

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

« » 20 p.

« » 20 p.

Київ - 2022р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

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

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і
мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ

“ 04 ” квітня 20 22 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

Возна Анастасія Віталіївна

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Культивування *Streptoalloteichus cremeus subsp. tobramycini* для одержання апраміцину

керівник роботи Красінько Вікторія Олегівна,

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від 30 березня 2022 року № 164-к

2. Строк подання здобувачем роботи 03.06.2022

3. Вихідні дані до роботи :

Продуцент - *Streptoalloteichus cremeus subsp. tobramycini*

об'єм ферментера – 5 м³

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити)

Характеристика цільового продукту; Обґрунтування вибору та
характеристика біологічного агента; Техніко-економічне обґрунтування;
Обґрунтування вибору технологічної схеми; Специфікація обладнання; Опис
технологічної схеми; Контроль виробництва.

5. Перелік графічного матеріалу

Креслення технологічної схеми (А1); Креслення апаратурної схеми (А1)

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 04 квітня 2022 року**КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН**

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Характеристика цільового продукту	03.04.2022- 10.04.2022	
2	Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	11.04.2022- 18.04.2022	
3	Техніко-економічне обґрунтування	19.04.2022- 26.04.2022	
4	Обґрунтування вибору технологічної схеми	1.05.2022- 08.05.2022	
5	Специфікація обладнання	10.05.2022- 14.05.2022	
6	Опис технологічної схеми	15.05.2022- 19.05.2022	
7	Креслення технологічної схеми	20.05.2022- 24.05.2022	
8	Креслення апаратурної схеми	20.05.2022- 24.05.2022	
9	Контроль виробництва	20.05.2022- 24.05.2022	
10	Оформлення кваліфікаційної роботи	20.05.2022- 24.05.2022	

Здобувач

(підпис)

(ім'я та прізвище)

Керівник роботи

(підпис)

(ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційну роботу присвячено розробленню технологічної та апаратурної схем біосинтезу ліпідів для виробництва антибіотика Апраміцину шляхом культивування *Streptoalloteichus cremeus subsp. tobramycini*.

Кваліфікаційна робота складається із вступу, семи розділів, списку використаної літератури з найменувань, технологічної схеми (формат А-1 один аркуш) та апаратурної схеми (формат А-1 один аркуш). Загальний обсяг роботи

Обґрунтовано продуцент - *Streptoalloteichus cremeus subsp. tobramycini*, який у порівнянні з іншими дає більший вихід цільового продукту. Обґрунтовано склад поживного середовища для культивування. З урахуванням складу поживного середовища було запропоновано схему його підготовки та підібрано режими стерилізації цих компонентів. Вирощування *Streptoalloteichus cremeus subsp. tobramycini* буде відбуватись у колбах на качалках, культивуванні в інокуляторі об'ємом 50л, 500л а виробниче культивування у ферментері об'ємом 5м³ здійснюється з дотриманням асептичних умов.

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ.....	4
ВСТУП.....	7
РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту.....	11
РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	15
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування.....	16
2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента.....	18
РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування.....	21
3.1. Потреба у цільовому продукті.....	21
3.2. Розрахунок потужності виробництва.....	22
3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів...	24
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.....	25
РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми.....	28
4.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу.....	28
4.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера.....	28
4.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря.....	30
4.1.3. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища.....	32
РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання.....	39
РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми.....	45
РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва.....	57

7.1. Мікробіологічний контроль.....	57
7.2. Показники росту і синтезу цільового продукту.....	57
7.2.1. Концентрація амінного азоту.....	57
7.2.2. Концентрація вуглецю	59
7.2.3. Визначення концентрації апраміцину.....	60
ЛІТЕРАТУРА.....	62

ВСТУП

Фармацевтика та біотехнології є сучасними високотехнологічними сферами промисловості різних країн світу та одними із ключових факторів створення сучасної інноваційної економічної системи багатьох країн, у тому числі країн ЄС, забезпечуючи основу для значних конкурентних переваг, стимулюючи економічне зростання та створення нових робочих місць. Розробки в галузі біотехнології застосовуються в медицині, виробництві харчових продуктів, сільському господарстві, лісовому господарстві тощо [1].

За результатами 2012 р., частка експорту фармацевтичної продукції в сукупному експорті України становила всього 0,4%. Проте це не завадило наблизитися до таких країн ЄС, як Словаччина, Люксембург та Естонія. Лідером серед ЄС-28 є Ірландія – 23,0%. Це може свідчити про необхідність активізації винахідницької діяльності у фармацевтичній галузі, особливо у створенні лікарських препаратів (антибіотики, вакцини тощо) із використанням біотехнологій (генно-інженерне одержання ліків, гормонів, біологічно-активних речовин та ін.), що не тільки позитивно вплине на інноваційну діяльність і конкурентоспроможність держави на внутрішньому та зовнішньому ринках у довгостроковій перспективі, але й приведе до заміщення імпортованих лікарських засобів вітчизняними, внаслідок чого державні ресурси будуть спрямовані на підтримку вітчизняного виробника, а не іноземного [1].

Антимікробні препарати є важливими препаратами для здоров'я та безпеки людей і тварин. Резистентність мікроорганізмів до антимікробних

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.16 КР ПЗ</i>		
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>				
<i>Розробник</i>	<i>Возна А.В.</i>				<i>ВСТУП</i>	<i>Літера</i>	<i>Аркш</i>
<i>Керівник</i>	<i>Красінко В.О.</i>						<i>Аркшів</i>
<i>Н. контр</i>							<i>2</i>
<i>Консульт</i>							<i>57</i>
<i>Зав. каф.</i>	<i>Стадніков В.П.</i>					<i>Кафедра БТМ</i>	

препаратів (АМР) – це глобальна проблема суспільного здоров'я та здоров'я тварин, на масштаби розповсюдження якої впливає застосування антибіотиків у гуманній медицині, ветеринарії, тваринництві та рослинництві. Ризик АМР збільшується, якщо антимікробні препарати застосовуються не належним чином, наприклад, у нецільовий спосіб (масове необґрунтоване застосування або використання проти нечутливих мікроорганізмів), у субтерапевтичних дозах, багаторазово або протягом невідповідного терміну [2].

Розсудливе застосування антимікробних препаратів повинно привести до більш раціонального та цілеспрямованого їх використання, таким чином, максимізуючи терапевтичний ефект та мінімізуючи розвиток АМР. Враховуючи перехресну та корезистентність, коли будь-який вплив антимікробних препаратів збільшує появу АМР, кінцевим результатом розсудливого використання має бути загальне зменшення використання антимікробних препаратів, переважно шляхом обмеження їх застосування лише в тих ситуаціях, коли воно є необхідним. У таких ситуаціях антимікробні препарати варто використовувати для цілеспрямованого лікування на основі клінічного діагнозу та, де це можливо, результатів мікробіологічного встановлення чутливості мікроорганізмів, а також використання, при можливості, антимікробного агента вузького спектру дії. Оскільки існує обмежена кількість доступних класів антимікробних препаратів, як і загалом антибіотиків, необхідних для лікування різних видів тварин при захворюваннях, які становлять особливі загрози здоров'ю тварин, у ветеринарній медицині використовують деякі класи антибактеріальних речовин чи окремі антибіотики, які широко застосовуються у гуманній медицині. Необхідність використання та збереження цих важливих лікувальних засобів є актуальним з точки зору концепції «Єдине здоров'я».

Всесвітня організація охорони здоров'я (ВООЗ) класифікувала

антимікробні препарати, що використовуються у гуманній медицині, як «критично важливі», «дуже важливі» і «важливі» для здоров'я людини [2].

Критично важливі антимікробні препарати мали відповідати двом критеріям:

1) єдиний варіант терапії або одна з небагатьох альтернатив для лікування серйозних захворювань людини;

2) антибактеріальний препарат застосовується для лікування захворювань, викликаних мікроорганізмами, які можуть мати нелюдське походження, або захворювань, які спричинені мікроорганізмами, яким передані гени опірності з нелюдських джерел [2]

Відповідальне і обережне використання антимікробних препаратів у ветеринарній медицині, важливий. Таким чином, було прийнято рішення, щоб усі антимікробні речовини, які використовуються для тварин, розділити на критично важливі, дуже важливі та важливі антимікробні засоби і для ветеринарної медицини.[2]

Розвиток тваринництва України, збільшення виробництва молока, м'яса та інших продуктів і сировини тваринного походження багато в чому залежить від своєчасного та високоякісного проведення ветеринарно-профілактичних заходів, як основи боротьби за здоров'я тварин та охорони населення від захворювань, спільних для людей та тварин. Основна діяльність ветеринарних спеціалістів повинна бути спрямована на забезпечення профілактики захворювань тварин. На жаль, доводиться ще мати справу з деякими хворобами, які вражають худобу та птицю, особливо молодняк, впливають на якість продукції тваринництва, а іноді і на здоров'я людей. Колібактеріоз – це захворювання новонародженого молодняку сільськогосподарських тварин і птиці, але зустрічаються випадки захворювання людей, викликаних *E.coli*. На щастя, висока терапевтична ефективність спостерігається при застосуванні препарату Апраміцин в

поєднанні з введенням антитоксичної та антиадгезивної сироватки проти сальмонельозу та ешерихіозу тварин [3].

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ БІОСИНТЕЗУ.

Апраміцин – це антибіотик групи аміноглікозидів, до якої також належать неоміцин, гентаміцин, стрептоміцин і багато інших антибактеріальних препаратів. Являє собою білий порошок, він розчинний у воді і нерозчинний в органічних розчинниках. Апраміцин - це унікальний за структурою антибіотик, який містить біциклічний цукровий фрагмент та монозаміщений дезоксистрептамін. Він не схвалений для використання у людей. [4]

Апраміцин має бактерицидну дію проти багатьох грамнегативних бактерій.

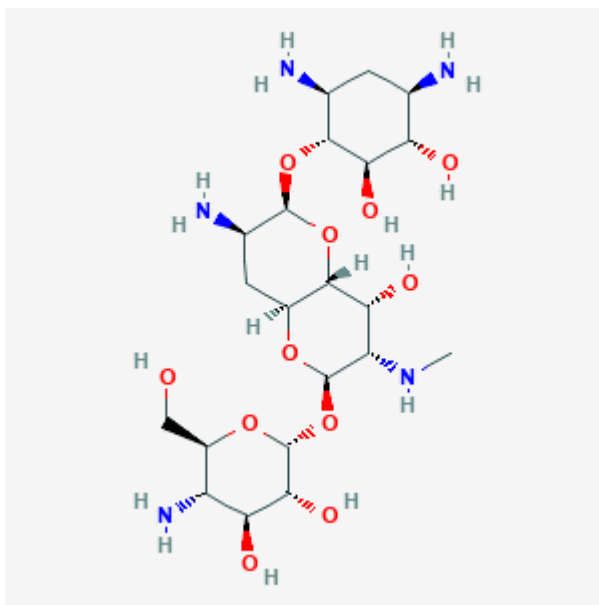


Рис.1.1 Графічне зображення хімічної структури апраміцину.

Апраміцин має наступні фізико-хімічні властивості: хімічна формула

					НУХТ БТЕК 04.01.16 КР ПЗ				
Зм	Арк.	№ документа	Підпис		РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ БІОСИНТЕЗУ	Літера	Аркш	Аркшів	
Розробник	Возна А.В.							2	57
Керівник	Красінько В.О.					Кафедра БТМ			
Н. контр									
Консульт									
Зав. каф.	Стадніков В.П.								

$C_{21}H_{41}N_5O_{11}$, молекулярна маса 539,6 г/моль(точна маса 539,280257 г / моль), розчинність у воді складає 1,5 кг/л, на рис 1.1 наведено структурну формулу апраміцину.

У медицині цей антибіотик не використовують, а от у ветеринарії так. У ветеринарії апраміцин використовують для лікування молодняка тварин – ягнят, поросят, курчат, телят, кроликів і т.д, але його не можна використовувати тваринам, з яких яйця або молоко отримують для споживання людиною. Апраміцин водорозчинний порошок призначають тваринам всередину з питною водою, а телятам і ягнятам - з молоком або замінником незбираного молока, 1 раз на добу в наступних дозах:

1. Поросята - 15-25 мг / кг маси тіла 3-7 днів поспіль.
2. Телята - 40-80 мг / кг маси тіла 3-5 днів поспіль.
3. Ягнята - 20 мг / кг маси тіла 3-5 днів поспіль.
4. Сільськогосподарська птиця - 50-100 мг / кг живої маси (0,5-1 г / л води) 3-7 днів поспіль.
5. Кролики - 2-30 мг / кг живої маси (0,1-0,2 г / л води) 5-8 днів поспіль.

