверхонь обладнання та комунікацій для забезпечення чистоти.

Підготовка виробничих приміщень розділяється на генеральну та щоденну. Щоденне прибирання "чистих" приміщень здійснюється після кожної зміни за допомогою вологої методики.

При виборі миючого та дезінфікуючого засобу необхідно враховувати вартість продукту, його ефективність, вимоги до безпеки та вплив на оточуюче середовище. Також рекомендується консультиватися з фахівцями у сфері санітарії та гігієни для отримання детальної інформації та рекомендацій. Якщо об'єми робочих розчинів для миття становлять приблизно 50% від загального об'єму, то використовуємо цей відсоток для розрахунку об'єму мийного чи дезінфікуючого засобу. Таким чином за один цикл на миття ферментеру, інокуляторів, ректорів-змішувачів і збірника:

$$41,12 \times 0,5 = 20,56 \text{ м}^3$$

Тоді за весь час виробництва препарату буде використано наступний об'єм розчину для миття та дезінфекції:

$$20,56 \times 41 = 842,96 \text{ м}^3$$

За даними *табл. 2.3*, загальна площа миття підлоги, стін, вікон та дверей:

$$21900 + 480 = 22380 \text{ м}^2$$

Загальна характеристика основних дезінфікуючих та мийних засобів для виробництва окситетрацикліну

Назва мийно-го/дезінфікуючого засобу	Об'єкт миття та/або дезінфекції	Робочий розчин. Конц., %	Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м ² (м ³)	Кількість робочого розчину за весь період виробництва, л	Витрата на 1 м ² поверхні, л
«Ефір С-12»	Обладнання	2,0	452,32	842,96	0,5
«Контек ПроХлор»		0,3	452,32	842,96	0,1
«Клінідез»		0,5	22380	2238	0,5
«PUR-285»	Стіни, підлога, вікна, двері	1,0	22380	2238	0,1
«СІР 1073»		3,0	22380	4476	0,1

5.4. Стерилізації поживного середовища. Особливості його підготовки

Виробничий біосинтез окситетрацикліну здійснюється у ферментері об'ємом 2,5 м³, що містить 1,3 м³ поживного середовища. Інокулянт отримують у три етапи: у колбах на качалках, в інокуляторах об'ємом 30 і 250 л.

Максимальний синтез окситетрацикліну (1412 мг/л за 108 год) досягається за умов росту бактеріального штаму *S. rimosus* DSMZ 41439 на середовищі такого складу (г/л):

- Глюкоза 31,0;
- Дріжджовий екстракт 5,0;
- (NH₄)₂SO₄ 3,0;
- КН₂РО₄ 2,0;
- К₂НРО₄ 1,0;
- MgSO₄ 7H₂O 0,5 [7].

Для стерилізації середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках використовуватиметься автоклав, оскільки його об'єм є невеликим (1300 мл). Для вирощування в інокуляторах і виробничого біосинтезу стерилізація відбуватиметься безпосередньо у самих апаратах при рН

значенні 4...4,5. У технологічній схемі передбачено допоміжні роботи для підготовки 6%-го розчинну соляної к-ти та 6%-го стерильного розчину гідроксид натрію. Ці розчини використовуватимуться в процесі стерилізації і регулювання рН середовища.

Для того, щоб визначити спосіб приготування допоміжних розчинів (соляної к-ти і луку) і визначитися з необхідними для цього колбами чи реакторами, розраховуємо кількість таких компонентів, необхідну для приготування середовища на кожних з чотирьох стадій виробництва (табл. 5.5).

Дані, наведені у табл. 5.5, говорять про те, що розчинні титрувальних агентів для виробничого біосинтезу необхідно готувати у реакторах об'ємом 5 л.

Таблиця 5.5

Розрахунок вмісту та особливості приготування деяких компонентів поживного середовища

Об'єм середовища, л	HCl (6%)		NaOH (6%)	
	Об'єм, мл	Особливість приготування	Об'єм, мл	Особливість приготування
1,36	-	У реакторі на 5 л	-	-
13,6	27,2		27,2	У колбі об'ємом 100 мл
136	272		272	У колбі об'ємом 500 мл
1360	2720		2720	У реакторі на 5 л

5.4.1. Вирощування інокуляту в колбах на качалках

Після проведеного аналізу складу поживного середовища для вирощування *S. rimosus* DSMZ 41439, можна розділити його на наступні композиції в залежності від режиму стерилізації компонентів та їх взаємодій:

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

Композиція Б: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв).

Композиція В: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв).

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 1360 мл середовища

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість, яка потрібна для приготування 1360 мл середовища, г	Композиція	Композиції – їх об'єм, V, мл
Глюкоза	31	42,2	А	600
Дріжджовий екстракт	5	6,8		
Вода	551 мл			
(NH ₄) ₂ SO ₄	3	4,08	Б	600
KH ₂ PO ₄	2	2,72		
K ₂ HPO ₄	1	1,36		
Вода	590 мл			
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,5	0,68	В	160
Вода	160 мл			
Всього				1360

Дріжджовий екстракт і глюкоза (композиція А) які є термолабільними, стерилізують у м'якому режимі стерилізації. Солі композицій Б і В піддають стандартній температурі стерилізації. Фосфати композиції Б стерилізують окремо, щоб уникнути утворення нерозчинних фосфатів магнію. Всі композиції А, Б і В стерилізують в автоклаві. Додатково готують 40% розчин глюкози об'ємом 65 мл для підживлення, який також стерилізується в автоклаві при температурі 112 °С протягом 30 хвилин.

5.4.2. Процес вирощування інокуляту в посівних апаратах

Вирощування інокуляту у посівному апараті об'ємом 30 л

Стерилізація 13,6 л поживного середовища, необхідного для цієї стадії, здійснюється у відповідному посівному апараті та реакторі, залежно від режимів стерилізації, тому потребує перескладання склад композицій поживного середовища:

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

Композиція Б: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв, рН 4.0–4.5).

Умови стерилізації композиції Б є жорсткішими, ніж для композиції А, тоді рекомендується проводити стерилізацію композиції Б в посівному апараті. Це дозволить забезпечити належну стерильність цієї композиції, зокрема, під час розчинення солей в окремому реакторі перед подачею до посівного апарату. Оскільки солі стерилізуються при рН 4,0...4,5 можливість утворення нерозчинного осаду при взаємодії компонентів відсутня.

Таблиця 5.7

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 13,6 л середовища

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість, яка потрібна для приготування 13,6 л середовища, г	Композиція	Композиції – їх об'єм, V, мл
Глюкоза	31	422	А	4000
Дріжджовий екстракт	5	68		
Вода	3600 мл			
Конденсат	400 мл			
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3	40,8	Б	9600
KH_2PO_4	2	27,2		
K_2HPO_4	1	13,6		
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5	6,8		
Вода	8640 мл			
Конденсат	960 мл			
Всього				13600

Вирощування інокуляту у посівному апараті об'ємом 250 л

Стерилізація 136 л поживного середовища, необхідного для цієї стадії, здійснюється у відповідному посівному апараті та реакторі, залежно від режимів стерилізації, склад композицій є аналогічним попередній підстадії.

Композицію Б стерилізують в посівному апараті, оскільки вона вимагає більш жорстких умов стерилізації порівняно з композицією А. У цьому випадку солі розчиняють у окремому реакторі, а потім отриманий розчин подається в посівний апарат, де проводиться стерилізація (при рН 4.0-4.5). Такий підхід забезпечує відповідні умови для досягнення стерильності композиції Б.

Таблиця 5.8

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 136 л середовища

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість, яка потрібна для приготування 136 л середовища, г	Композиція	Композиції - їх об'єм, V, л
Глюкоза	31	4220	А	40
Дріжджовий екстракт	5	680		
Вода	31100 мл			
Конденсат	4000 мл			
(NH ₄) ₂ SO ₄	3	408	Б	96
KH ₂ PO ₄	2	272		
K ₂ HPO ₄	1	136		
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,5	68		
Вода	85515 мл			
Конденсат	9600 мл			
Всього				136

5.4.3. Виробничий біосинтез у ферментаторі об'ємом 2,5 м³

Стерилізація 1,36 м³ поживного середовища, необхідного для цієї стадії, здійснюється у відповідному посівному апараті та реакторі, залежно від режимів стерилізації. Середовище ділять на такі композиції:

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

Композиція Б: (NH₄)₂SO₄, KH₂PO₄, K₂HPO₄, MgSO₄·7H₂O (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв, рН 4.0–4.5).

Композицію Б стерилізують у посівному апараті, оскільки вона вимагає більш жорстких умов стерилізації порівняно з композицією А. У цьому випадку, солі, що складають композицію Б, розчиняють у окремому реакторі, а потім отримана розчинена композиція подається в посівний апарат для проведення стерилізації (при рН 4,0-4,5). Такий підхід забезпечує необхідні умови для забезпечення стерильності композиції Б.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 1,36 м³ середовища

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість, яка потрібна для приготування 1,36 м ³ середовища, кг	Композиція	Композиції – їх об'єм, V, л
Глюкоза	31	42,2	А	400
Дріжджовий екстракт	5	6,8		
Вода	311000 мл			
Конденсат	40000 мл			
(NH ₄) ₂ SO ₄	3	4,1	Б	960
KH ₂ PO ₄	2	2,72		
K ₂ HPO ₄	1	1,36		
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,5	0,68		
Вода	855140 мл			
Конденсат	96000 мл			
Всього				1360

Отже, технологічна схема, крім стадій підготовки поживного середовища, включає такі додаткові стадії:

- приготування 6% розчину хлоридної кислоти для підкислення середовища при стерилізації його в посівному апараті об'ємом 30, 250 л та ферментаторі 2,5 м³;

- приготування та стерилізація 6% розчину натрію гідроксид для стабілізації рН середовища перед початком культивування в посівному апараті об'ємом 30, 250 л та ферментаторі 2,5 м³;

Крім того необхідно передбачити такі реактори:

- для приготування 6% HCl (5 л);
- для приготування та стерилізації 6% NaOH (5 л);
- для приготування та стерилізації композиції А (10, 63, 630 л);
- для розчинення та змішування солей композиції Б (10 л; 100 л; 1 м³).

РОЗДІЛ 6. ВИРОБНИЧИЙ БІОСИНТЕЗ ОКСИТЕТРАЦИКЛІНУ ТА ОБЛАДНАННЯ ДОФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ.

СПЕЦИФІКАЦІЯ

Специфікація обладнання, зображеного на апаратурній схемі (див. графічна частина), наведенна в табл. 6.1.

Таблиця 6.1

Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт та виробничого біо- синтезу окситетрацикліну

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
ПЗ-1	Повітрозабірник	1	Повітробірник Dani ВЗ 12-1 («Dani»). Температура повітря до 100 °С; тиск до 12 бар; матеріал: сталь [41].
Ф-2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтр грубої очистки повітря. Виробник: «ТІОН». Фільтрувальний матеріал: синтетичне волокно класу G4; маса, кг: 0,269; Е=80-90%; Розмір уловлюваних забруднювачів, мкм: 5 [42].
К-3	Компресор	1	Компресор ВК50Р-7,5 з прямим приводом. Виробник: «Remeza». Максимальний робочий тиск 8 бар; потужність, кВт: 30-90 [43].
Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Конденсатр (теплообмінник) KFL ELK 4 («ЄВРОКУЛ»). Продуктивність: 2950 м ³ /год; габарити, мм: 475x497x170; потужність: 4,24 кВт [44].
Р-5	Ресивер	1	Ресивер ПЗВ 500-600-11-01 («Zelko»). Об'єм, л: 500; максимальний тиск: 11 бар; габаритні розміри, мм: 2125x600 [45].
Т-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Теплообмінник типу «труба в трубі», вироблений компанією «Єврохіммаш», має максимальний робочий тиск 0,6 МПа (або 6 бар) і робочу температуру до 150 °С [46]
Ф-7	Головний фільтр очистки	1	Компактний кишеньковий фільтр класу G4, виробником якого є «New Filter», має наступні характеристики: максимальна температура, яку він може здати: до 80 °С; фільтрувальний матеріал, використаний в цьому фільтрі: мікроскловолокно; ефективність фільтрації: більше 95% [47]

НУХТ БТЕК 04.03.36 КР ПЗ

Зм	Арк.	№ докв-	Під-	Ла	РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДОФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ТА ВИРО-	Піме-	Ар-	Архивів
Розроб-	Афлатарплі						52	02
Керівник	Воронцов					Кафедра БТМ		
Н. контр								
Кон-								
Зав.	Стабніков							

ІФ-8, ІФ-22, ІФ-33	Індивідуальний фільтр	3	Фільтр у сталевому корпусі PF. Фільтруючий матеріал: боросилікатне волокно; матеріал корпусу: нержавіюча сталь 1.4301; робочий тиск: 16 бар; максимальна температура: 150 °С; ступінь очищення повітря фільтром: 99,999 % [48].
Д-9, Д-11, Д-15, Д-18, Д-24, Д-28	Ваговий дозатор для подачі компонентів	6	Дозатор ваговий автоматичний шнековий обліковий ДВП-3У. Максимальна продуктивність, кг/хв: 30; похибка: 2 %; потужність, не більше: 1 кВт; габаритні розміри, мм: 650 x 780 x 1300 [49].
РЗ-10	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації композиції А	1	Реактор-змішувач об'ємом 10 літрів виготовлений компанією «Єврохіммаш». Він оснащений сорочкою та лопатевою мішалкою з наступними характеристиками: швидкість обертання лопатевої мішалки: 100 обертів на хвилину; потужність двигуна: 0,75 кіловат; максимальна температура: 250 °С; габаритні розміри: 420 x 350 x 450 мм [50].
РЗ-12	Реактор-змішувач для приготування композиції Б	1	Реактор-змішувач об'ємом СЕон 10 л. Виробник «Єврохіммаш». Оснащений сорочкою, лопатевою мішалкою: 100 об/хв; потужність двигуна, кВт: 0,75; макс. температура: 250 °С; габаритні розміри, мм: 420 x 350 x 450 [50].
І-13	Інокулятор	1	Інокулятор Biostat® Cplus об'ємом 30 л. Виробник: «Sartorius». Матеріал: нержавіюча сталь AISI 304; оснащений барботером, сорочкою, датчиком рН, рО ₂ , температури; пробовідбірником, манометром; турбінною мішалкою: 200 об/хв; максимальний допустимий тиск: 6 бар; габаритні розміри, мм: 750 x 1000 x 1900[51].
Д-14, Д-19, Д-25, Д-29	Об'ємний дозатор для подачі води	4	Електронний проточний дозатор, вироблений компанією «mBev», призначений для точного відмірювання води. Він має наступні характеристики: мінімальний крок дозування: 0,1 літр; максимальне дозування: 9999 літрів; похибка дозування: ±2-5%; робочий тиск: 0-1,5 МПа [52].
РЗ-16	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації композиції А	1	Реактор-змішувач СЕон об'ємом 63 л. Виробник «Єврохіммаш». Оснащений сорочкою, лопатевою мішалкою: 100 об/хв; потужність двигуна, кВт: 0,75; макс. температура: 250 °С; габаритні розміри, мм: 1000 x 930 x 2600 [50].

Н-17	Насос відцентровий для перекачування композиції А від РЗ-16 до І-24	1	Насос відцентровий Wetron. Виробник: Китай. Матеріал корпусу: чавун. Потужність – до 0,75 кВт, частота обертання 2900 об/хв (холостий хід), продуктивність $Q_{max} = 200$ л/год [53].
РЗ-20	Реактор-змішувач для приготування композиції Б	1	Реактор-змішувач об'ємом 100 літрів виготовлений компанією «Єврохіммаш». Цей реактор-змішувач оснащений сорочкою та лопатевою мішалкою зі швидкістю обертання 100 обертів на хвилину. Потужність двигуна складає 0,75 кіловат. Максимальна температура, яку він може витримати, становить 250 °С. Габаритні розміри реактора-змішувача складають 1000 x 930 x 2800 мм [50].
Н-21	Насос відцентровий для перекачування композиції Б від РЗ-20 до І-25	1	Відцентровий насос SPRUT GPD 25/4S-180. Виробник «Storgom». Потужність: 62 Вт. Максимальна температура: 110 °С. Продуктивність: 3000 л/год [54].
І-23	Інокулятор	1	Інокулятор DIN-AE об'ємом 250 л, вироблений компанією Pfaudler з Німеччини, є пристроєм, який використовується для введення посівного матеріалу у ферментери або реактори для проведення мікробіологічних процесів. Основні характеристики цього інокулятора включають: матеріал: нержавіюча сталь 304; оснащення: барботер, сорочка, датчики рН, рО ₂ , температури, пробовідбірник, манометр; турбінна мішалка: 320 об/хв; максимальний допустимий тиск: 6 бар; габаритні розміри: 800x2810 мм [55]
РЗ-26	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації композиції А	1	Реактор-змішувач об'ємом СЕон 630 л. Виробник «Єврохіммаш». Оснащений сорочкою, лопатевою мішалкою: 100 об/хв; потужність двигуна, кВт: 2,2; макс. температура: 250 °С; габаритні розміри, мм: 1380 x 1380 x 2770 [50].
Н-27	Насос відцентровий для перекачування композиції А від РЗ-26 до ФР-35	1	Відцентровий насос VODOMET JET100, СРМ158. Виробник: Словенія. Матеріал: нержавіюча сталь AISI 304. Продуктивність, до: 6,6 м ³ /год; відносний тиск, бар: 4; потужність: 1,1 кВт; максимальна температура: 135 °С [56].
РЗ-30	Реактор-змішувач для приготування композиції Б	1	Реактор-змішувач СЕон об'ємом 1 м ³ . Виробник «Єврохіммаш». Оснащений сорочкою, лопатевою мішалкою: 100 об/хв; потужність двигуна, кВт: 2,2; макс. температура: 250 °С; габаритні розміри, мм: 1410 x 1410 x 3470 [50].

Закінчення табл. 6.1

Н-31	Насос відцентровий для перекачування композиції Б від РЗ-30 до ФР-35	1	Відцентровий насос SPRUT GPD 25/4S-180. Виробник «Storgom». Потужність: 62 Вт. Максимальна температура: 110 °С. Продуктивність: 3000 л/год [54].
РЗ-32, РЗ-33	Реактори-змішувачі для підготовки 6 %-их розчинів титрувальних агентів	2	Реактор-змішувач серії А2000 об'ємом 5 літрів виробництва компанії «Amag Equipments» з Індії. Цей реактор-змішувач оснащений сорочкою та турбінною мішалкою зі швидкістю обертання в діапазоні від 100 до 1450 обертів на хвилину. Максимальна температура, яку цей реактор-змішувач може витримати, становить 300 °С. Габаритні розміри реактора-змішувача (з контрольною панеллю) складають 410 x 1100 міліметрів [57].
ФР-35	Ферментер	1	Ферментер DIN-BE об'ємом 2,5 м ³ виробництва компанії «Pfaudler» з Німеччини. Цей ферментер виготовлений з нержавіючої сталі 304 і оснащений барботером, сорочкою та датчиками для вимірювання рН, рО ₂ та температури. Він також має пробовідбірник і манометр. У ферментері встановлена турбінна мішалка зі швидкістю обертання 320 обертів на хвилину. Максимальний допустимий тиск для цього ферментера становить 6 бар. Габаритні розміри ферментера складають 1700 x 4050 міліметрів [58].
Н-36	Насос відцентровий для перекачування культуральної рідини від ФР-35 у збірник	1	Відцентровий насос СТІ АА. Виробник: «Garflo». Матеріал корпусу: нержавіюча сталь AISI 316L. Максимальна температура: 90 °С. Максимальний тиск, бар: 6. Продуктивність, до: 12 м ³ /год [59].

РОЗДІЛ 7. ВИРОБНИЦТВО ОКСИТЕТРАЦИКЛІНУ. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

Технологічна схема біосинтезу окситетрацикліну *Streptomyces rimosus* DSMZ 41439 складається з допоміжних робіт і основного технологічного процесу. Допоміжні роботи включають підготовку стерильного аераційного повітря, приготування титрувальних розчинів хлоридної кислоти та гідроксиду натрію, приготування і стерилізацію підживлювального розчину глюкози, приготування, підготовку і стерилізацію поживних середовищ. Основний технологічний процес включає підготовку посівного матеріалу та виробничий біосинтез.

Технологічну та апаратурну схеми біосинтезу окситетрацикліну наведено у графічній частині проекту.

ДР 1. Аераційне повітря. Його підготовка

ДР 1.1. Забір атмосферного повітря

Для забору атмосферного повітря використовується спеціальний пристрій, який називається повітрозабірником. (ПЗ-1) з найвищої точки, яка знаходиться на висоті 10 метрів. Це може бути реалізовано на будівлі з одним поверхом, де висота поверху становить 6 метрів, а також є наявність косога даху з висотою близько 3-4 метри. Обладнання для стиснення та очищення повітря розташовують на цій висоті для забезпечення забору повітря з найвищого рівня.

ДР 1.2. Очистка повітря від грубих часток

Попереднє очищення повітря здійснюється за допомогою фільтра (Ф-2), який забезпечує ступінь очищення до 90%. Цей фільтр затримує частинки з діаметром 50 мікрометрів, допомагаючи покращити якість повітря перед подальшою обробкою.

					НУХТ БТЕК 04.03.36 КР ПЗ			
Зм	Арк.	№ доку-	Під-	Ла	РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИ- ЦТВА ОКСИТЕТРА	Ліме-	Ар-	Арквщів
Розроб-	Афлатарплі						56	964
Керівник	Ворониов					Кафедра БТМ		
Н. контр								
Кон-								
Зав.	Стабніков							

ДР 1.3. Стиснення повітря

Стискання повітря виконується за допомогою компресора (К-3). Це необхідно для забезпечення аерації процесу та подолання гідравлічного тиску, що створюється стовпом рідини у ферментері. Умови процесу стискання повітря включають тиск на рівні 0,35 МПа та температуру до 250°C.

ДР 1.4. Видалення зайвої вологи і охолодження повітря

Стиснене повітря, яке утворюється під час компресування, направляється до теплообмінника-охолоджувача (Т-4), де воно охолоджується до температури 25-30°C. Після цього зайву вологу видаляють за допомогою ресивера (Р-5), де також усувається пульсація руху повітря. На цьому етапі показник вологості зменшується до 60%. Такі дії дозволяють підготувати стиснене повітря для подальшого використання у технологічному процесі з необхідними параметрами.

ДР 1.5. Нагрівання повітря

Охоложене повітря, яке отримане після проходження теплообмінника-охолоджувача, направляється до теплообмінника-нагрівача (Т-6), де його нагрівають до температури 45-50°C. На цьому етапі показник вологості додатково зменшується до 50%. Такі дії дозволяють отримати повітря з необхідною температурою та вологості для подальшого використання у технологічному процесі.