Разову дозу Апраміцина, водорозчинного порошку, перед застосуванням розчиняють в 5-10-кратному (по відношення до порошку) обсязі відповідної рідини (води, молока або ЗНМ), додаючи рідину до порошку, ретельно перемішують, дають відстоятися кілька хвилин, потім знову перемішують і доводять обсяг до необхідної кінцевої концентрації. При використанні Апраміцина з питною водою для курчат-бройлерів, молодняка курей-несучок і кроликів, розраховану дозу антибіотика змішують з половиною добової норми води, яку птах повинна випити. Чиста вода може подаватися тільки після повного споживання птицею води з антибіотиком. Апраміцин погано засвоюється в шлунково-кишковому тракті і в основному діє місцево. В організмі ссавців він не метаболізується і виводиться з фекаліями, і, в значно меншій мірі з сечею. Це відбувається тому, що апраміцин відкладається в жировій тканині і повільно вивільняється з неї.



Рис.1.2 .Товарний вигляд апраміцину в якості препарату

При контакті із шкірою та слизовими оболонками, апраміцин подразнює їх, однак цим шляхом він не може потрапляти в організм. У ході експерименту на ізольованому серці та гладких м'язах, апраміцин викликав деяке прискорення частоти пульсації передсердь морської свинки. При внутрішньовенному введенні цього антибіотика собакам, також спостерігали почастішання серцебиття і підвищення артеріального тиску [5].

Механізм біологічної дії. Апраміцин діє бактерицидно, пригнічуючи розвиток бактерій на всіх стадіях росту (і в логарифмічній, і в стаціонарній фазі кривої зростання). Механізм протибактеріальної дії апраміцина обумовлений придушенням синтезу протеїнів бактерій шляхом незворотного зв'язування з 30S-субодиниці рибосом мікроорганізмів і порушення процесу формування комплексу "мРНК-тРНК". Завдяки особливостям будови молекули, апраміцин не піддається інактивації аміноглікозидомодифікуючими ферментами грамнегативних бактерій, що забезпечує високу ефективність навіть в разі множинної лікарської стійкості патогенної мікрофлори.

При пероральному введенні Апраміцин - водорозчинний порошок, практично не всмоктується і створює вибірково високі терапевтичні концентрації по всьому шлунково-кишкового тракту.

Умови зберігання : зберігають цей препарат у сухому, темному, недоступному для дітей місці при температурі від +4 до +25 °С. Водний розчин препарату необхідно використати протягом 3 діб, а розчин на основі молока або його замінника — у день приготування.

Форма випуску: пакети або контейнери з полімерних матеріалів по 10; 100 або 500 гр.

РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

Апроміцин також відомий як небраміцин II - це аміноглікозидний антибіотик, який використовується у ветеринарній медицині. Можна використовувати для лікування бактеріальних інфекцій у тварин, спричинених *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, та *Pseudomonas aeruginosa*

На сьогодні відомо не багато продуцентів апроміцину, розглянемо два найбільш перспективних.

У таблиці 2.1 наведена порівняльна характеристика продуцентів антибіотику тобраміцину.

Streptoalloteichus cremereus subsp. tobramycinі ВКПМ S-1084 в порівнянні з *Streptomyces tenebrabius* ATCC 17920 час виробничого культивування має більший, а саме 144 год проти 120 год відповідно [6,7].

S. cremereus subsp. tobramycinі ВКПМ S-1084 – має схоже за складом середовище для культивування у порівнянні з іншим продуцентом. Найбільша концентрація антибіотику спостерігається у *S. cremereus* subsp. tobramycinі ВКПМ S-1084 - 4000 мкг/мл (4 г/л), а у *S. tenebrabius* ATCC 32 концентрація сягає 960 мкг/мл (0,96 г/л). У порівнянні з іншими штамами має середнє значення часу культивування, а саме 90 годин. [6,7].

Підсумовуючи можна зазначити, що серед розглянутих продуцентів тобраміцину, найбільш доцільно в якості біологічного агента буде обрати *S. cremereus* subsp. tobramycinі ВКПМ S-1084 через найбільші показники концентрації антибіотику (4 г/л), та має меншу вартість 1л середовища для виробничого культивування[6].

					НУХТ БТЕК 04.01.16 КР ПЗ				
Зм	Арк.	№ документа	Підпис		РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	Літера	Аркш	Аркшів	
Розробник	Возна А.В.								
Керівник	Красінько В.О.						2	57	
Н. контр						Кафедра БТМ			
Консульт									
Зав. каф.	Стадніков В.П.								

Таблиця 2.1

Порівняльна характеристика продуцентів апраміцину

Продуцент	Склад поживного середовища, г/л	Концентрація апраміцину, г/л	Умови культивування	Література
<i>S. cremeus</i> subsp. <i>tobramycini</i> 1084	Соеве борошно – 10 Глюкоза – 4 Крохмал – 15 (NH ₄) ₂ SO ₄ – 3 CaCO ₃ – 3	4	144 год, 37°C, pH 6,9	Штамм <i>Streptoalloteichus cremeus</i> subsp. <i>tobramycini</i> ВКПМ S-1084 [Електронний ресурс] // Режим доступу: https://rusneb.ru/catalog/000224_000128_0002392311_20100620_C2_RU/ .
<i>S. tenebrabius</i> ATCC 17920	Глюкоза – 20 Крохмаль – 40 Соя – 50 CaCO ₃ – 5 MgSO ₄ ·7H ₂ O – 2	0,96	120 год, 37°C, pH 7	Xu, M., Zhu, Y. Glycine origin of the methyl substituent on C7'-N of octodiose for the biosynthesis of apramycin. <i>Science in China Series C: Life Sciences</i> . 2006, 49(4), 362–369. doi:10.1007/s11427-006-2009-y

2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища

Порівняльна характеристика продуцентів, наведена у табл. 2.1, є недостатньою. Тому на наступному етапі вибору біологічного агента порівнювали вартість поживних середовищ (табл. 2.2). Дані, наведені у табл. 2.2, засвідчують, що середовище для культивування *Streptoalloteichus cremeus* subsp. *tobramycini* 1084 є найдешевшим, ніж середовище для культивування *Streptomyces tenebrabius* ATCC 17920. Для того, щоб остаточно обрати найефективніший біологічний агент розраховували умовну вартість 1 г цільового продукту (табл. 2.3).

Узагальнивши всі дані, можна зробити висновок, що доцільніше використовувати для отримання апраміцину *Streptoalloteichus cremeus* subsp. *tobramycini* 1084. Середовище для культивування має майже найнижчу собівартість за 1 л, а саме 1,81 грн/л.

Таблиця 2.2

**Вартість компонентів поживного середовища для культивування
Streptoalloteichus cremeus subsp. *tobramycini* 1084 та *Streptomyces tenebrabius*
 ATCC 17920**

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1л середовища	Джерело інформації
<i>S. cremeus</i> subsp. <i>tobramycini</i> 1084	Соеве борошно – 20	35	0,7	1
	Глюкоза – 4	60	0,24	2
	Крохмаль – 15	50	0,75	3
	(NH ₄) ₂ SO ₄ – 3	6	0,018	4
	CaCO ₃ – 3	34	0,102	5
	Вартість 1 л середовища – 1,81 грн			
<i>Streptomyces tenebrabius</i> ATCC 17920	Глюкоза – 20	60	1,2	6
	Крохмаль – 40	50	2	7
	Соя – 50	29	1,45	8
	CaCO ₃ – 5	34	0,17	9
	MgSO ₄ – 2	11,80	0,0236	10
	Вартість 1 л середовища – 4,845 грн			

Примітка: * - Ціни вказано станом на травень 2021 р. :

1. <https://berdyansk.flagma.ua/uk/soeve-boroshno-dlya-bdzhil-bilkova-pidgodivlya-o4211018.html>;
2. <https://prom.ua/ua/p637964189-glyukoza.html?>;
3. <https://prom.ua/ua/p1327590487-krohmal-kukurudzyanij-vischogo.html?>;
4. <https://prom.ua/ua/p29027309-sulfat-ammoniya-nh42so4.html>;
5. <https://prom.ua/ua/p10326463-mel-svyatogorya-pischevoj.html?>;
6. <https://prom.ua/ua/p637964189-glyukoza.html?>;
7. <https://prom.ua/ua/p1327590487-krohmal-kukurudzyanij-vischogo.html?>;
8. <https://prom.ua/ua/p182499994-soya-naturalnaya-soevye.html>;
9. <https://prom.ua/ua/p10326463-mel-svyatogorya-pischevoj.html?>;
10. <https://prom.ua/ua/p1398366898-mineralnye-udobreniya-sulfat.html?>.

Таблиця 2.3

Умовна вартість 1г цільового продукту

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища, грн	Концентрація апраміцину г/л	Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г	Тривалість культивування, год	Концентрація цільового продукту утвореного за годину, г/год
<i>Streptoalloteichus cremeus</i> subsp. tobramycinini 1084	1,81	4	0,4525	144	0,03
<i>Streptomyces tenebrabius</i> ATCC 17920	4,845	0,96	5,05	120	0,008

Підсумовуючи можна сказати, що *Streptoalloteichus cremeus* subsp. tobramycinini 1084, у порівнянні з *Streptomyces tenebrabius* ATCC 17920, є більш продуктивний та перспективний. У порівнянні з вище описаним продуцентом, для культивування цього мікроорганізму використовується поживне середовище, що має меншу собівартість, а також вказаний біологічний агент має більшу біосинтезуючу здатність до виробництва антибіотику.

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

При вирощування на пептонному агарі по Чапеку розгалуджені форми спор утворюються у вигляді безпорядкових пучків і грон на повітряному міцелії. Ізольовані спори спостерігаються рідко. Міцелій в цілому, непошкоджену вигляді, легко відділяється від субстрату. Ланцюжки дозрілих спор зазвичай утворюють 5-6 відкритих спіралей. Спори мають довгасту форму, яка наближена до циліндричної. При дослідження під електронним мікроскопом мають розміри від 0,7 до 1,3 і від 2,0 до 2,1 мк.

Спори в разі нагрівання суспензії спор до 100 градусів протягом 15 хвилин втрачають свої життєздатні властивості [8].



Рис.3.1 *Streptoalloteichus tenebrarius* NBRC 16177

S. tenebrarius по відношенню до кисню облігатний аероб, характерний окислювальний тип метаболізму. Катаболізм глюкози, що міститься в поживному середовищі, здійснюється за гліколітичним шляхом. Ключовими ферментами в даному процесі є фосфофруктокіназа та піруваткіназа.

Росте на середовищі з концентрацією солей 5 % і може рости в діапазоні рН = 5,5 - 8,0, з оптимумом рН = 7,0. Типом живлення, характерний для даного актиноміцета – хемоорганотрофія [9].

При вивченні даних ознак досліджують: ферментативну активність (розрідження желатини, казеїну, наявність целюлози, каталази, інвертази, реакцію побуріння, відновлення нітратів), асиміляцію джерел живлення (цукри, спирти, органічні кислоти), ріст на синтетичних середовищах з нітратами як єдиним джерелом азоту, потреба амонійного азоту, характер продуктів метаболізму і утворення антибіотичних речовин.

Йому властива природна множинна стійкість до антибіотиків. У більшості випадків детермінанти стійкості актиноміцетів до власного антибіотика та гени його біосинтезу зчеплені та координовано регулюються. Ідентифікація та клонування генів резистентності до власного антибіотика є,

зазвичай, першим кроком у дослідженні генів біосинтезу антибіотиків. Одним із головних чинників, що лімітують біосинтез цих речовин, є ступінь резистентності штаму як до власного токсичного продукту, так і до інших антибіотиків. Встановлення закономірностей генетичного контролю стійкості актиноміцетів до антибіотиків та його ролі у біосинтезі має важливе значення для глибшого розуміння механізмів цих явищ, а також для розробки методів конструювання і селекції промислових продуцентів антибіотиків [10].

Однією з особливостей *S. tenebrarius* є його висока спонтанна мінливість. Гени стійкості до антибіотиків стали зручною моделлю для вивчення механізмів нестабільності генома актиноміцетів. Їх дослідження допомагає краще зрозуміти закономірності організації генома актиноміцетів та його мінливості. Воно має також важливе практичне значення, оскільки найчастіше нестабільними є ознаки, за якими проводиться селекція актиноміцетів [10].

Найважливішим продуцентом тобраміцину який володіє підвищеною продуктивною здатністю до синтезу даного антибіотика, є *S. tenebrarius* TD 507. Даний штам було отримано зі штаму *S. tenebrarius* ATCC 17920 дією на нього ультрафіолетового випромінення. Також, штам *S. tenebrarius* TD 507 можна отримати дією N-метил-N-нітро-нітрозогуанідину. Даний штам здатний синтезувати 1,75 – 2 г/л даного антибіотика.

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

3.1. Потреба у цільовому продукті

У даному курсовому проекті описано культивування *Streptoalloteichus cremereus subsp. tobramycinii* для одержання Апраміцину.

Обґрунтування необхідності застосування Апраміцину.

Основним завданням лікарів ветеринарної медицини є профілактика інфекційних та незаразних хвороб. Нерідко, через недотримання елементарних умов утримання та годівлі, що сприяє зниженню імунітету, у молодняка тварин виникають різні захворювання, тому для їх лікування застосовують певні антибіотики [11].

Ефективність фармакотерапії завжди залежить від правильно поставленого бактеріологічного діагнозу, вибору ефективного антимікробного препарату з урахуванням його фармакокінетики і фармакодинаміки у хворому організмі, чутливості до нього збудника хвороби та патогенезу патологічного процесу [11].

Одним з таких антибіотиків є Апраміцин. У ветеринарії апраміцин використовують для лікування молодняка тварин – ягнят, поросят, курчат, телят, кроликів і т.д, але його не можна використовувати тваринам, з яких яйця або молоко отримують для споживання людиною [12].

Для прикладу візьмемо захворювання у поросят таке як гастроентерит. Вірусний гастроентерит свиней - висококонтагіозна хвороба свиней, що характеризується катарально-геморагічним гастроентеритом і проявляється блювотою, діареєю, дегідратацією організму і високою летальністю поросят в перші 2 тижні життя. Хвороба реєструється у всіх країнах світу з інтенсивним веденням свинарства, і в даний час практично немає свинарських господарств, в яких не зустрічався вірусний гастроентерит. Хвороба завдає значних економічних збитків за рахунок високої захворюваності новонароджених поросят і 100%-вої їх

					НУХТ БТЕК 04.01.16 КР ПЗ				
Зм	Арк.	№ документа	Підпис		РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО- ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ	Літера		Аркш	Аркшів
Розробник	Возна А.В.							2	57
Керівник	Красінська В.О.					Кафедра БТМ			
Н. контр									
Консульт									
Зав. каф.	Стадніков В.П.								

загибелі.

За даними авторів [13] хвороби системи органів травлення у тварин складають від 40 до 60 % внутрішньої патології. Інші автори [14] вказують, що на долю поросят припадає 60–80 % незаразних хвороб свиней, з них шлунково-кишкові захворювання – 25–50 %. За даними авторів [15,16], на гастроентерит хворіють 70–80 % поросят. Віковий аспект захворюваності поросят хворобами шлунково-кишкового каналу становить: 1–10 доби життя – 40,6–46,5 %; 10–30 доби – 28,5–29,1; старші 30-добового віку – 25,0–29,9%; загибель 42,9–43,6 %; 30,9–31,4; 25,5–25,7 % відповідно [17].

3.2. Розрахунок потужності виробництва

Згідно інструкції до застосування препарату Апраміцин дозування антибіотика для різних груп сільськогосподарських тварин становить: телята (до шеститижневого віку) – 40-80 мг препарату на кг маси тіла; поросята (у віці до 120 днів) – 15-25 мг препарату на кг маси тіла або 250-500 мг препарату на 1 л питної води; ягнята (до шеститижневого віку) – 20 мг препарату на кг маси тіла; ремонтний молодняк курей-несучок, курчата-бройлери – 50-100 мг препарату на кг маси тіла або 0,5-1 г препарату на 1 л води; кролики – 20-30 мг препарату на кг маси тіла або 100-200 мг препарату на 1 л води [18].

Для розрахунку річної потреби в апраміцині на території України необхідно оцінити потреби у цьому антибіотику українського тваринництва. Вихідні дані для такого розрахунку наведено у табл. 1.1.

Згідно складеної таблиці, за даними Держстату за 2021 рік [19], максимальна річна потреба в апраміцину для тварин склала **56442кг**.

Таблиця 1.1

Вихідні дані для розрахунку річної потреби в апраміцині

Вид сільськогосподарських тварин	Доза препарату на добу, мг/кг маси	Середня маса тварини, кг	Тривалість прийому, діб	Кількість апраміцину у препараті (в мг) на 1 тварину на курс лікування	Кількість тварин в Україні станом на 1.01.2021 р.	Загальна кількість апраміцину на всіх тварин, (кг)
1	2	3	4	5	6	7
Велика рогата худоба	40-80	100	3-5	12000	2874000	34488
Свині	15-25	45	3-7	2025	5876200	11899
Вівці та кози	20	15	3-5	900	1140400	1026
Птиця свійська всіх видів	50-100	3	3-7	450	200651900 (20065190-10% батьківське стадо)	9029
	Разом					56442кг

*1 г препарату містить 0,5 г апраміцину сульфату

***при розрахунках враховуємо найменший час прийому антибіотику, а також найменше його дозування на добу**

**** дані наведено згідно**

[http://www.ukrstat.gov.ua/druk/publicat/kat_u/2021/zb/05/zb_tvaryny_2020.pdf]

***** згідно джерела [Технології виробництва продукції тваринництва: підруч./ [Бусенко О.Т., Скоцик В.Є., Маценко М.І. та ін.]; за ред. О.Т. Бусенка. – К.: «Агроосвіта», 2013. – 492с.]**
маса курей батьківського стада коливається від 1 до 5 кг. До розрахунку взято середню масу – 3 кг

Оскільки в Україні існує виробник вказаного препарату – ТОВ «Бровафарма», передбачається, що доля ринку, на який ми можемо розраховувати складає 50%, тобто:

$$56442\text{кг} - 100\%$$

$$X_{\text{кг}} - 50\%$$

$$X = \frac{56442 \times 50\%}{100\%} = 28221 \text{ кг/рік}$$

Однак, враховуючи широкий асортимент аналогічної антибіотичної продукції, обираємо для подальших розрахунків 1% від передбаченої ринкової потреби у препараті:

$$28221\text{кг} - 100\%$$

$$X_{\text{кг}} - 1\%$$

$$X = \frac{28221 \times 1\%}{100\%} \approx 282 \text{ кг/рік}$$

Оскільки при культивуванні *S. cremeus subsp. tobramycini* ВКПМ S-1084, концентрація апраміцину в культуральній рідині досягає 4г/л [14], для одержання такої кількості антибіотику річний об'єм культуральної рідини має становити:

$$0,004\text{кг} - 1\text{л}$$

$$282\text{кг} - X_{\text{л}}$$

$$X = 282/0,004 \approx 70500 \text{ л/рік} \approx 70,5 \text{ м}^3/\text{рік}$$

Тобто, для накопичення 282 кг апраміцину необхідно 70,5 м³/рік культуральної рідини

Враховуючи сумарні втрати цільового продукту при виділенні (40 %), необхідно отримати таку кількість культуральної рідини:

$$V_{\text{кр.}} = 70,5/(1-(0,3+0,1)) \approx 117500 \text{ л/рік} = 117,5 \text{ м}^3/\text{рік}$$

3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів

На основі розрахованої потужності виробництва (підрозділ 1.2) і прийнятої кількості робочих днів (330 трудоднів) на рік визначається геометричний об'єм ферментатора для виробничого біосинтезу. Згідно статті [14], продуцент *S.*

cremeus subsp. tobramycini ВКПМ S-1084 досягає найбільшої концентрації апроміцину (4 г/л).

Тоді, кількість продукту за цикл становитиме:

$$V_d = V_{гп} / T_{рд} = 117500 / 330 \approx 356 \text{ л/доба}$$

Кількість продукту за цикл буде становити:

$$V_{кр} = (K_1 \times V_d \times T_{цф}) / 24 = (1,1 \times 356 \times 154) / 24 \approx 2513 \text{ л/цикл}$$

де, $T_{цф}$ – цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу (144 год) та час підготовки ферментера до роботи (10 год).

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

За виробничий цикл отримують $V_{кр} = 2513$ л культуральної рідини. При одержанні культуральної рідини потрібно врахувати її втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 до 15%. Отже, кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом становитиме:

$$V_{роб.1} = V_{кр} / (1 - E_f) = 2513 / (1 - 0,15) = 2956 \text{ л,}$$

де E_f – втрати культуральної рідини під час біосинтезу.

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері з робочим об'ємом

$$V_{роб.1} = 2956 \text{ л.}$$

При вибраному коефіцієнті заповнення $K_{зап} = 0,5-0,7$ розраховують можливий геометричний об'єм ферментера (V_f), що становить

$$V_f = V_{роб.1} / K_{зап} = 2956 / 0,6 = 4927 \text{ л.}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{сф} = 5000 \text{ л}$, та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{зап1} = V_{роб.1} / V_{сф} = 2956 / 5000 = 0,59.$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах, отже геометричний об'єм ферментера вибрано вірно.

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

Тоді кількість поживного середовища в ферментері буде становити:

$$V_{пс1} = V_{роб.1}/(1+X_{ф}) = 2956/(1+0,1) \approx 2687\text{л},$$

де $X_{ф} = 0,1$ – доза посівного матеріалу для ферментера.

Кількість посівного матеріалу становить

$$V_{пм1} = V_{роб.1} - V_{пс1} = 2956 - 2687 = 269\text{л}.$$

Для одержання 269л інокуляту в посівному апараті враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 до 15%.

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

$$V_{роб.2} = V_{пм1}/(1-E_{па}) = 269/(1-0,10) \approx 299\text{л}.$$

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

Тоді кількість поживного середовища в посівному апараті буде становити

$$V_{пс2} = V_{роб.2}/(1+X_{па}) = 299/(1+0,1) \approx 272\text{л},$$

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

Кількість посівного матеріалу для посівного апарату становить

$$V_{пм2} = V_{роб.2} - V_{пс2} = 299 - 272 = 27\text{л}.$$

Кількість інокуляту $V_{роб.2}=299\text{л}$ можна одержати під час культивування у посівному апараті геометричним об'ємом

$$V_{па2}=V_{роб.2}/K_{зап}=299/0,6 = 498\text{л}.$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{сф} = 500\text{л}$, уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{з2}=V_{роб.2}/ V_{сф} = 299/500= 0,59$$

Для одержання 27 посівного матеріалу в інокуляторі враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 до 15%. Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі становитиме:

$$V_{роб.3} = V_{пм2}/(1-E_{ін}) = 27/(1-0,10) \approx 30\text{л}.$$

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

Тоді кількість поживного середовища в інокуляторі буде:

$V_{пс3} = V_{роб.3} / (1 + X_{ін}) = 30 / (1 + 0,1) \approx 27 \text{ л}$, де $X_{ін} = 0,1$ – доза посівного матеріалу для інокулятора.

Кількість посівного матеріалу для інокулятора становить

$$V_{пм3} = V_{роб.3} - V_{пс3} = 30 - 27 = 3 \text{ л.}$$

Кількість інокуляту $V_{роб.3} = 30 \text{ л}$ можна одержати під час культивування у посівному апараті геометричним об'ємом

$$V_{па3} = V_{роб.3} / K_{зап} = 30 / 0,6 = 50 \text{ л.}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер **$V_{сф} = 50 \text{ л}$** , уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{з2} = V_{роб.3} / V_{сф} = 30 / 50 = 0,6$$

Кількість інокуляту для засіву малого інокулятора $V_{пм3} = 3 \text{ л}$ можна одержати культивуванням у колбах на качалці. Для цього використовують качалочні колби об'ємом $V_{колб} = 750 \text{ мл}$ та коефіцієнтом заповнення $K_{зк} = 0,2$. Тоді кількість колб для отримання посівного матеріалу становитиме **$N_{колб} = V_{пм4} / (V_{колб} \cdot K_{зк}) = 3000 / (750 \cdot 0,2) = 20$** . Таким чином, для одержання посівного матеріалу необхідно 20 качалочних колб. Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 5 м^3 з коефіцієнтом заповнення 0,6 буде проходити у три етапи.