ДР 1.6. Очищення повітря у головному фільтрі

Нагріте повітря, після проходження теплообмінника-нагрівача (від ДР 1.5), направляється до головного фільтра очистки (Ф-7), який розташований біля ферментаційних відділень. На цьому етапі проводиться високоякісна очистка повітря, і ступінь очищення досягає 95%. Це допомагає забезпечити чистоту повітря, що використовується в технологічному процесі ферментації.

ДР 1.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

Повітря (від ДР 1.6) через трубопроводи подається безпосередньо в індивідуальні фільтри (ІФ-8, ІФ-22, ІФ-34) кожного з біореакторів до ТП 4.5, ТП 4.6, ТП 5.1. Ступінь кінцевої очистки повітря = 99,999% та КУО < 1.

ДР 2. Титрувальні розчинни. Приготування

ДР 2.1. Приготування 6%-го розчину хлоридної кислоти

ДР 2.1.1. Приготування 6%-го розчину HCl для підкислення середовища

Аби приготувати 3,22 л 6%-го розчину хлоридної кислоти у реактор-змішувач (РЗ-32) об'ємом 5 л подають за допомогою лічильника 2,7 л питної води і вносять за допомогою мірного циліндра на 500мл при постійному перемішуванні 522 мл 37%-ого розчину HCl.

ДР 2.2. Стерилізація і приготування 6%-го розчину гідроксид натрію

ДР 2.2.1. Стерилізація і приготування 6%-го розчину NaOH для підлужнення поживного середовища

Для приготування 29 мл 6%-го розчину натрію гідроксид на технічних вагах зважують 1,74 г кристалчного їдкого натру. Наважку помішають у колбу на 50 мл і за допомогою мірного циліндра на 50 мл додають 29 мл питної води, перемішують до повного розчинення, закривають ватно-марливою пробкою. Стерилізують в автокльві при 131 °С (0,15 МПа) 40 хв.

ДР 2.2.2. Стерилізація і приготування 6%-го розчину гідроксид натрію для підлужнення поживного середовища у посівному апараті об'ємом 250 л

З метою підготовки 290 мл 6%-го розчину NaOH на технічних вагах зважують 17,4 г кристалчного їдкого натру. Наважку помішають у колбу об'ємом 500 мл. За допомогою мірного циліндра об'ємом 500 мл додають 290 мл питної води до колби. Потім перемішують до повного розчинення і закривають ватно-марлевою пробкою. Отриману суміш стерилізують в автокльві при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 2.2.3. Стерилізація і приготування і 6%-го розчину NaOH для підлужнення поживного середовища у посівному апараті об'ємом 2,5 м³

Для підготовки 2,9 л 6%-го розчину натрію гідроксид на технічних вагах зважують 174 г кристалчного їдкого натру. Наважку поміщають у реактор-змішувач (РЗ-33) об'ємом 5 л. Потім за допомогою лічильника додають 2,9 л питної води. Отриману суміш стерилізують у 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 інокуляту в колбах на качалках.

Для приготування середовища з метою вирощування посівного матеріалу у колбах на качалках необхідно використати такі кількості компонентів, як вказано в Таблиці 5.6 розділу 5. Розрахунки були заокруглені для практичної зручності.

ДР 3.1.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних терезах зважують 45 г глюкози, 6,5 г дріжджового екстракту. Наважки помішають у колбу об'ємом 1 л, доливають питну воду (0,551 л), перемішують, закривають ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві при 112 °С (0,05 МПа) протягом 30 хв.

ДР 3.1.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних терезах зважують 3,9 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2,6 г KH_2PO_4 , 1,3 г K_2HPO_4 . Наважки поміщають у колбу об'ємом 1 л. Додають 0,59 л питної води і перемішують. Після цього колбу закривають ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві протягом 40 хв при температурі 131 °С і тиску 0.15 МПа.

ДР 3.1.3. Приготування і стерилізація композиції В

0.65 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ зважують на технічних терезах. Потім цю наважку поміщають у колбу об'ємом 250 мл. Додають 0,1 л питної води і перемішують. Після цього колбу закривають ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві протягом 40 хв при температурі 131 °С і тиску 0,15 МПа.

ДР 3.1.4. Змішування композицій А, Б і В

У колбу об'ємом 2 л в асептичних умовах зливають простерилізовані композиції А (від ДР 3.1.1), Б (від ДР 3.1.2) і В (від ДР 3.1.3). після завершення процесу здійснюють мікробіологічний контроль.

ДР 3.2. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту у посівному апараті об'ємом 30 л.

Для вирощування інокуляту потрібно 13,6 л поживного середовища. З цього об'єму, 10% (1400 мл) буде посівним матеріалом, а ще 10% - це краплинос під час стерилізації поживного середовища в інокуляторі, що становить загальну кількість 1,36 л.

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі на 30 л наведений у табл. 5.7 (розділ 5). Дані розрахунків заокруглено для практичної зручності.

ДР 3.2.1. Приготування і стерилізація композиції А

На ваговому дозаторі (Д-9) зважують 450 г глюкози, 65 г дріжджового екстракту. Наважки переносять у реактор-змішувач на 10 л (РЗ-10), додають через лічильник 4,6 л води питної. Після включення перемішуючого пристрою, до сорочки реактора подають пару для досягнення температури 40°C, що сприятиме кращому розчиненню компонентів. Отриманий розчин подають самоплинном у попередньо простерилізований інокулятор (І-13) об'ємом 30 л. Додають 6%-й розчин НСІ (від ДР 2.1.1) до досягнення рН 4,0-4,5. Після цього проводять стерилізацію при температурі 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хвилин.

ДР 3.2.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На ваговому дозаторі (Д-11) зважують 39 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 26 г KH_2PO_4 , 13 г K_2HPO_4 , 6,5 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Наважки поміщають у реактор-змішувач (РЗ-12) об'ємом 10 л, додають через лічильник питну воду (6,97 л) та вмикають перемішуючий пристрій. Для кращого розчинення компонентів у сорочку реактора дають пару, щоб досягти температури у реакторі на рівні 40°C. Отриманий розчин подають самоплинном у попередньо простерилізований інокулятор (І-13) об'ємом 30 л, подають 6 %-ий розчин НСІ (від ДР 2.1.1) до досягнення рН 4,0-4,5 і стерилізують 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.

Для вирощування інокуляту потрібно 136 л поживного середовища (10 % від об'єму поживного середовища – це посівний матеріал (14 л), а також 10% складе краплевинос, який утвориться при стерилізації поживного середовища в інокуляторі – сумарно 13,6 л).

Розрахунок потрібних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу у колбах на качалках наведений у табл. 5.8 (розділ 5). Дані розрахунків заокруглено для практичної зручності.

ДР 3.3.1. Приготування і стерилізація композиції А

На ваговому дозатор (Д-15) зважують 4495 г глюкози, 650 г дріжджового екстракту. Наважки переносять у реактор-змішувач на 63 л (РЗ-16), додають через об'ємний дозатор (Д-14) 47 л води питної, вмикають перемішувачий пристрій і стерилізують при 112 °С (0,05 МПа) протягом 30 хв. Отриманий простерилізований розчин перекачують відцентровим насосом (Н-17) у попередньо простерилізований інокулятор (І-25) об'ємом 250 л.

ДР 3.3.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На ваговому дозаторі (Д-18) зважують 390 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 260 г KH_2PO_4 , 130 г K_2HPO_4 , 65 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Наважки помішають у реактор-змішувач (РЗ-20) об'ємом 100 л. Для отримання розчину в реакторі додають питну воду (69,66 л) через об'ємний дозатор (Д-19) та вмикають перемішувачий пристрій. Пару подають для покращення розчинення компонентів у сорочці реактора, з метою досягнення температури 40°C. Отриманий розчин перекачують відцентровим насосом (Н-21) у попередньо простерилізований інокулятор (І-25) об'ємом 250 л. Додають 6%-ний розчин HCl (з ДР 2.1.1) до досягнення рН 4,0-4,5 і проводять стерилізацію при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хвилин.

ДР 3.4. Приготування і стерилізація поживного середовища для ферментера об'ємом 2,5 м³.

Для вирощування інокуляту потрібно 1,36 м³ поживного середовища (10 % від об'єму поживного середовища – це є посівний матеріал (140 л), а

також 10% складає конденсат, що утворюється при стерилізації поживного середовища в інокуляторі – сумарно 136 л).

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу у колбах на качалках наведений у табл. 5.9 (розділ 5). Дані розрахунків заокруглено для практичної зручності.

ДР 3.4.1. Приготування і стерилізація композиції А

На ваговому дозаторі (Д-24) зважують 44,95 кг глюкози, 6,5 кг дріжджового екстракту. Наважки переносять у реактор-змішувач на 630 л (РЗ-26), додають через об'ємний дозатор (Д-25) 470 л води питної, вмикають перемішувач і стерилізують при 112 °С (0,05 МПа) протягом 30 хв. Отриманий простерилізований розчин перекачують відцентровим насосом (Н-29) у попередньо простерилізований ферментер (ФР-41) об'ємом 2,5 м³.

ДР 3.4.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На ваговому дозаторі (Д-28) зважують 3,9 г (NH₄)₂SO₄, 2,6 г КН₂РО₄, 1,3 г К₂НРО₄, 650 г MgSO₄ · 7H₂O. Наважки поміщають у реактор-змішувач (РЗ-30) об'ємом 1 м³. Через об'ємний дозатор (Д-29) додають питну воду в обсязі 750 літрів, після чого вмикають перемішувач. Для поліпшення розчинення компонентів у сорочці реактора подають пар, щоб досягти температури 40°С. Отриманий розчин перекачують відцентровим насосом (Н-31) у попередньо простерилізований ферментер (ФР-35) об'ємом 2,5 м³. До розчину в ферментері додають 6%-й розчин НСl (від ДР 2.1.1) з РЗ-32, поки не досягнуть рН в діапазоні 4,0-4,5. Після цього проводять стерилізацію при температурі 131°С (0,15 МПа) протягом 40 хвилин.

ТП 4. Підготовка посівного матеріалу

ТП 4.1. Підтримання колекційної культури

Колекційну культуру *Streptomyces rimosus* DSMZ 41439 зберігають у пробірці на скошеному шільному агаризованному середовищі (2 – 4 °С), яке містить мальтозо-глюкозний агар із дріжджовим екстрактом [4]. Для підтримки культури у життєздатному стані, проводять пересіви на свіже поживне

середовище 3-4 рази на місяць. Дотримання правил асептики є важливим аспектом при всіх роботах з колекційними культурами. Це допомагає запобігти забрудненню та зберегти чистоту культури, забезпечуючи оптимальні умови для росту і розмноження мікроорганізмів.

ТП 4.2. Одержання робочої культури

Колекційну культуру *S. rimosus* DSMZ 41439 розсівають на чашки Петрі із мальтозо-глюкозним агаром із дріжджовим екстрактом щоб отримати ізольованні колонії. Вирощують у термостаті при температурі 28 °С [17] (48 год).

ТП 4.3. Вирощування інокуляту у пробірках на агаризованих середовищах

Отриманні ізольовані колонії *S. rimosus* DSMZ 41439 з чашок Петрі (від ТП 5.2) пересівають петлею у пробірки зі скошеним мальтозо-глюкозним агаром із дріжджовим екстрактом. Для засіву однієї пробірки використовується одна ізольована колонія, які знаходяться на відстанні не менше 1 см одна відодної. Вирощування проводять протягом 48 годин при температурі 28 °С. Кожні 4 години з пробірок віддбирають проби для проведення мікробіологічного контролю.