РОЗДІЛ 4 . ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

4.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу

4.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Основними вимогами до ферментерів є те, що вони мають забезпечити асептичні умови у процесів культивування продуцента при аерації, та масообмінних процесах, які протікають в середині біореактора.

Для обрання відповідного ферментера, який буде оптимальний для культивування *S. cretensis subsp. tobramycin* 1084, необхідно визначити умови проведення процесу, які безпосередньо залежать від фізіолого-біохімічних особливостей даного продуцента.

Оскільки, даний продуцент є аеробною бактерією, ми повинні забезпечити аерацію технологічного процесу, стерильним повітрям. Тоді, посівний апарат (ферментер) має бути забезпечений постійною аерацією через барботер, у нижній частині апарату, а також забезпечуватись мішалкою, для кращої інтенсифікації виробничого процесу.

Виробниче культивування і вирощування посівного матеріалу відбувається за температури 37°C і рН 6,9 [17]. Для запобігання контамінації проводиться стерилізація обладнання (інокулятори, збірники, ферментери), комунікацій, поживних середовищ для культивування, розчину титрувального агента.

Глибинне культивування – це головний спосіб, який використовують у мікробіологічних виробництвах. Воно має ряд переваг: менш трудомістке, потребує менше площ, має меншу ймовірність інфікування, його легше автоматизувати, і контролювати і отримати більший вихід продукції. Глибинне культивування може бути періодичним і безперервним [21].

					НУХТ БТЕК 04.01.16 КР ПЗ						
Зм	Арк.	№ документа	Підпис		РОЗДІЛ 4 . ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ			Літера	Аркш	Аркшів	
Розробник	Возна А.В.										
Керівник	Красінько В.О.									2	57
Н. контр								Кафедра БТМ			
Консульт											
Зав. каф.	Стадніков В.П.										

Періодичне культивування або стаціонарне - культивування мікроорганізмів у закритому об'ємі без поновлення поживного середовища. За цих умов популяція мікроорганізмів проходить певний цикл розвитку, для якого притаманна певна зміна фаз або періодів[21].

Безперервне культивування – це культивування при якому культура мікроорганізмів тривалий час підтримується в стані експоненціального росту. Безперервне культивування, є недоцільним, оскільки, нашим завданням є виробництво антибіотику у культуральному середовищі, а активне утворення антибіотику відбувається саме у стаціонарній фазі росту [21].

Тому, для забезпечення оптимальних умов для даного виробництва обираємо культивування глибинно – періодичним способом.

Ще одним конструктивним елементом біореактора – є перемішувачий пристрій.

Мішалки в найбільш загальному вигляді поділяють на швидкохідні і тихохідні. До швидкохідних відносять пропелерні і турбінні мішалки різних типів, а також спеціальні типи мішалок, наприклад дискові, лопатеві і т.п. Ці мішалки в залежності від типів лопаток (лопатеї) і способу їх встановлення можуть створювати радіальний, осьовий та радіально-осьовий потоки рідини. Швидкохідні мішалки найчастіше працюють в апаратах з відбиваючими перегородками. Відсутність перегородок призводить до завихрення рідини в апараті і утворення воронки. Головною метою є досягнення як найкращого перемішування, у даному випадку краще досягти радіального потоку рідини[22].

Використовуємо лопатеву мішалку, оскільки вона створює оптимальний потік рідини, що забезпечує оптимальні умови для культивування мікроорганізму. Найбільш простою і одночасно високоефективною є мішалка з прямими лопатями, що розташовані радіально. Плaskі лопатки можуть також бути нахилені під певним кутом відносно площини обертання мішалки, що зменшить витрати енергії і вигідно виділяє цей тип мішалки з - поміж інших [22].

Отже, культивування здійснюємо за аерації середовища (через барботер), глибинно-періодичним способом, лопатевою мішалкою за температури 37°C, при рН 6,9.

Щоб визначити який саме потрібен ферментер необхідно керуватися даними про процес культивування.

Враховуючи всі фізіолого – біохімічні особливості *S. cremeus subsp. tobramycini* 1084 та спосіб його культивування, обираємо ферментер, в якому основним конструктивним елементом є перемішуючий пристрій (лопатева мішалка), що забезпечує високу інтенсифікацію процесу.

Для забезпечення оптимальних температурних умов культивування, даний апарат має оснащуватись сорочкою, та датчиком температури.

Оскільки, за даними опорної статті [17], культивування продуцента здійснюють при рН середовища на рівні 6,9, то посівний апарат оснащуємо вбудованим рН – метром.

4.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря

Одним із важливих завдань біотехнології є одержання великої кількості стерильного повітря, необхідного для аерації під час культивування аеробних мікроорганізмів. В атмосферному повітрі, поряд з інертними газами, азотом, киснем, двоокисом вуглецю, містяться пари води і дрібнодисперсні частки. Понад 30 % (за масою) часток мають розмір 1-2 мкм і близько 50 % - менше як 0,5 мкм. До складу дисперсних часток, поряд з частками пилу, кіптяви, входять клітини і спори мікроорганізмів як у вільному, так і в сорбованому на пилових частках вигляді. Температура і вологість зовнішнього повітря, кількість у ньому часток і мікроорганізмів непостійні і залежать від пори року[22].

Найпростіший спосіб стерилізації повітря полягає у фізичному видаленні мікроорганізмів фільтрацією через волокнисті або мембранні фільтри. Процес підготовки очищеного аераційного повітря включає декілька стадій, а саме [23]:

- забір повітря з атмосфери здійснюють за допомогою вертикальної труби з повітрязабірником у найвищій точці ($H \approx 30$ м, можна й

менше) будівлі, де розміщене обладнання для стиснення та очищення повітря;

- очищення повітря від пилу ($\delta > 50\mu\text{м}$) на плоских тканиних фільтрах грубого очищення ;
- стиснення повітря в компресорах при цьому повітря нагрівається до температури 120–200 °С тут відбувається стерилізація повітря;
- стабілізацію термодинамічних показників відбувається підігріванням до температури 45–50 °С паром у відповідних теплообмінниках;
- очищення на головних та індивідуальних фільтрах. Очищення у головних ємністних набивних фільтрах до ступеня очищення $E = 95\%$. Головні фільтри, зазвичай, встановлюють поблизу ферментаційних відділень.;очищення в індивідуальних фільтрах. Повітря від головних фільтрів через трубопроводи (колектори) подається безпосередньо до індивідуальних фільтрів встановлених на ферментері, при цьому повітря очищають до ступеня очищення $E = 99,9\%$.

Організація очищення припливного повітря від пилу і шкідливих речовин здійснюється за рахунок установки фільтруючих елементів у системі підготовки повітря. [24].

У головних фільтрах для грубого очищення використовують такі фільтрувальні матеріали: грубе базальтове волокно; високообъемний нетканий фільтрувальний матеріал, або тканину Камінської. Особливістю цього матеріалу є те, що в прядильний розчин під час його виготовлення вводять антисептик гексахлорофен, тому фільтри, заповнені такою тканиною, не піддаються стерилізації; скловату[17].

Фільтри грубої очистки використовуються в якості першого ступеня очищення припливного повітря в приміщеннях з підвищеними вимогами до чистоти повітря і в якості фільтруючого обладнання в приміщеннях без підвищених вимог до якості повітря. Фільтруючим матеріалом є металева сітка або синтетична тканина. Такі фільтри є обов'язковим елементом фільтрації в будь-якій системі вентиляції, оскільки вони дозволяють вловлювати великі частинки,

потрапляючи в інші компоненти системи призводять до прискорення зносу обладнання[19].

Для подальшого проектування, як фільтр грубої очистки використовуємо фільтри ФяП. Фільтр ФяП призначені для очищення від пилу зовнішнього та рециркуляційного повітря в системах припливної вентиляції, а також у різних агрегатах. Навколишнє середовище та повітря, що фільтрується, не повинні містити агресивних газів і пар. Допустима концентрація пилу у повітрі на вході у фільтр не більше 1мг/м³ [25].

Сучасна технологія тонкого очищення повітря представлена системою високоефективного утримання фракцій, відомої у всьому світі як «High Efficiency Particulate Absorbption» (скорочено HEPA). Фільтри HEPA відносяться до фільтрів абсолютного очищення та максимально корисні як останній етап очищення повітря у системі вентиляції [26].

Основа будь-якого HEPA-фільтра – хаотично розташовані волокна різної товщини, приблизно 0,5-5 мкм. Відстань між волокнами – близько 5-50 мкм. Діаметр дрібнодисперсних частинок – у межах кількох мікрон або навіть кількох часток мікрона [27].

Для тонкої очистки повітря, для даного виробництва, обираємо фільтри HEPA – як найбільш оптимальні та продуктивні.

4.1.3. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Стерилізацію компонентів здійснюється для того, щоб знищити всі сторонні мікроорганізми та їх форм спокою. Стерилізація поживного середовища залежить від фізико-хімічних властивостей його компонентів.

Середовище для виробничого біосинтезу має такий склад, г/л [17]:

- Соеве борошно – 10;
- Глюкоза – 4;
- Крохмал – 15;
- (NH₄)₂SO₄ – 3;
- CaCO₃ – 3;

Приготування поживних середовищ здійснюється у спеціальних реакторах (збірниках), обладнаних мішалками, а стерилізують вже безпосередньо у збірниках та підготовленому ферментері.

Згідно розрахунків, виробничий біосинтез буде здійснюється у ферментері об'ємом 5 м³, що містить 3 м³ середовища. Одержання інокуляту відбувається у чотири етапи (у колбах на качалці, інокуляторі об'ємом 5л, 50л та 500 л).

Приготування і стерилізація ПС для колб

Проаналізувавши склад поживного середовища для вирощування *S. cretensis subsp. tobramycin* 1083, оскільки біотехнологічний процес проходить в асептичних умовах, їх умовно ділимо на такі композиції (залежно від режиму стерилізації певних компонентів):

Композиція А: глюкоза, соєве борошно (режим стерилізації: 112°C, 30 хв).

Композиція Б: CaCO₃ (режим стерилізації: 131°C, 60 хв).

Композиція В: NaCl, (режим стерилізації: 131°C, 60 хв).

Приготування та стерилізація композиції А

Зважаючи на те, що об'єм композиції А невеликий, тому її готуємо в окремій колбі, а стерилізувати будемо в автоклаві. Наважку соєвого борошна поміщають в колбу, наливають водопровідної води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою та ставлять на водяну баню при температурі 80 °C упродовж 40 хв. Потім до борошна додають наважку глюкози. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112 °C упродовж 30 хв.

Приготування та стерилізація композиції Б

Стерилізувати композицію Б будемо в окремій колбі, а стерилізувати будемо в автоклаві. Наважку CaCO₃ поміщають у колбу і додають водопровідну воду. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °C упродовж 60 хв.

Приготування та стерилізація композиції В

Стерилізувати композицію В будемо в окремій колбі, а стерилізувати будемо в автоклаві. Наважку NaCl поміщають у колбу і додають водопровідну воду. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °C упродовж 60 хв.

Об'єм поживного середовища для культивування в колбах на качалках становить 300 мл, тому його доцільно стерилізувати в автоклаві, у трьох колбах на 300 мл по 100 мл середовища в кожній.

Приготування та стерилізація поживного середовища для культивування в інокуляторі об'ємом 5 л

Композиція А: глюкоза, соєве борошно (режим стерилізації: 112°C, 30 хв).

Композиція Б: CaCO₃ (режим стерилізації: 131°C, 60 хв).

Композиція В: NaCl, (режим стерилізації: 131°C, 60 хв).

Приготування та стерилізація композиції А

Зважаючи на те, що об'єм композиції А невеликий, тому її готуємо в окремій колбі, а стерилізувати будемо в автоклаві. Наважку соєвого борошна поміщають в колбу, наливають водопровідної води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою та ставлять на водяну баню при температурі 80 °C упродовж 40 хв. Потім до борошна додають наважку глюкози. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112 °C упродовж 30 хв.

Приготування та стерилізація композиції Б

Стерилізувати композицію Б будемо в окремій колбі, а стерилізувати будемо в автоклаві. Наважку CaCO₃ поміщають у колбу і додають водопровідну воду. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °C упродовж 60 хв.

Приготування та стерилізація композиції В

Стерилізувати композицію В будемо в окремій колбі, а стерилізувати будемо в автоклаві. Наважку NaCl поміщають у колбу і додають водопровідну воду.

Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С упродовж 60 хв.

***Приготування і стерилізація поживного середовища для
культивування в інокуляторі об'ємом 50л***

Композиція А: глюкоза, соєве борошно (режим стерилізації: 112°C, 30 хв).

Композиція Б: CaCO₃ (режим стерилізації: 131°C, 60 хв).

Композиція В: NaCl, (режим стерилізації: 131°C, 60 хв).

Приготування та стерилізація композиції А

Наважку соєвого борошна поміщають у реактор – змішувач, наливають водопровідної води, перемішують. Соєве борошно попередньо заварюють за допомогою подачі пари в сорочку реактора-змішувача при постійному перемішуванні, щоб не допустити утворення великих грудок при температурі 80 °С упродовж 40 хв. Потім до борошна додають наважку глюкози. Розчин перемішують. Стерилізацію проводять при температурі 112 °С упродовж 30 хв у цьому ж реакторі шляхом одночасної подачі гострої пари через нижній спуск апарату і глухої – у сорочку апарату.

Приготування та стерилізація композиції Б

Стерилізувати композицію Б будемо в реакторі – змішувачі. Наважку CaCO₃ поміщають до реактора, додають водопровідну воду. Стерилізують композицію при температурі 131 °С упродовж 60 хв. Потім розчин перекачують до інокулятора.

Приготування та стерилізація композиції В

Стерилізувати композицію В будемо безпосередньо в інокуляторі. Наважку NaCl завантажують до збірника – змішувача, та додають водопровідну воду. Готовий розчин перекачують у попередньо простерилізований інокулятор.

Температура стерилізації – 131°C (тиск – 0,05 МПа), тривалість 60 хв з моменту досягнення температури стерилізації.

***Приготування і стерилізація поживного середовища для
культивування в інокуляторі об'ємом 500л***

Композиція А: глюкоза, соєве борошно (режим стерилізації: 112°C, 30 хв).

Композиція Б: CaCO_3 (режим стерилізації: 131°C, 60 хв).

Композиція В: NaCl , (режим стерилізації: 131°C, 60 хв).

Приготування та стерилізація композиції А

Наважку соєвого борошна поміщають у реактор – змішувач, наливають водопровідної води, перемішують. Соєве борошно попередньо заварюють за допомогою подачі пари в сорочку збірника при постійному перемішуванні, щоб не допустити утворення великих грудок при температурі 80 °C упродовж 40 хв. Потім до борошна додають наважку глюкози. Розчин перемішують. Стерилізацію проводять при температурі 112 °C упродовж 30 хв.

Приготування та стерилізація композиції Б

Стерилізувати композицію Б будемо в реакторі – змішувачі. Наважку CaCO_3 поміщають до реактора, додають водопровідну воду. Стерилізують композицію при температурі 131 °C упродовж 60 хв. Потім розчин перекачують до інокулятора.

Приготування та стерилізація композиції В

Стерилізувати композицію В будемо безпосередньо в інокуляторі. Наважку NaCl завантажують до збірника – змішувача, та додають водопровідну воду. Готовий розчин перекачують у попередньо простерилізований інокулятор. Температура стерилізації – 131°C (тиск – 0,05 МПа), тривалість 60 хв з моменту досягнення температури стерилізації.

***Приготування і стерилізація поживного середовища для
культивування у ферментері об'ємом 5м³***

Композиція А: крохмаль, глюкоза, соєве борошно (режим стерилізації: 112°C, 30 хв).

Композиція Б: CaCO_3 (режим стерилізації: 131°C, 60 хв).

Композиція В: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (режим стерилізації: 131°C, 60 хв).

Приготування та стерилізація композиції А

Наважку крохмалю та соєвого борошна поміщають у реактор – змішувач, наливають водопровідної води, перемішують. Крохмаль та соєве борошно попередньо заварюють за допомогою подачі пари в сорочку збірника при постійному перемішуванні, щоб не допустити утворення великих грудок при температурі 80 °C упродовж 40 хв. Потім до розчину додають глюкозу та проводять стерилізацію при температурі 112 °C упродовж 30 хв.

Приготування та стерилізація композиції Б

Стерилізувати композицію Б будемо в реакторі – змішувачі. Наважку CaCO_3 поміщають до реактора, додають водопровідну воду. Стерилізують композицію при температурі 131 °C упродовж 60 хв. Потім розчин перекачують до ферментеру.

Приготування та стерилізація композиції В

Стерилізувати композицію В будемо безпосередньо у ферментері. Наважку $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ завантажують до збірника – змішувача, та додають водопровідну воду. Готовий розчин перекачують у попередньо простерилізований ферментер. Температура стерилізації – 131°C (тиск – 0,05 МПа), тривалість 60 хв з моменту досягнення температури стерилізації.

Приготування та стерилізація титрувальних агентів

Для підтримки оптимального значення рН середовища, доцільним є внесення у технологічну схему етапу підготовки титрувальних агентів: 6% розчину NaOH та 6% розчину HCl.

Окрім додаткових стадій технологічного процесу, необхідно передбачити такі збірники:

- для приготування 6% розчину HCl;
- для приготування та стерилізації 6% розчину NaOH;

- для приготування CaCO_3 ;
- для змішування та розчинення солей.

РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Специфікація обладнання, яке зображене на апаратурній схемі, наведена в табл. 3.1.

Таблиця 3.1

Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
ПЗ – 1	Повітрозабірник	2	Пристрій забірний, обладнаний металевою сіткою для видалення механічних забруднень. Фірма: ООО «НПЦ Вектор-Кондвент». Виробник: Україна [1].
ФГО – 2	Фільтр грубої очистки повітря	2	Фільтр першого ступеня очистки типу ФЯП, Фільтруючий матеріал – мати зі скловолокна, Е = 80±5 %, продуктивність – 7000 м³/год [2].
К – 3	Компресор	1	Габарити: 1050*750*1000 mm . Маса: 400 kg . 0.7 - 1.2 м³/хв, 7-12 бар, 15 кВт [3].
ТО – 4	Теплообмінник-охолоджувач	2	Витрата: до 640 м³/год; Робочий тиск: 140 атм. Температура: -195 ° С- +220 °С; Нержавіюча сталь AISI 316; Виробник: Швеція [4].
Р – 5	Ресивер	1	Ресивер повітряний фірми Setkom (Туреччина) , об'єм 2000 л, вага 650 кг [5].
ТН – 6	Теплообмінник-нагрівач	2	Корпус виконаний з оцинкованої сталі, колектори виконані з мідної труби, теплообмінні пластини з алюмінію. Монтажний розмір 1000 x 500 (мм), довжина 200 мм, приєднання труб муфтове G1. Потужність теплообмінника складає 80 кВт, при температурі теплоносія 70°C.[6].
Ф – 7	Фільтр тонкої очистки	1	Клас очищення: EN 779: H10-H14 Фільтроматеріал: мікроскловолокно Рамка: МДФ, алюмінієвий, оцинкований, нержавіючий профіль Клас фільтрації від H10 до U16. Ступінь очищення повітря фільтром становить 99,999 % [7].

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.16 КР ПЗ</i>		
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>				
<i>Розробник</i>	<i>Возна А.В.</i>				РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ	<i>Літера</i>	<i>Аркш</i>
<i>Керівник</i>	<i>Красінська В.О.</i>						<i>Аркшів</i>
<i>Н. контр</i>							<i>2</i>
<i>Консульт</i>							<i>57</i>
<i>Зав. каф.</i>	<i>Стадніков В.П.</i>					<i>Кафедра БТМ</i>	

Закінчення таблиці 3.1

P3-8	Реактор – змішувач	1	Реактор-змішувач об'ємом 15л, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (100 об/хв), виготовлений зі сталі 12X18H10T. Виробник: Україна [8].
P3-9	Реактор – змішувач	1	
P3-14	Реактор – змішувач	1	Реактор-змішувач об'ємом 20л[8]. Реактор-змішувач об'ємом 200л Конструкція реактора дозволяє працювати як при вакуумі, так і при тиску до 4 атмосфер. Сорочка нагріву забезпечує нагрівання продукту до 160 градусів Цельсія. Виробник: ХимМикс Країна виробник: Україна [9].
P3-15	Реактор – змішувач	1	Реактор-змішувач об'ємом 200л Конструкція реактора дозволяє працювати як при вакуумі, так і при тиску до 4 атмосфер. Сорочка нагріву забезпечує нагрівання продукту до 160 градусів Цельсія. Виробник: ХимМикс Країна виробник: Україна [10].
УБС-10	Установка безперервної стерилізації	1	Установка безперервної стерилізації, продуктивність 5 м ³ /год. Установка складається із реактора-змішувача, колонки для нагрівання поживного середовища та теплообмінника труба у трубі.
НВ-12	Насос відцентровий	1	Циркуляційний насос Grundfos Насос відцентровий герметичний, матеріал чугун. Продуктивність від 3,2 м ³ /год, Максимальний тиск – 10бар. Виробник: Данія[11].
НВ-13	Насос відцентровий	1	
НВ-22	Насос відцентровий	1	
ІН-16	Інокулятор	1	Біореактор геометричний об'єм 50л та 500л, швидкість перемішування 20–1500об/хв. Контроль температури, рН, тиску Необхідне контрольно-вимірювальне обладнання Система аерації Система видалення піни Адаптований для CIP/SIP [12].
ІН-18	Інокулятор	1	Біореактор геометричний об'єм 500л, швидкість перемішування 20–1500об/хв. Контроль температури, рН, тиску Необхідне контрольно-вимірювальне обладнання Система аерації Система видалення піни Адаптований для CIP/SIP [12].

Ф-17 Ф-19 Ф-21	Індивідуальний фільтр очистки повітря	3	Стерилізуючі фільтри з фторопласта. Ступінь очищення повітря фільтром становить 99,999 %.
ФР-20	Ферментер	1	Об'єм – 5000л.. Нержавіюча сталь AISI 316 для всіх поверхонь, що контактують із продуктом, AISI 304 - для поверхонь, що не контактують із продуктом. Співвідношення діаметра та висоти: 1: 2,5-3. Розрахунковий тиск у ємності: 0,3 МПа, розрахунковий тиск у сорочці: 0,35 МПа. Торосферичне дно без застійних зон. Діапазон робочих температур – від кімнатної температури +8°C до +60°C. Максимальна робоча температура – до 135°C. Підсвічування внутрішнього обсягу ферментера [13].

1. Вектор-Кондвент [Електронний ресурс] // Режим доступу:
<http://www.condvent.ru/>
2. ФІЛЬТР ФЯР [Електронний ресурс] // Режим доступу:
https://ventilator.ua/ua/product/filtr_fyar/#techincal
3. Винтовые компрессоры KESHIDI [Електронний ресурс] // Режим
доступу: https://compressor.dp.ua/vintovye-kompressory-keshidi?utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=g&utm_content=526420020199&utm_term=%D0%BA%D0%BE%D0%BC%D0%BF%D1%80%D0%B5%D1%81%D0%BE%D1%80%20%D0%BF%D1%80%D0%BE%D0%BC%D0%B8%D1%81%D0%BB%D0%BE%D0%B2%D0%B8%D0%B9&gclid=CjwKCAiA78aNBhAlEiwA7B76p1SeCNNdawIxyMW8ErUKDO3L6LQ6D_1oAHCJL7mCymJQnIuBq1xfSBoClnwQAvD_BwE
4. Паяные теплообменники Swep [Електронний ресурс] // Режим
доступу: https://termoprom.com.ua/produkt/heat-exchangers/swep.php?gclid=cjwkcaia78anbhaleiwa7b76p4phx1_vluisowtuzsxn6nmoifxogg9frekvxufc5s5zb8ddburkbocczkqavd_bwe
5. Ресивер Setkom 2000 LT/ DIK TANK [Електронний ресурс] // Режим
доступу: https://kma-ukraine.com.ua/ua/p1482437688-resiver-setkom-2000.html?source=merchant_center&utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=MD_Merchant_Smart_Kompresory_UA&gclid=CjwKCAiA78aNBhAlEiwA7B76p_G8KF1hCbDZW7_r9tfY77mMQe37X-7ZGtKO-E0ZcmSrLUtuPL0VCBoCKPQQAvD_BwE