ТП 4.4. Вирощування інокуляту в колбах на качалках

В асептичних умовах у колбу об'ємом 2 л зливають стерильну композицію А (від ДР 3.1.1) вносять простерилізовану композицію Б (від ДР 3.1.2), вносять простерилізовану композицію В (від ДР 3.1.3) перемішують і розливають по 150 мл у 9 стерильних качалочних колб об'ємом 750 мл.

У пробірку з робочою культурою *S. rimosus* DSMZ 41439 (від ТП 4.3) додають 5 мл фізіологічного розчину і перемішують, щоб розподілити клітини. Стерильною піпеткою відбирають отриману суспензію бактерій і вносять її у качалочні колби з поживним середовищем. Для засіву однієї колби використовують актиноміцетну суспензію, яка була отримана з однієї пробірки.

Культивують на качалках (200 об/хв) при температурі 28 °С упродовж 54 год, рН 6,8-7,0. Після завершення процесу культивування визначають концентрацію біомаси, яка повинна становити 3,8 – 4,0 г/л, і здійснюють мікробіологічний контроль. Після проведення мікробіологічного контролю культуралну рідину зливають у засівну колбу об'ємом 2 л.

ТП 4.5. Вирощування в інокуляторі об'ємом 30 л

В інокулятор (І-13) із простерилізованою композицією Б (від ДР 3.2.2), самоплином подають композицію А (від ДР 3.2.1), вмикають перемішуючий пристрій, подають 6%-ий розчин NaOH (від ДР 2.2.1) до досягнення рН середовища за показником датчика рН до 6,8-7,0. Через засівну колбу вносять посівний матеріал (від ТП 4.4). Культивують при температурі 28 °С і концентрації розчиненого кисню ($pO_2 = 20 - 30$ % від насичення повітря) упродовж 54 год. Підтримання pO_2 на заданому рівні здійснюють регулюванням швидкості перемішування і рівня аерації (витрати стерильного аераційного повітря).

Кожні 4 год із інокулятора беруть проби культуральної рідини для проведення мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси, що має становити 3,8 – 4,0 г/л.

ТП 4.6. Вирощування в інокуляторі об'ємом 250 л

У посівний апарат (І-23) із простерилізованою композицією Б (від ДР 3.3.2), відцентровим насосом (Н-21) від реактора-змішувача (РЗ-20) подають композицію А (від ДР 3.3.1), вмикають перемішуючий пристрій, подають самоплином 6%-й розчин NaOH (від ДР 2.2.2) рН середовища за показником датчика рН до 6,8-7,0. Самоплином подають посівний матеріал від І-13 (від ТП 4.5). Культивують при температурі 28 °С і концентрації розчиненого кисню ($pO_2 = 20 - 30$ % від насичення повітря) упродовж 54 год. Підтримання pO_2 на заданому рівні здійснюють регулюванням швидкості перемішування і рівня аерації (витрати стерильного аераційного повітря).

Кожні 4 год з інокулятора відбирають проби культуральної рідини для проведення мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси, яка повинна становити 3,8 – 4,0 г/л.

ТП 5. Виробничий біосинтез

ТП 5.1. Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 2,5 м³

У виробничий ферментер (ФР-35) об'ємом 2,5 м³ із простерилізованою композицією Б (від ДР. 3.4.2) відцентровим насосом (Н-31) від реактора-змішувача (РЗ-30) подають композицію А (від ДР 3.4.1), вмикають перемішуючий пристрій, подають від реактора-змішувача (РЗ-33) самоплином 6%-ий розчин NaOH (від ДР 2.2.3) рН середовища за показником датчика рН до 6,8-7,0. Через трубу перетискування подають з інокулятора (І-23) посівний матеріал (від ТП 3.6). Культивують при температурі 28 °С і концентрації розчиненого кисню ($pO_2 = 20 - 30 \%$ від насичення повітря) упродовж 108 год. Підтримання pO_2 на заданому рівні здійснюють регулюванням швидкості перемішування і рівня аерації (витрати стерильного аераційного повітря).

Кожні 4 год із ферментера відбирають проби культуральної рідини для проведення мікробіологічного контролю, визначення концентрації біомаси (7,6 – 8,0 г/л) та концентрації окситетрацикліну (1412 мг/л). По накопиченню окситетрацикліну (1412 мг/л) процес біосинтезу закінчується.

По закінченню процесу біосинтезу культуральну рідину перекачують відцентровим насосом (Н-36) у цех виділення цільового продукту.

РОЗДІЛ 8. ВИРОБНИЦТВО ОКСИТЕТРАЦИКЛІНУ. КОНТРОЛЬ ПРОЦЕСУ

Упродовж процесу культивування регулярно (4 години) з ферментера відбирають проби культуральної рідинни за допомогою пробовідбірника. Ці проби використовуються для проведення мікробіологічного контролю, оцінки стерильності поживного середовища, визначення концентрації біомаси і окситетрацикліну, а також вмісту джерела вуглецю (глюкози) і азоту (сульфату амонію та дріжджового екстракту). Це дозволяє вести постійний контроль якості процесу культивування і вчасно виявляти будь-які відхилення або проблеми.

8.1. Мікробіологічний контроль

Мікробіологічний контроль стерильності поживних середовищ. Для мікробіологічного контролю стерильності поживних середовищ проводиться розсіванням проб простерилізованого поживного середовища на чашки Петрі з відповідним агаризованими поживними середовищем. Для виявлення грибів і дріждів використовуємо сусло-агар (СА), а щоб виявити бактерій – м'ясо-пептонний агар (МПА).

Приготування чашок Петрі. У завчасно простерилізовані в сухожаровій шафі чашки Петрі розливають по 20-30 мл розплавленого на кипляльчій водній бані поживне середовище. Чашки кладуть на рівні поверхні для рівномірного застигання агару, залишають і витримують протягом 2-3 днів за температури 30 °С кришками вниз.

Посіви проводять шляхом відбору стерильною піпеткою 0.1 мл з об'єма проби простерилізованого поживного середовища і нанесення її на поверхню відповідного поживного середовища. Внесину пробу рівно розподіляють по поверхні середовища із поміччю простерилізованого шпателя Дригальського. Чашки з посівами загортають у папір і поміщають у термостат для інкубації при температурі 32-34 °С протягом 1-2 діб для МПА та при

					НУХТ БТЕК 04.03.36 КР ПЗ		
Зм	Арк	№ докв-	Під-	Ла			
Розроб-	Афпатангі				Піме-	Ап-	Аркумів
Керівник	Ворониов				68	96	04
Н. контр					Кафедра БТМ		
Кон-							
Зав.	Стабніков						

температурі 24-26 °С протягом 3-5 діб для СА [60].

Мікробіологічний контроль чистоти культури. Мікробіологічний контроль здійснюється двома шляхами: прямий висів на агаризовані поживні середовища і мікроскопіювання.

Прямий висів роблять посівом культуральної рідини до ізолованих колоній на чашки Петрі з м'ясо–пептоним агаром (МПА) для проявлення бактерій, і глюкозо– картопляним агаром (ГКА) або сусло–агаром (СА) – грибів та дріжджів. Для перевірки росту *Streptomyces rimosus* культуральну рідину також висівають на середовище Мурасіге-Скуга (MS medium), на якому для даного виду характерне утворення спорового ланцюга у вигляді спірил, який переходить у білий повітряний міцелій (рис. 8.1) [15].



Рис. 8.1.Ріст *S. rimosus* на агаризованих середовищ [15]

Мікроскопіювання проводиться в світлому мікроскопі з імерсійною системою. Для приготування припарату на чисте знежрене предметне скло, в асептичних умовах, із допомогою стерильної петлі наносять невелику краплину культуральної рідини. Краплю розподіляють по склу за допомогою бактеріальної петлі, створюючи мазок діаметром близько 1 см. Мазок сушать при кімнатній температурі до повного випаровування вологи без допомоги нагрівання. Потім на повністю сухий препарат вносять 1-2 краплини імерсійного масла скляною паличкою. По завершенні роботи ваткою, яка є змочена етиловим спиртом, знімають залишки масла з імерсійного об'єктива. Під час мікрос-

копіювання, якщо у зразку відсутня стороння мікробіота, можна побачити клітини *S. rimosus* (рис. 8.2).

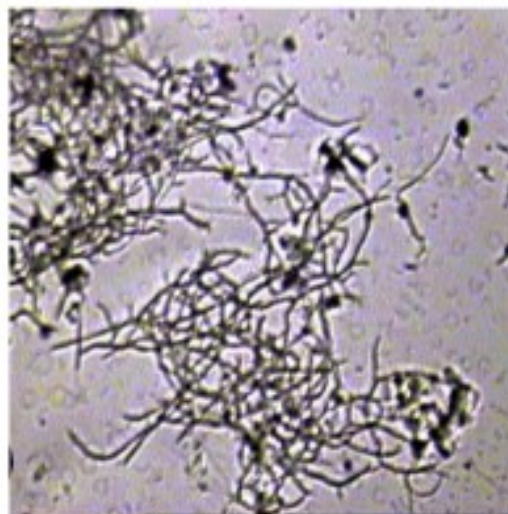


Рис 8.2. Мікроскопічне спостереження. S. rimosus під світловим мікроскопом (1000X) [16]

8.2. Ріст і синтез цільового продукту. Основні показники

8.2.1. Концентрація біомаси

Концентрацію біомаси визначали ваговим методом. 20 мл культуральної рідини відбирали із колб або біореакторів та збирали в попередньо зважену центрифужну пробірку загальною об'ємом 50 мл (Falcon, США). Зразки центрифугували при 5°C за швидкості центрифугування 5000 об/хв протягом 15 хв. Супернатант використовували для визначення концентрації глюкози, Нітрогену та окситетрацикліну. Відділену біомасу двічі промивали дистильованою водою, центрифугували і промиті клітини сушили у вакуумній шафі при 40°C протягом 24 год і потім використовували для визначення сухої маси клітин, шляхом зважування [4].

8.2.2. Активність окситетрацикліну

Активність окситетрацикліну кількісно визначали за допомогою методу дифузії на агар [7]. Основою методу є здатність окситетрацикліну дифундувати в агар та інгібувати ріст тест-штаму *Bacillus subtilis* NRRL-B543.

Матеріали та обладнання

1 Тест-культура. Відбирають 3–5 ізольованих колоній зі схожою морфологією діаметром не менше 1 мм, вирощених на SDA впродовж 24–48 год.

2 Живильні середовища та реактиви.

2.1 Модифікований агар Мюллера - Хінтон ;

2.2 Стерильний фізіологічний розчин натрію хлориду (0,85 -0,9 %);

2.3 Стерильна дистильована вода ;

3 Обладнання та посуд :

3.1 Мікробіологічні петлі, 0,001 мл;

3.2 Стерильні пробірки;

3.3 Стерильні чашки Петрі;

3.4 Стерильні серологічні піпетки (1,0 мл, 5,0 мл та 10,0 мл) ;

3.5 Дозатор для серологічних піпеток;

3.6 Мікродозатори фіксованого та змінного об'єму зі стерильними одноразовими накінецьниками;

3.7 Спектрофотометр;

3.8 Вортекс - шейкер;

3.9 Термостат, 35 ° С;

3.10 Штангенциркуль або кронциркуль;

3.11 Металевий пробійник;

3.12 Диска - дозаторний пристрій або стерильний пінцет.

4 Диски з промисловим антибіотиком для побудови калібрувального графіку.

Хід роботи

1 Підготовка чашок Петрі

1.1 В стерильні чашки Петрі та пробірки внести фіксований об'єм (16 мл) розплавленого модифікованого агару Мюллера-Хінтон (МХ) та в пробірку – 4,5 мл.

1.2 Чашки Петрі витримують в термостаті впродовж 24 год при 35 °С для перевірки стерильності.