6. Система підігріву повітря [Електронний ресурс] // Режим доступу: https://www.galactic.kiev.ua/pages/painting_cameras_equipment/air_heating_system.php
7. Фильтр тонкой очистки воздуха [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://tehnofilter.ub.ua/ru/goods/view/6364274/all/filtr-tonkoy-ochistki-vozduha-ftov-hepa-hepa/>
8. Реактори-змішувачі [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://prom.ua/ua/p1359779236-laboratornyj-reaktor-litrov.html?&primelead=MC41>
9. Реактор гомогенізатор 40 літрів [Електронний ресурс] // Режим доступу: https://prom.ua/ua/p1359773060-reaktor-gomogenizator-litrov.html?token=v2%3AGb2OYxaXv8c8XAkNskF4YCqvRJ4E9kk5XgNQkM2UsKWgwwvdmSYp_nhrOBGWqWM2LsSaNgMKDPNxbWLKFFdp8_gnxexQ1cUYPBg7k3VWVW0qPBaD-uKw&campaign_id=2216270&product_id=1359773060&source=prom%3Aalso_buying&locale=uk&primelead=MC41&from_spa=true
10. Реактор 250 літрів [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://prom.ua/ua/p1359769753-reaktor-250-litrov.html?&primelead=MC41>
11. Насос Grundfos UPS [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://modernsys.com.ua/tsirkulyatsionnyy-nasos-grundfos-ups-25-60-130-19121.html>
12. ЖИДКОФАЗНЫЕ БИОРЕАКТОРЫ – ФЕРМЕНТЕР – ФЕРМЕНТАТОР [Електронний ресурс] // Режим доступу: https://promill.com.ua/%d0%bf%d1%80%d0%be%d0%b4%d1%83%d0%ba%d1%82%d1%8b/%d0%b6%d0%b8%d0%b4%d0%ba%d0%be%d1%84%d0%b0%d0%b7%d0%bd%d1%8b%d0%b5-%d0%b1%d0%b8%d0%be%d1%80%d0%b5%d0%b0%d0%ba%d1%82%d0%be%d1%80%d1%8b-%d1%84%d0%b5%d1%80%d0%bc%d0%b5%d0%bd%d1%82%d0%b5%d1%80/?gclid=CjwKCAiA78aNBhAlEiwA7B76py8TJbXbsm82SCJ7Bpyrmj76CWooGxjVIzjxF1zFCyJ5sb9riorlihoCmgEQAvD_BwE
13. Промышленные ферментеры от компании Biorus [Електронний ресурс] // Режим доступу: [https://bio-rus.ru/oborudovanie/fermenteryi-i-bioreaktoryi-\(laboratornyie-i-promyshlennyye\)/promyshlennyye-fermenteryi-i-bioreaktoryi-\(-kitaj\)/obrazczyi-ustanovlennogo-oborudovaniya.html](https://bio-rus.ru/oborudovanie/fermenteryi-i-bioreaktoryi-(laboratornyie-i-promyshlennyye)/promyshlennyye-fermenteryi-i-bioreaktoryi-(-kitaj)/obrazczyi-ustanovlennogo-oborudovaniya.html)

РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

ДР 1. Підготовка аераційного повітря

Повітря, яке використовується для аерації у процесі культивування посівного матеріалу в інокуляторі та в процесі біосинтезу в ферментері, повинно бути стерильним та мати температуру 30–35°C.

Перед тим, як повітря потрапляє до ферментеру, воно проходить повну очистку та стерилізацію, в результаті якої звільняється від мікроорганізмів. В ферментер очищене повітря подається через барботер.

ДР 1.1. Забір атмосферного повітря

Забір повітря здійснюється повітрозбірником (ПЗ-1) Повітря збирають з висоти приблизно 20-30 м.

Потім повітря через повітрозабірну шахту під дією компресора потрапляє до фільтру попереднього очищення (ФГО-2).

ДР 1.2. Очищення від пилу і механічних часток.

На стадії попереднього очищення повітря видаляється основна маса великих частинок пилу діаметром 150-300 мкм. В якості фільтрів попереднього очищення використовують фільтри грубої очистки – ФЯП. Який складається з рамки, виготовленої з оцинкованої сталі, усередині якої покладений об'ємний фільтруючий матеріал (поліуретан) (ФГО-2).

Ефективність очищення повітряними фільтрами ФЯП становить 80 %.

ДР 1.3. Стиснення повітря

Стиснення повітря здійснюється у компресорі (К-3) при тиску 0,35–0,5 МПа, при цьому температура може підніматися до 200°C.

ДР 1.4. Охолодження та видалення вологи

Повітря «переохолоджують» до температури 25–40 °C в теплообміннику-охолоджувачі (ТО-4). При охолодженні стисненого повітря випадає 50 – 70 %

					НУХТ БТЕК 04.01.16 КР ПЗ				
Зм	Арк.	№ документа	Підпис		РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	Літера	Аркш	Аркшів	
Розробник	Возна А.В.						2	57	
Керівник	Красінська В.О.								
Н. контр									
Консульт									
Зав. каф.	Стадніков В.П.					Кафедра БТМ			

вихідної вологи, яка відділяється вологовідділювачами.

ДР 1.5 Стабілізація та нагрівання повітря

Для забезпечення надійної роботи головного і індивідуального фільтрів, повітря нагрівають до температури до 60°C в теплообміннику-нагрівачі (ТН-5).

ДР 1.6. Очищення в головному фільтрі

Подальше очищення повітря відбувається у головному фільтрі (Ф-7). Для головних фільтрів використовується фільтр ФТО-750 з ефективністю $E = 99,92 \%$.

ДР 1.7. Очищення в індивідуальному фільтрі

Для індивідуального очищення повітря використовується фільтр тонкої очистки Ф-17, Ф-19, Ф-21. Стерилізацію фільтруючого матеріалу проводять парою при температурі 145 °С. Отримуємо стерильне аераційне повітря зі ступенем очищення – 99,9999 %.

ДР 2. Приготування та стерилізація титрувальних агентів

ДР 2.1 Підготовка і стерилізація титрувального агенту NaOH для інокулятора 50л.

Для корегування рН необхідно приготувати титрувальний розчин з розрахунку 2мл/л культуральної середовища.

$$m(\text{NaOH}) = \frac{60 \times 6}{100} \approx 3,6 \text{ г (потрібно для приготування 6 \% NaOH об'ємом 60мл)}$$

На технічних вагах зважують 3,6г NaOH. Наважку поміщають в колбу об'ємом 150 мл, і додають 60 мл водопровідної води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С упродовж 60 хв.

ДР 2.2 Підготовка і стерилізація титрувального агенту NaOH для інокулятора 500л.

Для корегування рН необхідно приготувати титрувальний розчин з розрахунку 2мл/л культуральної рідини.

$$m(\text{NaOH}) = \frac{600 \times 6}{100} \approx 36 \text{ г (потрібно для приготування 6 \% NaOH об'ємом 600мл)}$$

На технічних вагах зважують 36 г NaOH. Наважку поміщають у колбу об'ємом 1500 мл, і додають 600 мл водопровідної води, перемішують. Закривають

колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С упродовж 60 хв.

ДР 2.3 Підготовка і стерилізація титрувального агенту NaOH для ферментера 5м³.

Для корегування рН необхідно приготувати титрувальний розчин з розрахунку 2мл/л культуральної рідини.

$$m(\text{NaOH}) = \frac{6000 \times 6}{100} \approx 360 \text{ г (потрібно для приготування 6 \% NaOH об'ємом 6000 мл)}$$

На технічних вагах зважують 360 г NaOH. Наважку поміщають в реактор – змішувач об'ємом 15л, і додають 6л водопровідної води, перемішують. Розчин стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С упродовж 60 хв.

ДР 2.4 Підготовка стерильного титрувального агенту HCl для інокулятора 50л.

Стерильний розчин HCl готують змішуванням концентрованої HCl з стерильною дистильованою водою в асептичних умовах.

Розрахунок кількості 36 % HCl необхідної для приготування титрувального агента (концентрацією 6 %, об'ємом 60мл):

$$0,36x = 0,06 \times 60$$

$$0,36x = 3,6$$

$$x = 10 \text{ мл (36\% – ї HCl)}$$

Розрахунок кількості стерильної води необхідної для приготування 60 мл

6 % HCl:

$$60 - 10 = 50 \text{ мл (стерильної дистильованої H}_2\text{O)}$$

Приготування кислоти відбувається у стерильній колбі об'ємом 150мл.

В асептичних умовах відміряють 10 мл концентрованого 36% розчину HCl, та поміщають в стерильну колбу об'ємом 150 мл, і додають 50 мл стерильної дистильованої води, ретельно перемішують.

ДР 2.5 Підготовка стерильного титрувального агенту HCl для інокулятора 500л.

Стерильний розчин HCl готують змішуванням концентрованої HCl з стерильною дистильованою водою в асептичних умовах.

Розрахунок кількості 36 % HCl необхідної для приготування титрувального агента (концентрацією 6 %, об'ємом 600мл):

$$0,36x = 0,06 \times 600$$

$$0,36x = 36$$

$$x = 100 \text{ мл (36\% – ї HCl)}$$

Розрахунок кількості стерильної води необхідної для приготування 60 мл 6 % HCl:

$$600 - 100 = 500 \text{ мл (стерильної дистильованої H}_2\text{O)}$$

Приготування кислоти відбувається у стерильній колбі об'ємом 1500мл.

В асептичних умовах відміряють 100 мл концентрованого 36% розчину HCl, та поміщають в стерильну колбу об'ємом 1500 мл, і додають 500 мл стерильної дистильованої води, ретельно перемішують.

ДР 2.6 Підготовка стерильного титрувального агенту HCl для ферментера 5м³.

Стерильний розчин HCl готують змішуванням концентрованої HCl з стерильною дистильованою водою в асептичних умовах.

Розрахунок кількості 36 % HCl необхідної для приготування титрувального агента (концентрацією 6 %, об'ємом 6000мл):

$$0,36x = 0,06 \times 6000$$

$$0,36x = 360$$

$$x = 1000 \text{ мл (36\% – ї HCl)}$$

Розрахунок кількості стерильної води необхідної для приготування 60 мл 6 % HCl:

$$6000 - 1000 = 5000 \text{ мл (стерильної дистильованої H}_2\text{O)}$$

Приготування кислоти відбувається у стерильному реакторі – змішувачі об'ємом 15л.

В асептичних умовах відміряють 1л концентрованого 36% розчину HCl, та поміщають у реактор – змішувач об’ємом 15л, і додають 5л стерильної дистильованої води, ретельно перемішують.

ДР 3. Приготування та стерилізація поживного середовища

ДР 3.1. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалці.

Розрахунок кількостей компонентів для приготування середовища об’ємом 3 л для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках (табл.4.1.)

Таблиця 4.1.

Склад композицій для стерилізації компонентів для вирощування в посівного матеріалу в колбах на качалках

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента в 3 л середовища, г	Композиція	Об’єм композиції, л
Глюкоза	30	90	А	1
Соєве борошно	30	90		
Вода		1(л)		
CaCO ₃	5	15	Б	1
Вода		1(л)		
NaCl	5	15	В	1
Вода		1(л)		
Разом:		3		3

Усі композиції готують у лабораторному посуді і стерилізуються в автоклаві

ДР 3.1.1. Приготування та стерилізація композиції А.

На технічних вагах зважують 90 г соєвого борошна. Наважку поміщають у колбу об’ємом 2000 мл, і додають 1000 мл водопровідної води, перемішують, та ставлять на водяну баню, з магнітною мішалкою при температурі 80 °С упродовж 40 хв. Потім зважують 90 г глюкози. Наважку завантажують до колби та перемішують. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізують в автоклаві при температурі 112 °С упродовж 30 хв.

ДР 3.1.2 Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 15 г CaCO_3 . Наважку поміщають у колбу об'ємом 2000 мл, і додають 1000 мл водопровідної води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°C , 60 хв.

ДР 3.1.3 Приготування та стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 15 г NaCl . Наважку поміщають у колбу об'ємом 2000 мл, і додають 1000 мл водопровідної води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°C , 60 хв.

ДР 3.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для інокулятора 50 л.

Для одержання посівного матеріалу на даному етапі необхідно приготувати 30 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 30 л поживного середовища наведено в (табл. 4.2.).

Для засіву поживного середовища в інокулятор необхідно внести 3 л рідкого посівного матеріалу, тому сумарна кількість (об'єм) води для композиції становить 27 л (з урахуванням конденсату)).

Таблиця 4.2.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 30 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента в 30 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Глюкоза	30	900	А	10
Соєве борошно	30	900		
Вода		9(л)		
Конденсат		1(л)		

CaCO ₃	5	150	Б	0,5
Вода		0,5(л)		
NaCl	5	150	В	16,5
Вода		15(л)		
Конденсат		2(л)		
Разом:		27		27

ДР 3.2.1. Приготування та стерилізація композиції А.

На технічних вагах зважують 900 г соєвого борошна. Наважку поміщають до реактора – змішувача об’ємом 20л, і додають 9л водопровідної води, перемішують, заварюють при температурі 80 °С упродовж 40 хв. Потім зважують 900 г глюкози. Наважку завантажують до реактора та перемішують. Стерилізують при температурі 112 °С упродовж 30 хв подачею пари через нижній спуск і у сорочку апарату.

ДР 3.2.2 Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 150 г CaCO₃. Наважку поміщають до колби об’ємом 1 л, і додають 0,5 л водопровідної води, перемішують. Стерилізують в автоклаві при температурі 131°С, 60 хв.

ДР 3.2.3 Приготування та стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 150 г NaCl. Наважку поміщають у збірник – колбу об’ємом 2 л, і додають 1 л водопровідної води, перемішують. Тоді, готовий розчин за допомогою конектора заливають до інокулятора (весь інший об’єм води заливають безпосередньо до інокулятора = 15,5 л). Стерилізація композиції В буде відбуватися безпосередньо в інокуляторі. Подача пари відбувається в середину апарату. Одночасно в сорочку апарату подають глуху пару. Температура стерилізації – 131°С, тривалість – 60 хв з моменту досягнення температури стерилізації.

ДР 3.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для інокулятора 500 л.

Для одержання посівного матеріалу на даному етапі необхідно приготувати 299 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 299 л поживного середовища наведено в (табл. 4.4.).

Для засіву поживного середовища в інокулятор необхідно внести 27 л рідкого посівного матеріалу, тому сумарна кількість води для композиції становить 272 л (з урахуванням конденсату)).

Таблиця 4.4

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 299 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента в 299 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Глюкоза	30	8970	А	100
Соеве борошно	30	8970		
Вода		90(л)		
Конденсат		10(л)		
CaCO ₃	5	1495	Б	3
Вода		3(л)		
NaCl	5	1495	В	169
Вода		154 (л)		
Конденсат		17 (л)		
Разом:		272		272

ДР 3.3.1. Приготування та стерилізація композиції А.

На технічних вагах зважують 9кг соєвого борошна. Наважку поміщають до реактора – змішувача об'ємом 200л, і додають 100л водопровідної води, перемішують, та запарюють при температурі 80 °С упродовж 40 хв. Потім зважують 9 кг глюкози. Наважку завантажують до реактора та перемішують. Стерилізують при температурі 112 °С упродовж 30 хв подачею пари через нижній спуск і у сорочку апарату.

ДР 3.3.2 Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 1500 г CaCO₃. Наважку поміщають до бутля об'ємом 4л, і додають 3л водопровідної води, перемішують. Стерилізують в автоклаві при температурі 131°С, 60 хв.

ДР 3.3.3 Приготування та стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 1500 г NaCl. Наважку поміщають у бутль об'ємом 5 л, і додають 4,5 л водопровідної води, перемішують. Тоді, готовий

розчин за допомогою конектора заливають до інокулятора (весь інший об'єм води заливають безпосередньо до інокулятора = 149,5 л). Стерилізація композиції В буде відбуватися безпосередньо в інокуляторі. Подача пари відбувається через барботер апарату. Одночасно в сорочку апарату подають глуху пару. Температура стерилізації – 131°C, тривалість – 60 хв з моменту досягнення температури стерилізації.

ДР 3.4. Приготування та стерилізація поживного середовища для ферментера 5м³.

Для одержання посівного матеріалу на даному етапі необхідно приготувати 2956 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 2956 л поживного середовища наведено в (табл. 4.4.).

Для засіву поживного середовища в інокулятор необхідно внести 269 л рідкого посівного матеріалу, тому сумарна кількість води для композиції становить 2687 л (з урахуванням конденсату)).

Таблиця 4.4.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 2956 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента в, 2956л середовища, кг	Композиція	Об'єм композиції, л
Крохмаль	15	44	А	2687
Глюкоза	4	12		
Соеве борошно	10	29		
CaCO ₃	3	9		
(NH ₄) ₂ SO ₄	3	9		
Вода		2418(л)		
Конденсат		269(л)		
Разом:		2687		2687

ДР 3.4.1. Заварювання крохмалю та соєвого борошна композиції А.

Через об'ємно – ваговий дозатор зважують 44 кг крохмалю та 29 кг соєвого борошна. Наважку поміщають у реактор – змішувач УБС об'ємом 5м³. Наливають 2400 л води водопровідної, перемішують. Крохмаль та соєве

борошно попередньо заварюють за допомогою подачі пари в сорочку збірника при постійному перемішуванні, щоб не допустити утворення великих грудок при температурі 80 °С упродовж 40 хв.

ДР 3.4.2. Змішування компонентів та стерилізація

Через об'ємно – ваговий дозатор зважують 12 кг глюкози, 9кг CaCO_3 , 9кг $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Стерилізувати готову композицію будемо в УБС, температура стерилізації – 130°C, тривалість витримання – 40 хв, тиск 0.3 – 0.6МПа.

ТП 3. Підготовка посівного матеріалу

ТП 3.1. Підтримання колекційної культури

Колекційну культуру *S. cretensis subsp. tobramycinii* 1084 зберігають у пробірках зі скошеним ПС Гаузе при температурі 4°C. Пересіви здійснюють кожні 3-4 місяці. Всі роботи з колекційною культурою проводять строго в асептичних умовах.

ТП 3.2. Одержання робочої культури на агаризованому середовищі

Для отримання спорового матеріалу культуру *S. cretensis subsp. tobramycinii* 1084 вирощують протягом 8 днів при 37 ° С на гліцериннітратному агаризованому середовищі Лінденбайна.

ТП 3.3. Вирощування культури на агаризованому середовищі

Отримані ізолювані колонії (від ТП3.2) пересівають в пробірки зі скошеним середовищем Лінденбайна (одна ізолювана колонія використовується для засіву однієї пробірки). У пробірки пересівають ізолювані колонії, що знаходяться на відстані не менше 1 см. Тривалість вирощування – 48 год.

ТП 3.4. Вирощування культури в колбах на качалках

Для вирощування рідкого посівного матеріалу, у 20 стерильних качалочних колбах об'ємом 750мл. Готові композиції А, Б та В (від ДР3.1.1, ДР3.1.2 та ДР3.1.3) в асептичних умовах, змішую у бутль об'ємом 5л. Тоді, в асептичних умовах наливають по 150 мл посівного середовища (у 20 стерильних колб).

У пробірку з робочою культурою *S. cremeus subsp. tobramycini* 1084, вирощеною на середовищі Лінденбайна, вносять 5 мл стерильного фізіологічного розчину, суспендують клітини (змивають культуру), піпеткою відбирають одержану суспензію і вносять у колби з розлитим поживним середовищем. Для засіву однієї колби використовують бактеріальну суспензію, одержану з однієї пробірки.

Вирощування *S. cremeus subsp. tobramycini* 1084 ведуть у колбах на круговій качалці (240 об/хв) при температурі $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ впродовж 48 год. Після чого посівний матеріал з колб переносять у стерильну засівну колбу об'ємом 5л. З колби відбирають пробу для мікробіологічного та технологічного контролю.

ТП 3.5. Вирощування в інокуляторі 50 л

У попередньо простерилізований інокулятор (ІН-) з 16,5 л композиції В (від ДРЗ.2.3) через засівну колбу вносять композицію А (від ДРЗ.2.1) та композицію Б (від ДРЗ.2.3). Охолоджують компоненти суміші в інокуляторі шляхом подачі холодної води в рубашку апарата. Після цього вносять посівний матеріал (від ДРЗ.3.4.). Вмикають мішалку, температуру $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ підтримують подачею пари або холодної води в сорочку, тривалість культивування 72 год, а також підтримують постійну аерацію середовища через барботер інокулятора.

ТП 3.6. Вирощування в інокуляторі 500 л

У попередньо простерилізований інокулятор (ІН-) зі 169 л композиції В (від ДРЗ.3.3) насосом перекачують стерильну композицію А (від ДРЗ.3.1), та через засівну колбу, стерильно вносять композицію Б (від ДРЗ.3.2). Доводять значення рН до оптимального (рН 6.9). Охолоджують компоненти суміші в інокуляторі шляхом подачі холодної води в рубашку апарата. Потім, через трубу перетискування подають посівний матеріал. Вмикають мішалку, температуру $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ підтримують подачею пари або холодної води в сорочку, тривалість культивування 72 год, а також підтримують постійну аерацію середовища через барботер інокулятора.

ТП 4. Біосинтез

ТП 4.1. Виробниче культивування

Виробниче культивування здійснюють у ферментері об'ємом 5м³ (ФР-20)(робочий об'єм – 3000 л). У попередньо простерилізований ферментер подають композицію А (від ДР 3.4.1) від УБС. Охолоджують компоненти суміші у ферментері. Далі через трубу перетискання подається посівний матеріал (від ТП 3.6). Перемішуючим пристроєм слугує лопатева мішалка, якою обладнаний ферментер. Вмикають мішалку, температура 37±0,5°C, тривалість культивування 144 год, а також підтримують постійну аерацію середовища через барботер.

Культивування припиняють за досягнення в культуральній рідині концентрації антибіотику 4 г/л.

Кожні 8 год з ферментера відбирають 20 мл зразку культуральної рідини для мікробіологічного аналізу.

РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

У процесі біосинтезу проводять періодичний контроль таких параметрів: концентрація біомаси, джерела вуглецю, азоту та активність антибіотику. Також проводять постадійний контроль таких параметрів як: мікробіологічний контроль, концентрація вуглецю та азоту в середовищі, а також активність апраміцину.

7.1. Мікробіологічний контроль

Зважаючи на те, що культивування *S. cremeus subsp. tobramycini* 1084 з метою одержання антибіотиків проводиться в асептичних умовах, необхідно проводити мікробіологічний контроль на усіх етапах, для того щоб впевнитись у відсутності контамінації.

Кожні 4 год з ферментера відбирають 20 мл зразку культуральної рідини для аналізу.

Мікробіологічний контроль здійснюється двома шляхами: мікроскопіюванням та висів на агаризовані поживні середовища.

Мікроскопіювання проводять у світловому мікроскопі. Для приготування препарату на чисте знежирене предметне скло, в асептичних умовах, за допомогою стерильної петлі наносять невелику краплину культуральної рідини. Краплю, яка містить мікроорганізми, розподіляють по склу за допомогою бактеріальної петлі (діаметр мазка близько 1 см). Мазок висушують без нагрівання, при кімнатній температурі, до повного випаровування вологи. Потім на абсолютно сухий препарат за допомогою скляної палички наносять 1-2 краплини імерсійної олії. У полі зору мають спостерігатися лише клітини біологічного агента *S. cremeus subsp. tobramycini* 1084: морфологічні ознаки. ланцюжки спор спіральні, спіралі розтягнуті, з 2-6 оборотами, поверхня спор гладка[28].

					НУХТ БТЕК 04.01.16 КР ПЗ		
Зм	Арк.	№ документа	Підпис				
Розробник	Возна А.В.				РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	Літера	Аркш
Керівник	Красінська В.О.						2
Н. контр							57
Консульт						Кафедра БТМ	
Зав. каф.	Стадніков В.П.						

7.2.1. Концентрація амінного азоту

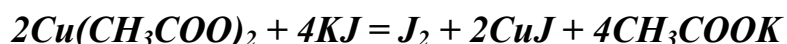
Для культивування *S. cretensis subsp. tobramycinii* 1084 основним джерелом азоту у середовищі – є соєве борошно.

В основі методу лежить здатність амінокислот утворювати розчинні з'єднання з міддю, кількість якої визначають йодометричним титруванням. Суть методу полягає в тому, що до слабо лужного розчину амінокислот додають надлишок суспензії ортофосфату міді $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ у боратному буферному розчині. При цьому утворюються розчинні мідні з'єднання. Для їхнього відділення від нерозчинного ортофосфату міді суміш фільтрують. Потім до фільтрату прибавляють оцтову кислоту, яка відщеплює мідь від комплексного з'єднання і перетворюється в ацетат міді.