2 Приготування інокуляту

2.1 Висіяти тест-культуру на МХ для отримання ізольованих колоній. Інкубувати 18–24 год при 37 °С;

2.2 Обрати 3-5 колоній з однаковою морфологією, які за допомогою стерильної петлі перенести в пробірку з 5,0 мл стерильного фізіологічного розчину;

2.3 Перемішати на вортексі 15–20 с ;

2.4 Виміряти коефіцієнт пропускання суспензії при довжині хвилі $\lambda = 530$ нм на спектрофотометрі. Коефіцієнт пропускання $T(\%)=85$ % відповідність інокуляту $1 \times 10^6 - 5 \times 10^6$ клітин/мл ;

2.5 Приготований інокулят використано продовж 15–30 хв.

3 Інокуляція живильного середовища

3.1 В пробірку з розплавленим та охолодженим до 37– 40 °С живильним середовищем внести інокулят (1 частина інокуляту : 9 частина середовища). Вміст пробірки перемішати на вортексі, вилити на поверхню агару в чашці Петрі, рівномірно розділити по поверхні та зачекати до застигання.

4 Визначення концентрації антибіотика

4.1 Метод дифузії в агар

4.1.1 Простерилізованим та охолодженим пробійником зробити лунки у товщі агару, відстань між центрами лунок повинна бути не менше 24 мм. В лунки внести зразки супернатанту отриманого у п. 4.2.1, чашки залишити при кімнатній температурі на 2 год для дифузії зразка;

4.2.2 Чашки витримати у термостаті при 35 °С протягом 24–48 год.

5 Результати

5.1 Визначення діаметрів зон затримки росту

5.1.1 Результати реєструють через 24 год, якщо ріст є незадовільним - через 48 год. Газон тест-культури повинен бути суцільним, однакової щільності на всій поверхні чашки Петрі, отримані зони затримки росту мають бути рівномірно круглими;

5.1.2 Чашки у перевернутому положенні поміщають на темну матову поверхню. Реєстрацію результатів проводять у відбитому світлі. При вимі-

рюванні зон затримки росту потрібно орієнтуватись на зону повного пригнічення видимого росту, діаметр зон вимірюють з точністю до 1,0 мм. Бажано користуватись для цього штангенциркулем або кронциркулем;

5.1.3 При реєстрації результатів не слід звертати уваги на окремі мікроколонії на краю зони або в її межах;

Діаметр зони інгібування перетворювали в концентрацію окситетрацикліну мг/л за допомогою стандартної біологічної кривої між логарифмом різних концентрацій антибіотиків і середніми діаметрами зони інгібування *B. subtilis* NRRL-B543. Калібрувальна крива будується за показниками отриманими відповідно до описаного вище способом [4, 61].

8.2.3. Визначення концентрації окситетрацикліну

Для кількісного визначення антибіотику відцентрифугований зразок культуральної рідини (супернатант) фільтрують через міліпористий фільтр 0,46 мкм і визначають рідинним хроматографом Shimadzu LC-5A (Shimadzu, Японія) з використанням колонки Lichrosphere 60 RP-Select B (5 мкм) з суміші метанолу, ацетонітрилу та щавлевої кислоти у співвідношенні 0,8:1,0:3,2 у рухомій фазі. Швидкість потоку становить 1 мл/хв, антибіотик виявляють за допомогою УФ-детектора SPD-2A (Shimadzu) при 350 нм, а концентрацію розраховували за допомогою інтегратора C-R6A (Shimadzu). Автентичний окситетрациклін використовується як стандарт в діапазоні від 1 до 1000 мкг/мл [62].

8.2.4. Джерела Карбону і Нітрогену. Їх концентрація

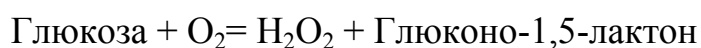
Концентрація джерела Карбону

Концентрацію глюкози в культуральній рідині вимірювали за допомогою аналізатора глюкози (Biochemical Analyzer 2700, Yellow Springs Instruments, OH, USA) [4].

YSI іммобілізує субстрат-специфічні ферменти між двома селективними, інтерферуючими мембранами і з'єднують мембранний компонент з платиновим електродом, що призводить до високоспецифічного вимірювання для даного субстрату.

Із ферментера відбирається проба культуральної рідини об'ємом 100 мл. Зразок добре перемішується та фільтрується через паперовий фільтр для відділення біомаси. З фільтрату відбирається 3 мл розчину, закріплюють фільтр з діаметром пор 0,22 мкм і дозують досліджуваний розчин у пробірки по 5 мл зразка. Зразок поміщують у пристрій і записують отриманий результат.

Ферментний зонд оснащений тришаровою мембраною, що містить іммобілізований фермент глюкозооксидази в середньому шарі. Лицьова частина зонда, вкрита мембраною, розташована в буферному зразковому модулі, куди інструмент вводить пробу глюкози. Глюкоза дифундує через першу мембрану. При контакті з іммобілізованою глюкозооксидазою вона швидко окислюється, утворюючи перекис водню (H_2O_2).



H_2O_2 , у свою чергу, проходить через внутрішню мембрану і окислюється на платиновому аноді, виробляючи електрони. Динамічна рівновага досягається тоді, коли швидкість вироблення H_2O_2 і швидкість, з якою H_2O_2 залишає іммобілізований ферментний шар, є постійними і позначаються стійкою реакцією. Потік електронів лінійно пропорційний стаціонарній концентрації H_2O_2 і, отже, концентрації субстрату. Все це відбувається за лічені секунди, в результаті чого цикл аналізу вибірки становить 60 секунд. Прилад наведено на *рис. 8.3* [63, 64].



Рис. 8.3. Біохімічний аналізатор YSI 2700 [64].

Визначення концентрації джерела Нітрогену

У складі поживного середовища два джерела Нітрогену – амоній сульфат та дріжджовий екстракт.

Вміст аміноного азоту у ферментаційному бульйоні визначали за методом формольного титрування Соренсона [65]. Метод формольного титрування Соренсона ґрунтується на взаємодії формальдегіду з вільними аміногрупами, що присутні в амінокислотах. Під час реакції формальдегід зв'язується з аміногрупою, утворюючи метиленову похідну амінокислоти. В результаті ці аміногрупи втрачають свої основні властивості. Вільні карбоксильні групи, що залишаються, титруються розчином лугу, зазвичай 0,1 М розчином гідроксиду натрію (NaOH). Луг реагує з карбоксильними групами, утворюючи солі кислотних груп, і змінюючи колір індикатора, що вказує на кінцеву точку титрування:



Аміногрупи при цьому втрачають основні властивості, а вільні карбоксильні групи відтитровують розчином лугу [66]:



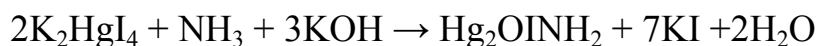
Необхідні матеріали:

- 0,1 М соляна кислота
- 0,1 М гідроксид натрію
- рН-метр
- Бюретка -2
- Стакан
- Мішалка

Пробопідготовка. Для аналізу необхідно отримати 20 мл відфільтрованої від біомаси культуральної рідини. Зважаючи на відбір зразку із біомасою безпосередньо із ферментера об'єм проби становитиме 30 мл. Відібрану пробу необхідно пропустити через нейлонний фільтр. Отриманий фільтрат використовується для визначення вмісту джерела азоту.

Хід роботи. 20 мл культурального фільтрату, вносять в чисту конічну колбу, додавали 5 мл НСНО і зберігали протягом 2 хв. Потім додавали кілька крапель індикатора фенолфталеїну та титрували додаючи 0,3 мл 0,1 М NaOH. Кінцевою точкою титрування є поява постійного блідо-рожевого кольору. Титрування повторювали для відповідних значень, і результати виражається в мг /мл [66, 67].

Вміст амонійного азоту визначається за допомогою колориметричному тесті, який базується на використанні реактиву Неслера [68]. У тесті на амонійний азот реагент Неслера (K_2HgI_4) реагує з аміаком, присутнім у зразку (у сильно лужних умовах) для отримання жовтого кольору. Інтенсивність кольору знаходиться в прямій залежності від концентрації аміаку [69].



Набір для визначення концентрації амонійного азоту MQuant містить тест-смужки, 2 пляшки реактиву Неслера та одну тестову посудину. Інші реагенти: стандарт іонної хроматографії амонію, 1000 ppm (EM-19812). Щоб забезпечити постійну високу якість тест-смужок MQuant®, Merck використовує сертифіковані стандартні рішення для налаштування та перевірки тестів і вірності еталонних кольорів. Ці стандартні розчини простежуються безпосередньо до первинних еталонних стандартів NIST і РТВ

Хід роботи. Реакційні зони змочують простим зануренням у досліджуваний розчин. Потім надлишок рідини струшують. Після закінчення заданого часу реакції (максимум дві хвилини) забарвлення зони реакції порівнюють з колірною шкалою на упаковці для визначення концентрації [70].

РОЗДІЛ 9. ЕКОЛОГІЗАЦІЇ ВИРОБНИЦТВА. АНАЛІЗ ПЕРСПЕКТИВ ВПРОВАДЖЕННЯ СИСТЕМИ

9.1. Рідкі відходів виробництва окситетрацикліна. Характеристика

9.1.1. Розрахунок об'ємів відходів

Візьмемо наприклад, що біотехнологічне виробництво окситетрацикліну проходить протягом 90 днів. Для того, щоб забезпечити чистоту виробництва, проводять щоденне прибирання, тобто 90 разів. Генеральне прибирання проводиться раз на місяць, тобто 3 рази. При обробці обладнання застосовують розчини миючих засобів «PUR-285» (2%) і «Ефір С-12» (1%), загальні об'єми яких за весь термін виробництва складають по 145,5 л кожен. З метою обробки стін, вікон та підлоги використовують робочі розчини таких засобів як «Контек ПроХлор» (3%), «Терралін протект U» (0,1%) і «Клінідез» (0,2%), об'ємні кількості яких складають 1570, 1570, і 1250 л відповідно.

Таблиця 9.1

Характеристика рідких відходів виробництва окситетрацикліну

Назва рідких відходів	Складові рідких відходів	Приблизний об'єм відходів на 1 цикл виробництва, л	Клас небезпеки
2% розчин «PUR-285»	Формальдегід; натрію гіпохлорид; лимона кислота; катіонні, аніонні, неіоногенні ПАР	145,5	II
1% розчин «Ефір С-12»	Гідроксид натрію – NaOH	145,5	II
3% розчин «Контек ПроХлор»	Формальдегід та глутаровий альдегід гліколевий ефір алкогольетоксилат, запашка, барвник і вода	1570	II
0,1% розчин «Терралін протект U»	Бензалконій хлорид, 2-дифенілетанол, третинні аміни, інгібітори корозії, ПАР і вода	1570	III
0,2% розчин «Клінідез»	Дихлорізоціанурова кислота, ПАР	1250	III
Загальний об'єм:		4681	

					НУХТ БТЕК 04.03.36 КР ПЗ			
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докв-</i>	<i>Під-</i>	<i>Ла</i>	РОЗДІЛ 9. АНАЛІЗ ПЕРСПЕКТИВ ВПРО- ВАДЖЕННЯ СИСТЕМИ	<i>Ліме-</i>	<i>Ар-</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розроб-</i>	<i>Адпатарли</i>						77	96
<i>Керівник</i>	<i>Ворониов</i>				Кафедра БТМ			
<i>Н. контр</i>								
<i>Кон-</i>								
<i>Зав.</i>	<i>Стабніков</i>							

9.1.2. Рідкі відходи та їх утилізація

Традиційні фізико-хімічні методи переробки стічних чи каналізаційних вод призводить до утворення значної кількості твердих відходів. Деяка частина їх накопичується вже в первинній стадії осадження, інші ж обумовлені приростом біомаси за рахунок біологічного окислення вуглецевмісних компонентів в стічних водах. Тверді відходи спочатку перебувають у вигляді різних суспензій із вмістом твердих компонентів від 1 до 10%. Через це процесам виділення, переробки нафти і ліквідації мулу стоків слід приділяти особливу увагу під час проектування і експлуатації будь-якого підприємства з переробки стічних вод.