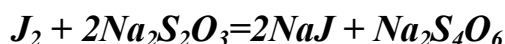
Принцип методу

Здатність амінокислот утворювати розчинні з'єднання з міддю, кількість якої визначають йодометричним титруванням. Суть методу полягає в тому, що до слабо лужного розчину амінокислот додають надлишок суспензії ортофосфату міді $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ у боратному буферному розчині. При цьому утворюються розчинні мідні з'єднання. Для їхнього відділення від нерозчинного ортофосфату міді суміш фільтрують. Потім до фільтрату прибавляють оцтову кислоту, яка відщеплює мідь від комплексного з'єднання і перетворюється в ацетат міді.

Для визначення кількості міді, яка брала участь в реакції, до розчину додають йодид калію:



В результаті реакції виділяється йод в кількості, еквівалентному кількості міді, а відповідно, і азоту амінокислот, який відтитровують розчином тіосульфату натрію:



1 см³ 0,01 н розчину тіосульфату натрію відповідає 0,28 мг амінного азоту, оскільки один атом міді реагує з двома молекулами амінокислот, утворюючи з'єднання типу $\text{Cu}(\text{RCHNH}_2\text{COO})_2$.

Техніка аналізу

В мірну колбу місткістю 50 см³ піпеткою вносять 5 см³ культуральної рідини, додають 3-4 краплини індикатору тімолфталейну і по краплям розчин гідроксиду натрію концентрацією 0,1 моль/дм³ до появи блідно-блакитного забарвлення. До слабо лужного розчину із циліндра при перемішуванні порціями обережно приливають 30 см³ суспензії ортофосфату міді, вміст колби доводять дистильованою водою до мітки, перемішують і фільтрують через паперовий фільтр. Фільтрат повинен бути прозорим.

10 см³ абсолютно прозорого фільтрату піпеткою переносять в фарфорову чашку або конічну колбу, додають 0,5 см³ 80%-ї оцтової кислоти (підкислюють) і 10 см³ розчину йодату калію. Після перемішування йод, що виділився, титрують із мікробюретки розчином тіосульфату натрію концентрацією 0,01 моль/дм³. В кінці титрування до розчину додають 1-2 краплини розчину крохмалю. Кінець титрування визначають по зникненню синього забарвлення від однієї краплі тіосульфату натрію[29].

При прийнятому розбавленні кількість амінного азоту в 10 см³ фільтрату отримують множенням маси тіосульфату натрію, що пішла на титрування, на 0,28. Це відповідає з урахуванням розчинення 1 см³ сусла. Вміст амінного азоту X розраховують за рівнянням:

$$x = \frac{a \times 0,28 \times b \times 10 \times 100}{50} \text{ мг в } 100\text{см}^3$$

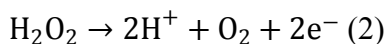
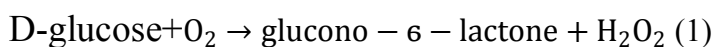
де а – розчину тіосульфату натрію концентрацією 0,01 моль/дм³, який пішов на титрування, см³; б – об'єм дослідної рідини, взятий на аналіз, см³.

7.2.2. Концентрація вуглецю

Для культивування *S. cremeus subsp. tobramycini* 1084 у середовищі крохмаль є основним джерелом вуглецю.

Найбільш раціональним методом визначення вмісту крохмалю вважається поляриметричні методи. Метод визначення заснований на розчиненні крохмалю і вимірі величини кута обертання площини поляризації світла цукровмісним розчином. Кут обертання площини поляризації пропорційний концентрації оптично активної речовини.

Для визначення крохмалю використовують біохімічний аналізатора YSI 2700 Select, заснований на ферментативному окисненні наявної глюкози в зразку з наступним електрохімічним окисненням утвореного H_2O_2 на платиновому електроді:



Це створювало струм пробного сигналу, корелюваний із величиною глюкози в зразку. Отримані результати є середніми значеннями триразових вимірювань

7.2.3. Визначення апраміцину

Для визначення апраміцину проводять виділення його з дослідного зразку культуральної рідини.

З метою виділення апраміцину проводять його сорбцію з нативного розчину (обробленої щавлевою кислотою і відфільтрованої від міцелію культуральної рідини) з $\text{pH} = (6,7-6,9)$ на Карбоксильному катіоніті КБ-2 в сольовій формі з наступною хроматографічною очисткою двоколонковим методом. Десорбцію апраміцина проводять шляхом ступінчастої елюції розчинами $(0,19-0,22)$ н. аміаку. Елюат концентрують у вакуумі до концентрації $(100-150)$ мг / мл і проводять гідроліз антибіотика при 100°C в $(0,1-0,3)$ н. розчину їдкого натру, при цьому карбамоїлтобраміцин перетворюється в апраміцин. Апраміцин відокремлюють з реакційної суміші сорбцією на Карбоксильному катіоніті КБ-2 з подальшою десорбцією розведеним розчином аміаку. Отриманий розчин апраміцину концентрують у вакуумі, додають $(24,0-24,2)$ 5-й розчин сірчаної кислоти до $\text{pH} 4,5$ і апраміцину сульфат осаджують додаванням надлишку метанолу.

Для визначення апраміцину, аміноглікозидного антибіотика, що застосовується у ветеринарній медицині, застосовують високоефективний рідинно-хроматографічний метод, що застосовує попередню дериватизацію колонки за допомогою о-фталальдегіду (OPA) та 2-меркаптооцтової кислоти.

Хроматографічне розділення проводять за допомогою іонно-парної ВЕРХ з використанням колони з оберненою фазою C18, Synergi Hydro (150 мм x 4,6 мм x 4 мкм) та рухомої фази, що складається з 0,005 моль / л октаносульфонату натрію в суміші ацетонітрил: вода: оцтова кислота (45: 55: 2) зі швидкістю потоку 1,0 мл/хв; УФ-детектор працював при 332 нм. Розроблений метод був затверджений згідно з офіційними рекомендаціями, продемонструвавши надійність, селективність та лінійність для діапазону концентрацій від 0,02 до 0,05 мг / мл, точність (з RSD <2. 0% як для внутрішньої, так і міжденної точності (середнє відновлення 99,33%) та детективності (квантифікація та межі виявлення 0,08 та 0,02 мкг / мл відповідно). Апраміцин аналізують як за пропонованим методом, так і за офіційним мікробіологічним методом, де всі отримані результати знаходяться у прийнятному діапазоні (від 95% до 105% від міченої вартості апраміцину). Обидва методи статистично порівнюють за допомогою t-тесту, який не дав істотних відмінностей ($\alpha = 0,05$), підтверджуючи тим самим еквівалентність методів[30].

ЛІТЕРАТУРА

1. Груздова Т.В., Юхновська Т.М. Перспективи розвитку сфери фармацевтики та біотехнологій із приєднанням України до угоди про асоціацію з Європейським союзом. *Економіка*. 2014, 3(50): 63-77.
2. Стецько Т.І., Музика В.П., Гунчак В.М. Критично важливі антимікробні препарати для ветеринарної медицини. *Scientific Messenger LNUVMB*, 2018, 20(87): 19-26.
3. Байдевятова Ю. В. Ефективність застосування антимікробних препаратів Апраміцин 50% і Цефтіоклін при лікуванні телят, хворих на колібактеріоз.
4. Apramycin [Електронний ресурс] // Режим доступу <https://go.drugbank.com/drugs/DB04626>
5. Апрамицин Водорастворимый Порошок [Електронний ресурс] // Режим доступу <http://biovetprom.by/index.php/joomla-pages/antibakterialnye-preparaty/lorem-ipsum-dolor-10-26-32-33-detail>.
6. Штамм *Streptoalloteichus cremeus* subsp. tobramycini ВКПМ S-1084 [Електронний ресурс] // Режим доступу: https://rusneb.ru/catalog/000224_000128_0002392311_20100620_C2_RU/.
7. Xu, M., Zhu, Y. Glycine origin of the methyl substituent on C7'-N of octodiose for the biosynthesis of apramycin. *Science in China Series C: Life Sciences*. 2006, 49(4), 362–369. doi:10.1007/s11427-006-2009-y.
8. Tompson R.K., Stark U.M.. Method of preparing antibiotic complex. 1981.
9. Hodgson D. A. Primary metabolism and its control in *Streptomyces* *Antimicrob.* – 2001. - Vol.134. – 112 – 115 с
10. Бородин И.Н. Метаболический анализ *Streptomyces tenebrarius*. - Центр Микробной Биотехнологии / Пер.сангл. - М.: Мир, 2004. - с.17 - 56.

					НУХТ БТЕК 04.01.16 КР ПЗ		
Зм	Арк.	№ документа	Підпис				
Розробник	Возна А.В.				ЛІТЕРАТУРА	Літера	Аркш
Керівник	Красінко В.О.						2
Н. контр							57
Консульт						Кафедра БТМ	
Зав. каф.	Стадніков В.П.						

11. Особливості застосування протимікробних препаратів [Електронний ресурс] // Режим доступу: <http://188.190.33.55/>
12. Апрамицин Водорастворимый Порошок [Електронний ресурс] // Режим доступу: <http://biovetprom.by/index.php/joomla-pages/antibakterialnye-preparaty/lorem-ipsum-dolor-10-26-32-33-detail>
13. Trevisi P. Diets and pig gut health: preface / P. Trevisi, J.F. Pérez // Animal Feed Science and Technology. – 2017. – Vol. 233. – P. 87–88.
14. Методическое пособие по диагностике, профилактике и терапии желудочно-кишечных болезней поросят / А.Г. Шахов, Л.Ю. Сашнина, Д.В. Федосов [и др.]. – Воронеж, 2010. – 59 с.
15. Пашин М.А. Коррекция клинических и биохимических показателей крови поросят при неспецифическом гастроэнтерите препаратами «МАЛАВИТ» и «Ветом-3» / М.А. Пашин // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2012. – № 3(89). – С. 70–74.
16. Практичні рекомендації з лікування та профілактики порушень обміну речовин у свиноматок і шлунково-кишкових розладів у поросят з використанням біогенних сполук мікроелементів / М.І. Цвіліховський, В.І. Береза, О.М. Вержиховський [та ін.] – К. : Вид. центр НАУ, 2008. – 21с.
17. Штамм *Streptoalloteichus cremereus* subsp. *tobramycini* ВКПМ S-1084 [Електронний ресурс] // Режим доступу: https://rusneb.ru/catalog/000224_000128_0002392311_20100620_C2_RU/.
18. Апрамицина сульфат [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://vettorg.info/atcvet/qj/qj01/apramitsina-sulfat-50-poroshok-10-g-brovafarma>
19. Розмір батьківського стада курей становить 8 — 15 % поголів'я промислового (для розрахунків приймаємо 10%). <https://jak.koshachek.com/articles/zmist-batkivskogo-stada-kurej-seljanochka-portal.html>
20. Загальна характеристика мікроорганізмів і способи їх культивування [Електронний ресурс] // Режим доступу:

https://moodle.znu.edu.ua/pluginfile.php?file=/236895/mod_resource/content/1/2.pdf

21. Вибір конструкції апарату з перемішуючим пристроєм [Електронний ресурс] // Режим доступу: http://www.rusnauka.com/8_NND_2011/Chimia/4_81580.doc.htm.
22. Пирог Т. П., Ігнатова О. А. Загальна біотехнологія: Підручник. - К.: НУХТ, 2009. - 336 с.
23. Основи проектування біотехнологічних виробництв: метод. рекомендації до викон. курс. проекту для студ. напряму підготовки 6.051401 «Біотехнологія» ден. форми навч. / уклад. Т.П. Пирог, Ю.В. Карлаш, В.О. Красінько. – К.: НУХТ, 2015. – 92 с.
24. Очистка повітря від пилу [Електронний ресурс] // Режим доступу: https://7-vz.com/ua/category/ochistka_vozdukha_ot_pili/.
25. ФІЛЬТР ФЯП [Електронний ресурс] // Режим доступу: https://ventilator.ua/ua/product/filtr_fyap/#description
26. НЕРА Фильтры [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://asfilter.com.ua/catalog/nera-filtry/>
27. Что такое НЕРА-фильтр: принципы работы и неочевидные факты [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://habr.com/ru/company/tion/blog/385461/>
28. Штамм *Streptoalloteichus cremereus* subsp. *tobramycin*і вкпм ас-1083 [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://findpatent.ru/patent/243/2433169.html>.
29. Визначення вмісту амінного азоту [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://studfile.net/preview/5193901/page:15/>.
30. Визначення апраміцину методом ВЕРХ [Електронний ресурс] // Режим доступу: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1984-82502011000200007&script=sci_arttext.