У найзагальніших рисах його, технічні методи обробки мулу зводяться до досягнення певного ступеня зневоднення. Вибір процесу чи послідовності процесів у будь-якому технологічному ланцюжку утилізації мулу визначається способом про його ліквідацію, найпридатнішою конкретної виду мулу і слабким місця її переробки. Кожен тип мулу має різні властивості в процесах, як, наприклад, перекачування, хімічна обробка чи фільтрування. Тому "вибір способу переробки визначається переважно економічними показниками процесу, залежними від типу мулу [71].

9.2. Газоподібні відходи виробництва антибіотику. Характеристика

9.2.1. Розрахунок об'ємів відходів

Для проведення біотехнологічного виробництва окситетрацикліну має бути постійна безперервна подача стерильного аераційного повітря. Саме тому, на етапах підготовки посівного матеріалу в інокуляторах та виробничого біосинтезу антибіотику у ферментері, будуть утворюватися газоподібні повітряні відходи. Тривалість підготовки інокуляту складає 108 годин (6480 хвилин), а термін виробничого біосинтезу антибіотику – 108 годин (6480 хвилин). Безперервна подача кисню в апарати здійснюється зі швидкістю 1 л/л КР·хв. На проєктованому підприємстві встановлюють 2 інокулятори та 1 ферментер. Тому, приблизний об'єм відпрацьованого повітря складає: $30 \cdot 3240 + 250 \cdot 3240 + 2500 \cdot 6480 = 17\,107\,200$ л ($17,107$ м³).

9.2.2. Газоподібні відходи та їх утилізація

Газоподібні відходи біотехнологічного виробництва окситетрацикліну очищують за допомогою аерозольного фільтру. Повітряний потік, що піддається очищенню, по черзі проходить через дві секції 2 і 3 корпусу 1, в якій кожній герметично встановлені відповідні ступені грубого очищення 4 і 5 та ступені надтонкого очищення 6 і 7. Далі, після проходження цих секцій, очищений потік виходить із аерозольного фільтра. Щоб очистити повітряне середовище з більшим забрудненням і наявністю часток аерозолію великого розміру ступінь грубого очищення 4 і 5 кожної секції 2 і 3 виконаний із нетканого об'ємного фільтрувального матеріалу, який складається із поліестру. Спектр часток перед ступенем надтонкого очищення 6 і 7 кожної секції 2 і 3 включає переважно частинки субмікронного розміру. Для їхнього очищення ступені надтонкого очищення 6 і 7 виконані із гофрованого ультратонкого фільтрувального матеріалу, котрі складається із мікроскловолокна. Саме завдяки цьому ресурс роботи і пилоємність фільтра збільшуються. Результатом даного процесу є підвищення ефективності очищення потоку повітря, що є його важливою перевагою. Схематичне зображення обраного фільтру наведено на *рис. 9.2.*

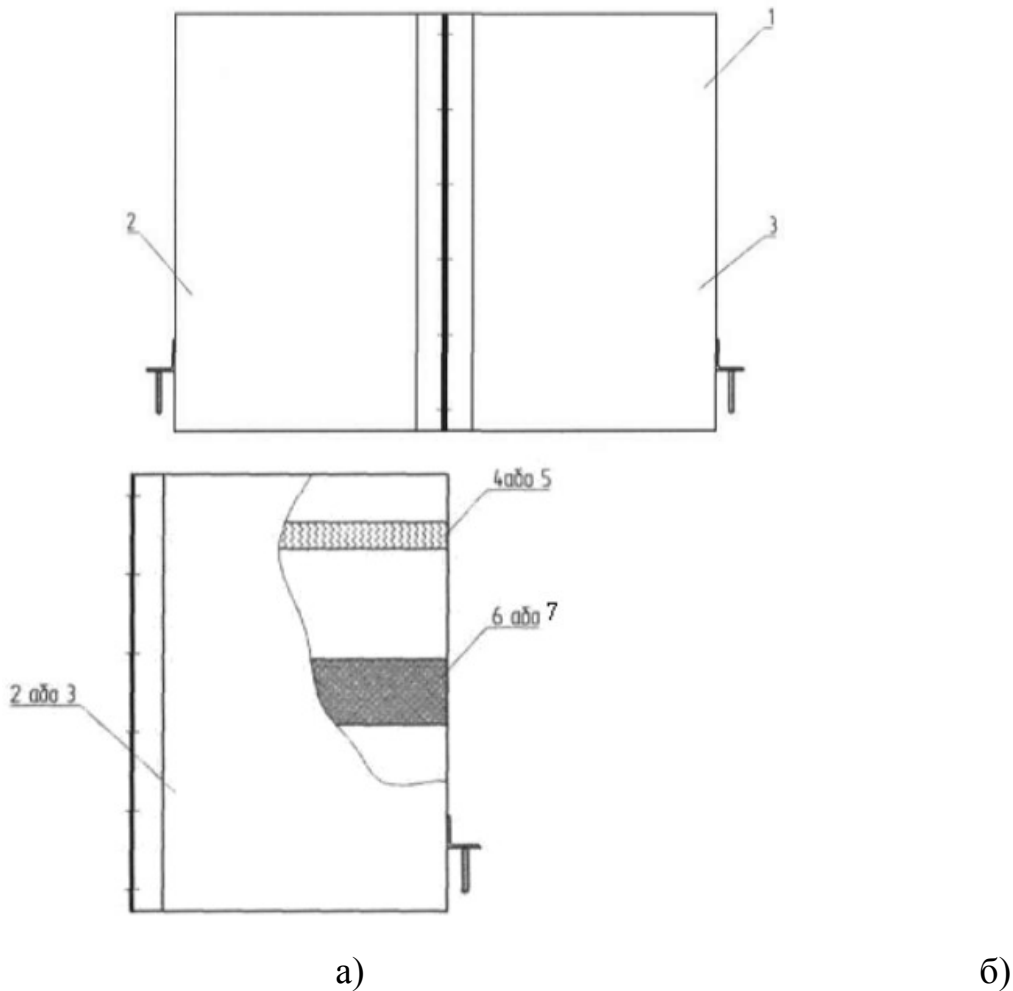


Рис. 9.1. Схематичне зображення фільтру аерозольного, що складається із двох секцій: загальний вигляд (а), одна із секцій корпусу (б) [72].

9.3. Тверді відходи виробництва та їх характеристика

9.3.1. Розрахунок об'ємів відходів

Твердими відходами на виробництві вважають пакувальні тари від мийних та дезінфікуючих розчинів, компоненти поживних середовищ для вирощування посівного матеріалу та виробничого біосинтезу. Для пакування компонентів поживного середовища застосовують полівінілхлорид – матеріал, який не перероблюють з іншими типами пластику. Каністри із поліпропілену, в яких знаходяться дезінфікуючі та миючі засоби, зазвичай піддаються вторинній переробці. Проте не всі такі каністри піддаються даній переробці. Виробники мають зазначати, що вторинне використання тари заборонено.

Характеристика твердих відходів виробництва антибіотику

Назва твердих відходів	Компоненти твердих відходів	Приблизний об'єм відходів на 1 цикл виробництва, кг	Клас небезпеки
Пакувальна тара для миючих на дезінфікувальних засобів	Поліпропілен, поліетилен	0,4	IV
Пакування для компонентів поживних середовищ	Поліпропілен, поліетилен, полівінілхлорид (PVC-3)	0,6	IV
	Загальний об'єм:	1	

3.3.2. Тверді відходи та їх утилізація

Біодеградація пластику організмами є одним з методів повної утилізації пластмас. Під час цього процесу організми використовують ферменти, які здатні розщеплювати хімічні зв'язки полімерних матеріалів. Розпад полімерного ланцюга відбувається за допомогою утворення дикетонних структур.

Однією з переваг біодеградації пластику є те, що такий процес не завдає значної шкоди навколишньому середовищу у вигляді побічних продуктів. У порівнянні з іншими методами переробки, які можуть призводити до забруднення атмосфери або накопичення отрутохімікатів, біодеградація пластику є більш екологічно безпечним варіантом [73].

РОЗДІЛ 10. НАУКОВОТЕХНІЧНОЇ ЛІТЕРАТУРИ ТА НОРМАТИВНО-ТЕХНІЧНОЇ ДОКУМЕНТАЦІЇ. АНАЛІЗ

1. ДСТУ EN 1262:2007 Речовини поверхнево-активні. Метод визначення рН розчинів чи дисперсій
2. ДСТУ ISO 4312:2005. Речовини поверхнево-активні. Оцінювання окремих видів дій під час прання. Методи аналізу та випробування чистого контрольного зразка бавовняної тканини
3. ДСТУ 2156-93. Безпечність промислових підприємств. Терміни та визначення
4. ДСТУ 4239:2003 Матеріали та вироби текстильні і шкіряні побутового призначення. Основні гігієнічні вимоги
5. ДСТУ ISO 14010-97 Керівні вказівки по здійсненню екологічного аудиту. Загальні принципи
6. ДСТУ ISO 14005:2015 Системи екологічного управління. Наставни щодо поетапного запровадження системи екологічного управління, використовуючи оцінювання екологічних характеристик
7. ДСТУ ISO 9000:2015 Системи управління якістю. Основні положення та словник термінів
8. ДСТУ ISO 14001:2015 Системи екологічного управління. Вимоги та настанови щодо застосовування
9. ДСТУ ISO 14004-97. Системи управління навколишнім середовищем. Загальні настанови щодо принципів управління, систем та засобів забезпечення.
10. ДСТУ ISO 14011-97. Наставни щодо здійснення екологічного аудиту. Процедури аудиту. Аудит систем управління навколишнім середовищем.

					НУХТ БТЕК 04.03.36 КР ПЗ			
<i>Зм</i>	<i>Арк</i>	<i>№ докв-</i>	<i>Під-</i>	<i>Ла</i>	РОЗДІЛ 10. АНАЛІЗ НОРМАТИВНО- ТЕХНІЧНОЇ ДОКУ-	<i>Ліме-</i>	<i>Ар-</i>	<i>Аркциф</i>
<i>Розроб-</i>	<i>Афпатарпл</i>	<i>Ворониов</i>				83	96	
<i>Н. контр</i>					Кафедра БТМ			
<i>Кон-</i>								
<i>Зав.</i>	<i>Стабніков</i>							

11. ДСП 9.9.5.-080-02. Правила влаштування і безпеки роботи в лабораторіях (відділах, відділеннях) мікробіологічного профілю.
12. Про стандартизацію і сертифікацію: Закон України від 10 трав. 1993 р. №46-93.
13. Державні реєстри дезінфекційних засобів за 2018-2021 р.р., зареєстрованих в Україні.

Список використаної літератури

1. Spagnolo F., Trujillo M., Dennehy J. J. Why do antibiotics exist? *Mbio*. 2021, 12 (6): e01966-21. doi: 10.1128/mBio.01966-21.
2. Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2001, 65 (2): 232-60. doi: 10.1128/MMBR.65.2.232-260.2001.
3. Окситетрациклін 200 LA. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://vetprod.ru/katalog/oxytetracyclin-200-invesa.html>.
4. Elsayed E.A., Omar H.G., El-Enshasy H.A. Development of Fed-Batch Cultivation Strategy for Efficient Oxytetracycline Production by *Streptomyces rimosus* at Semi-Industrial Scale. *Agriculture, Agribusiness and Biotechnology Braz. arch. biol. technol.* 2015, 58 (5): <https://doi.org/10.1590/S1516-89132015050184>.
5. Pickens L.B, Tang Y. Oxytetracycline Biosynthesis. *Journal of biological chemistry*. 2010, 285(36): 27509-27515.
6. Yin S., Wang X., Shi M., Yuan F., Wang H., Jia X., Sun J., Liu T., Yang K., Zhang Y., Fan K., Li Z. Improvement of oxytetracycline production mediated via cooperation of resistance genes in *Streptomyces rimosus*. *Science China Life Sciences volume*. 2017, 60: 992–999.
7. Lazim H.. Slama N.. Mankai H.,Barkallah I.. Limam F. .Enhancement of oxytetracycline production after gamma irradiation-induced mutagenesis of *Streptomyces rimosus* CN08 strain. *World J Microbiol Biotechnol*. 2010, 26: 1317-1322. DOI 10.1007/s11274-009-0303-0.
8. Електронний режим доступу : <https://tabletki.ua/uk/%D0%9E%D0%BA%D1%81%D0%B8%D1%82%D0%B5%D1%82%D1%80%D0%B0%D1%86%D0%B8%D0%BA%D0%BB%D0%B8%D0%BD/>

					НУХТ БТЕК 04.03.36 КР ПЗ		
Зм	Арк.	№ докв-	Під-	Ла	СПИСОК ВИКОРИ- СТАНОЇ ЛІТЕРАТУ- Кафедра БТМ		
Розроб-	Афлатарли						
Керівник	Ворониов						
Н. контр							
Кон-Зав.	Стабніков						
					Ліме-	Ар-	Аркшів
						85	98 ¹

9. Oxytetracycline [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/oxytetracycline>
10. Boruta T., Ścigaczewska A. Enhanced Oxytetracycline Production by *Streptomyces rimosus* in Submerged Co-Cultures with *Streptomyces noursei*. *Molecules*. 2021, 26(19): 6036. doi: 10.3390/molecules26196036.
10. Petković H., Cullum J., Hranueli D., Hunter I. S., Perić-Concha N., Pigac J., Thamchaipenet A, Vujaklija D., Long P.F. Genetics of *Streptomyces rimosus*, the Oxytetracycline Producer. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2006,70(3): 704–728.
12. Oxytetracycline [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00595>.
13. B. Lanoot. Improved taxonomy of the genus *Streptomyces*. – 2005.
14. S.Koehler. Protective *Streptomyces* in beewolves – *Ecology, evolutionary history and specificity of symbiont-mediated defense in Philanthini wasps (Hymenoptera, Crabronidae)*. – 2014.
15. Zhao Y., Song Z., Ma Z., Bechthold A., Yu X. Sequential improvement of rimocidin production in *Streptomyces rimosus* M527 by introduction of cumulative drug-resistance mutations. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2019, 46: 697–708.
16. Singh n., rai v. Optimization of cultural parameters for antifungal and antibacterial metabolite from microbial isolate; *streptomyces rimosus* mtcc 10792 from soil of chhattisgarh. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2012, 4(2): 94-101
17. *Streptomyces rimosus* F.D. 10326 is a mesophilic bacterium that produces antibiotic compounds and was isolated from soil. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://bacdive.dsmz.de/strain/15515>.
18. Oxytetracycline Side Effects: What You Need To Know About This Acne Treatment. [Электронный ресурс] – режим доступа: <https://www.theindependentpharmacy.co.uk/acne/guides/oxytetracycline-side-effects>.

19. Rok J., Wrześniok D., Beberok A., Otręba M., Delijewski M., Buszman E. Phototoxic effect of oxytetracycline on normal human melanocytes. *Toxicology in Vitro*. 2018, 48: 26 – 32. doi: 10.1016/j.tiv.2017.12.008.
20. ОКСИТЕТРАЦИКЛІН-200 для ін'єкцій (10 мл). [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://produkt.com.ua/product/oksitetraciklin-200-10-ml-flakon-312-sht-up/>.
21. Державний реєстр ветеринарних препаратів України [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://data.gov.ua/dataset/8f3e00b2-16e8-4b30-af7d-b9212837b0a6>.
22. Окситетрациклін-200 (ДЛЯ ТВАРИН) розчин для ін'єкцій, 10 мл. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://tabletki.ua/uk/%D0%9E%D0%BA%D1%81%D0%B8%D1%82%D0%B5%D1%82%D1%80%D0%B0%D1%86%D0%B8%D0%BA%D0%BB%D0%B8%D0%BD-200/1044064/>.
23. Shinozuka Y., Kawai K., Takeda A., Yamada M., Kayasaki F., Kondo N., Watanabe A. Influence of oxytetracycline susceptibility as a first-line antibiotic on the clinical outcome in dairy cattle with acute *Escherichia coli* mastitis. *Journal of Veterinary Medical Science*. 2019, 81 (6): 863–868. doi: 10.1292/jvms.19-0035.
24. Державна статистика України. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.ukrstat.gov.ua/>.
25. У господарстві «Аграрна компанія 2004» завдяки вакцинації аутогенною вакциною вдалося суттєво зменшити рівень захворюваності на мастити. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://agrotimes.ua/article/pryvesty-do-normy-likuvannya-mastytiv-u-koriv/>.
26. Довбня А. О., Березовський А. В., Фотіна Г. А. Динаміка захворювання корів на мастит в умовах промислового виробництва молока. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені СЗ Гжицького*. 2019, 21 (96): 171-176.

27. Glycolysis / Gluconeogenesis - *Streptomyces rimosus* [Електронний ресурс]. – Режим доступу: https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?srim00010
28. Citrate cycle (TCA cycle) - *Streptomyces rimosus* [Електронний ресурс]. – Режим доступу: https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?srim00020
29. Пирог Т.П. Біохімічні основи мікробного синтезу [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобувачів освітнього ступеня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» освітньо-професійної програми «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна»/ Т.П. Пирог, Л.В.Ключка. – К.: НУХТ, 2019. – 81 с.
30. Fatty acid biosynthesis - *Streptomyces rimosus* [Електронний ресурс]. – Режим доступу: https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?srim00061
31. Alanine, aspartate and glutamate metabolism - *Streptomyces rimosus* [Електронний ресурс]. – Режим доступу: https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?srim00250
32. Tetracycline biosynthesis - *Streptomyces rimosus* [Електронний ресурс]. – Режим доступу: https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?srim00253
33. Pfaudler DIN BE Reactors. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.gmmpfaudler.com/uploads/files/pfaudler-din-be-reactors-1.pdf>.
34. Пирог Т.П., Ігнатова О. А. Загальна біотехнологія: підручник / К. :НУХТ, 2009. – 336 с.
35. Дезінфекція. [Електронний ресурс] – режим доступу : <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/9855/dezinfekciya>.
36. Дезінфекція. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://healthapple.info/zdorovya-ta-organizm/dezinfektsiya/>.
37. Державний реєстр дезінфекційних засобів 2021 рік. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://data.gov.ua/dataset/e4cf84a5-25fa-46e8-aa14-dbfa240b974a/resource/698b11a0-4e82-4053-b498-b94cbe6e4e81#:~:text=https%3A//data.gov.ua/dataset/1dddc0e9%2D25d8%2D4b9a%2Dae6%2Dd31a5af44437/resource/698b11a0%20...>

38. Клінідез. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://ua.medsolve.com.ua/meditsinskim-uchrezhdeniyam/dezinfektsiya/klinidez-300-tabletok-v-banke-1-kg-s-01-0222.html>.
39. Засіб для видалення важких білково-жирових забруднень з поверхонь стін і підлоги PUR-285. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://coagulant.com.ua/catalog/pur-285/>.
40. Миючий засіб «CIP 1073» . [Електронний ресурс] - режим доступу: <https://b2f.org.ua/myuchi-prom/myuchyi-zasib-cir-1073>.
41. Повітрозабірник Dani В3 12-1. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://dani.org.ua/komplektuiuchi/povitrozabirnyk-dani-v3-12-1/>.
42. Фільтр грубої очистки повітря для TION O2. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://kvantum.com.ua/ua/catalog/filtr-gruboy-ochistki-vozdukha-f7-dlya-tion-o2.html#props>.
43. Компресори з потужністю 30,0-90,0 кВт. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://compressory.org.ua/catalog_2/vintovyie-kompressory-maslozapolnennyye/s-pryamym-privodom/s-moshchnostyu-30-0-90-0-kvt/.
44. Конденсатор (теплообмінник) KFL ELK 4, без вентиляторів. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://eurocool.dp.ua/p1457758991-kondensator-teploobmennik-kfl.html>.
45. Ресивери ZELKO. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://www.zelko.ua/vozduhopodgotovka/resivery?gclid=CjwKCAjw49qKBhAoEiwAHQVT03bIMXMTbTvK7Ytv9QptHJcJ7JPXTFOv9ZIUH1KtZ2kqsVZ5UHSp6xoC4LIQAvD_BwE.
46. Теплообмінники типу "труба в трубі". [Електронний ресурс] – режим доступу: http://euromash.kiev.ua/ua/teploobmennik_truba_v_trube_ua.php.
47. Кишенькові фільтри G4. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://newfilter.com.ua/ua/ventilacia/kishenkovi-filtri-g4-dlya-sistem-ventilyatsiyi-_vigotvleniya-filtriv.html.

48. PF серія, процесні фільтри із нержавіючої сталі, 16 бар. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://compressory.org.ua/catalog_2/sistemy-podgotovki-szhatogo-vozduha/filtry/seriia-pf/.
49. Дозатор ваговий автоматичний шнековий обліковий ДВП-3У. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://asvik.kiev.ua/ua/catalog/group/product/32>.
50. Апарати сталі емальовані з механічним змішуючим пристроєм. [Електронний ресурс] – режим доступу: http://euromash.kiev.ua/ua/aparati_etal_mehaniceskim_perem_ustroystvom_ua.php.
51. Biostat® Cplus. The Stainless Steel Fermenter|Bioreactor for Your Laboratory. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.sartorius.com/download/9612/broch-biostat-cplus-sbi1505-e-data.pdf>.
52. Дозатор рідини, води, молока, пива та інших напоїв за обсягом. Точний порційний розлив і дозування. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://magnum-beer.com.ua/ua/p1493971053-dozator-zhidkosti-vody.html>.
53. Насос відцентровий Wetron. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://rozetka.com.ua/ua/wetron_775024/p247432045/?gclid=Cj0KCQiAgaGgBhC8ARIsAAAYLfi6SrkPYH9Gj-Mxm2iAmloqPYIErObuUv5bF4nHw8LvmN-wsz6U4oaAphfEALw_wcB.
54. Циркуляційний насос SPRUT GPD 25/4S-180. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://storgom.ua/ua/product/poverhnostnyi-nasos-sprut-gpd-25-4s-180-gaika.html#properties-tab>.
55. Pfaudler DIN AE Reactors. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://www.gmmpfaudler.com/uploads/files/A_Pfaudler-DIN-AE-Reactors-622-4E.pdf.
56. Насос поверх. відцентровий VODOMET JET100, СРМ158. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://yorsh.ua/uk/nasosy-vodomet-cpm158-nasos-poverkhnostnyj-czentrobezhnyj-n35m-q66kbn-p1100-vt-1x1>.

57. Standard models for 5 ltr autoclave. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://amarequip.com/docs/500ml-5ltr%20Stirred%20Pressure%20Reactor%20Catalog.pdf>.
58. Pfaudler DIN BE Reactors. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.gmmpfaudler.com/uploads/files/pfaudler-din-be-reactors-1.pdf>.
59. Насоси СТІ АА. Промислова версія. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://tapflo.ua/products/centrifugal/centrifugal-industrial-pumps/cti-cth-pumps/cti-aa>.
60. Красінько В.О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв [Електронний ресурс]: конспект лекції 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.
61. Vrynchanu N., Dudikova D., Dronova M., Suvorova Z., Burmaka V. Вивчення специфічної активності антифунгальних лікарських засобів, методичні рекомендації. 2018. [Електронний ресурс] Режим доступу: https://www.researchgate.net/publication/329444254_VIVCENNA_SPECIFICNO_I_AKTIVNOSTI_ANTIFUNGALNIH_LIKARSKIH_ZASOBIV_METODICNI_REKOMENDACII.
62. Yang S. S., Yueh C. Y. Oxytetracycline production by immobilized *Streptomyces rimosus*. *Journal of Microbiology, Immunology, and Infection = Wei Mian yu gan ran za zhi*. 2001, 34(4), 235-242.
63. Biosensor Technology | YSI Life Sciences [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://www.ysi.com/ysi-blog/water-blogged-blog/2017/08/biosensor-technology-ysi-life-sciences>.
64. YSI 2700 Select Biochemistry Analyzer [Електронний ресурс]. – Режим доступу: https://americanlaboratorytrading.com/lab-equipment-products/ysi-2700-select-biochemistry-analyzer_11418.
65. Prabakaran G, Hoti S L. Influence of amino nitrogen in the culture medium enhances the production of δ -endotoxin and biomass of *Bacillus thuringiensis* var.

israelensis for the large-scale production of the mosquito control agent. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2008, 35 (9): 961–965. doi.org/10.1007/s10295-008-0370-5.

66. Шаповалов Є. Визначення Нітрогену амінних 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/>.

67. Titration Curves of Aminoacids [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://vlab.amrita.edu/?sub=3&brch=63&sim=1336&cnt=2>.

68. Ginésy M, Rusanova-Naydenova D, Rova U. Tuning of the Carbon-to-Nitrogen Ratio for the Production of l-Arginine by *Escherichia coli*. *Fermentation*. 2017; 3(4):60. <https://doi.org/10.3390/fermentation3040060>

69. Nitrogen, Ammonia [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://www.hach.com/asset-get.download-en.jsa?id=7639984193>.

70. Test Strips, MQuant® [Електронний ресурс]. – Режим доступу: https://www.merckmillipore.com/INTL/en/products/analytics-sample-prep/test-kits-and-photometric-methods/visual-tests-for-semi-quantitative-analyses/test-strips-mquant/q42b.qB.2.IAAAE_CBZ3.Lxj.nav?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F.

71. Біотехнологія і переробка відходів [Електронний ресурс] - режим доступу: https://revolution.allbest.ru/ecology/00767563_0.html

72. Патент України на корисну модель № 101276. Фільтр аерозольний сейсмостійкий / Остапенко О. Г. Опубл. 25.08.2015, Бюл. № 16.

73. [Електронний ресурс] - режим доступу: https://er.nau.edu.ua/bitstream/NAU/46963/1/%D0%A4%D0%95%D0%91%D0%86%D0%A2_2020_162_%D0%A1%D0%B0%D0%BB%D0%B0%D0%BF%D0%BE%D0%BD%D0%BE%D0%B2%D0%B0%20%D0%90..pdf.

Схема гліколізу

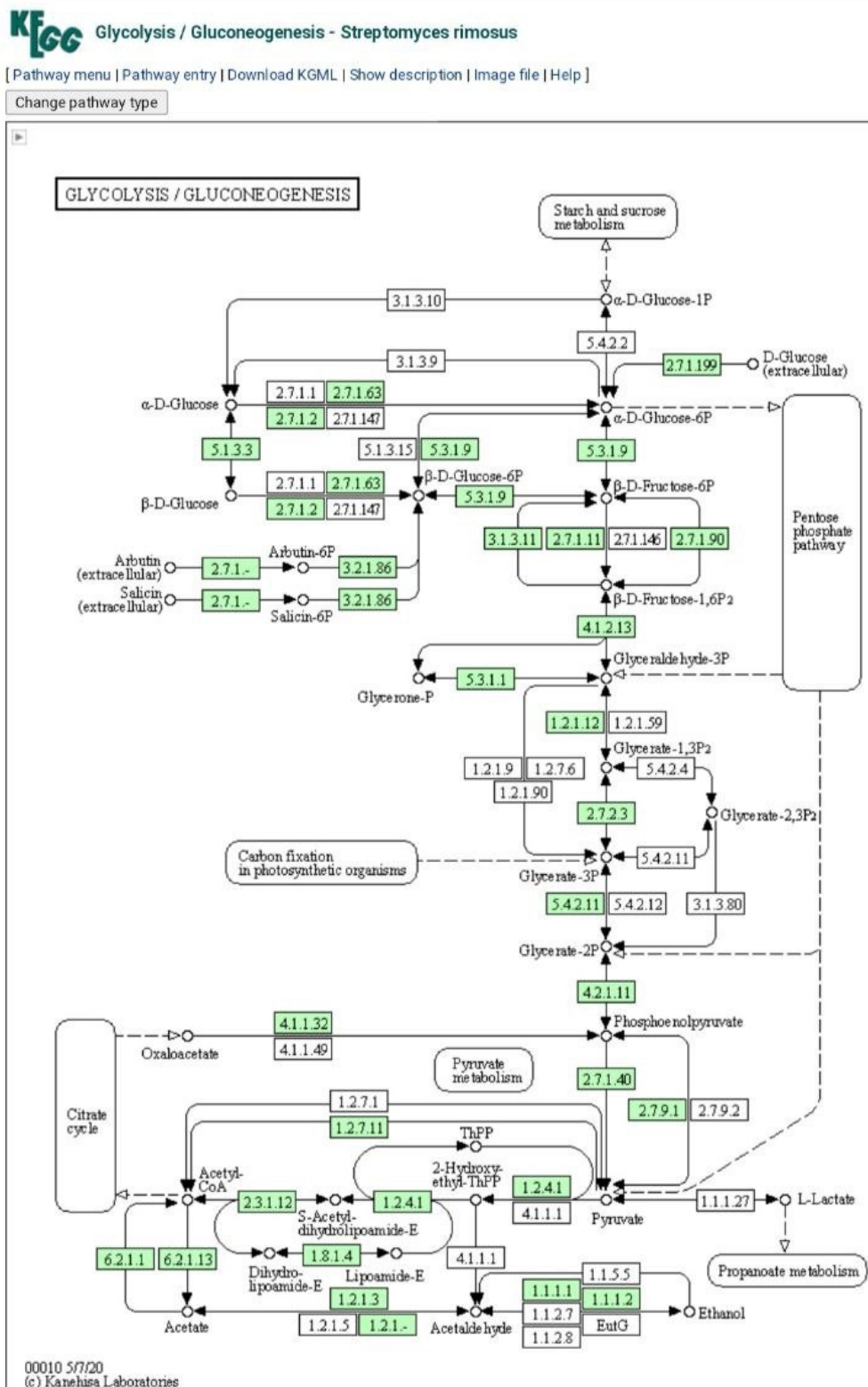
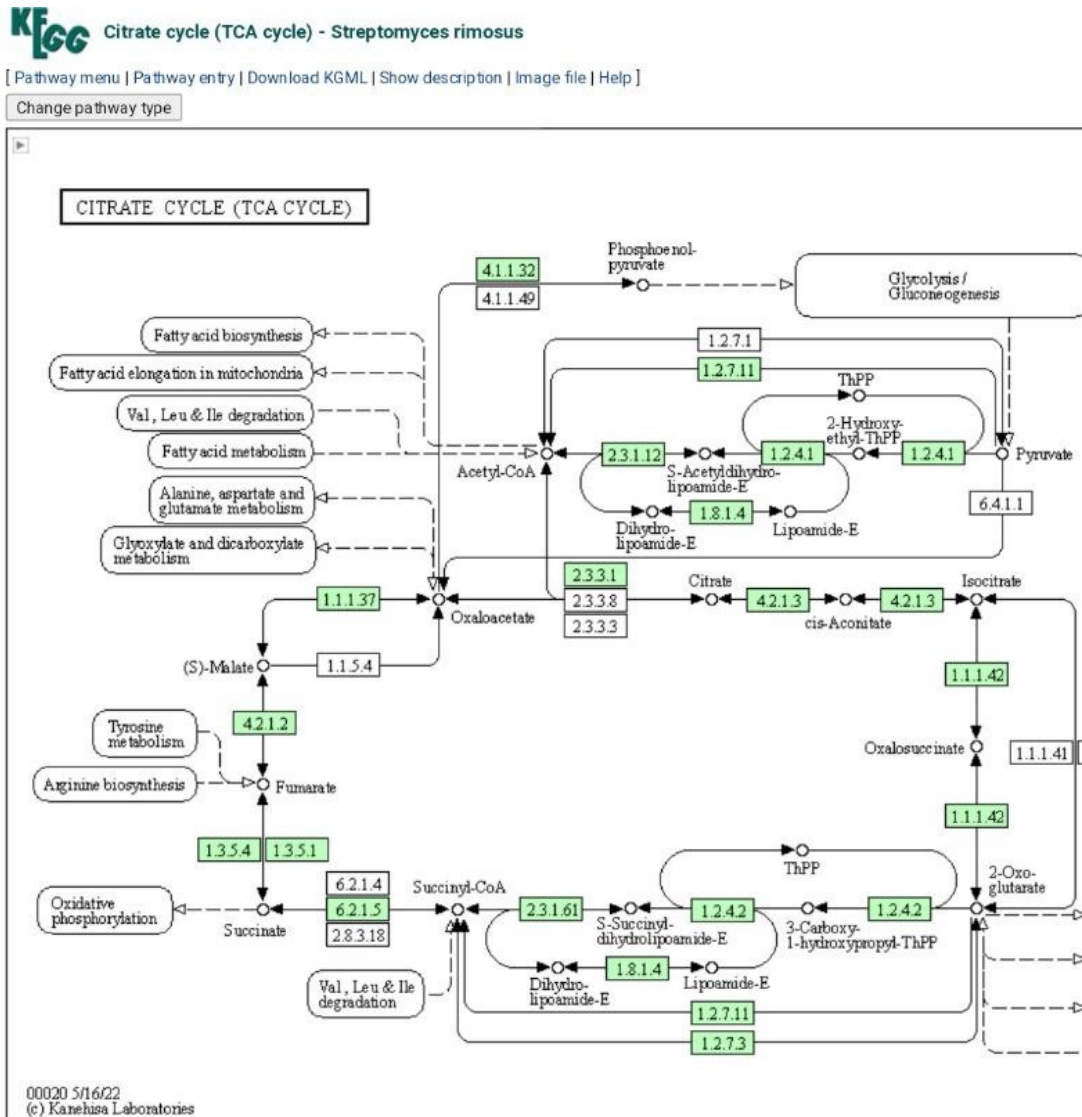


Схема Циклу Трикарбонних Кислот



Біосинтез тетрациклінів

KEGG Tetracycline biosynthesis - *Streptomyces rimosus*

[Pathway menu | Pathway entry | Download KGML | Show description | Image file | Help]

Change pathway type

