



# НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю  
Кафедра біотехнології і мікробіології  
Освітній ступінь магістр  
Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»  
(код і назва)  
Освітньо-професійна програма «Промислова та фармацевтична  
біотехнологія»  
(назва)

## ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і  
мікробіології

Віктор СТАБНІКОВ

“ 08 ” жовтня 2024 року

## З А В Д А Н Н Я

### НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

Бережної Катерини Ігорівни  
(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи «Біотехнологічні особливості одержання антибіотків групи рифаміцинів»

керівник роботи д.т.н., доц. Віктор Петрович Стабніков,  
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від 07 жовтня 2024р. № 876-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 01.12.2024

3. Вихідні дані до роботи: «Біотехнологічні особливості одержання антибіотків групи рифаміцинів»

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

РОЗДІЛ 1. Туберкульоз та шляхи його подолання. РОЗДІЛ 2. Біологічний агент. РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування. РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору післяферментаційних процесів отримання субстанції (напівфабрикату). РОЗДІЛ 5. Опис технологічної схеми виділення і очищення субстанції (напівфабрикату). РОЗДІЛ 6. Контроль виробництва РОЗДІЛ 7. Проект заявки на корисну модель. ВИСНОВКИ. СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

5. Перелік графічного матеріалу Технологічна схема виготовлення субстанції рифаміцину А1 та апаратурна схема виготовлення субстанції рифаміцину А1.

## 6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 08 жовтня 2024 року

## КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	РОЗДІЛ 1. Туберкульоз та шляхи його подолання	01.10.24р.- 10.10.24р	
2	РОЗДІЛ 2. Біологічний агент	15.10.24р.- 18.10.24р.	
3	РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування	19.10.24р.- 22.10.24р.	
4	РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору післяферментаційних процесів отримання субстанції (напівфабрикату)	23.10.24р.- 26.10.24р.	
5	РОЗДІЛ 5. Опис технологічної схеми виділення і очищення субстанції (напівфабрикату)	27.10.24р.- 29.10.24р.	
6	РОЗДІЛ 6. Контроль виробництва	30.10.24р.- 04.11.24р.	
7	РОЗДІЛ 7. Проєкт заявки на корисну модель	05.10.24р.- 10.11.24р.	
8	Оформлення апаратурних та технологічних схем	12.11.24р.- 16.11.24р.	
9	Оформлення вступу та реферату	20.11.24р.- 22.11.24р	

Здобувач \_\_\_\_\_  
(підпис)

Керівник роботи \_\_\_\_\_  
(підпис)

Катерина БЕРЕЖНА  
(ім'я та прізвище)

Віктор СТАБНІКОВ  
(ім'я та прізвище)

## Реферат

Кваліфікаційну роботу присвячено розробці технології та апаратурної схеми виділення та очищення антибіотика рифаміцину. Розрахована річна потреба у його виробництві становить 1,37 кг.

Технологія виділення та очищення рифаміцину складається з допоміжних робіт (підготовка допоміжних розчинів) та основних процесів (центрифугування культуральної рідини, ультрафільтрація, відділення осаду центрифугуванням, іонообмінної хроматографії, кристалізації та відділення осаду центрифугуванням, сушіння та пакування), що наведені в технологічній та апаратурній схемах.

Кваліфікаційна робота складається з вступу, сіми розділів, списку використаної літератури, технологічної (формат А1) та апаратурної схем (А1). Загальний обсяг роботи – 93 сторіноки, 7 таблиць, 13 рисунків.

*Ключові слова:* рифаміцин, антибіотики, штам, виділення, очищення, туберкульоз, резистентність.

## **Abstract**

The qualification work is devoted to the development of technology and equipment scheme for the isolation and purification of the antibiotic rifamycin. The estimated annual need for its production is 1.37 kg.

The technology for the isolation and purification of rifamycin consists of auxiliary operations (preparation of auxiliary solutions) and main processes (centrifugation of the culture fluid, ultrafiltration, separation of the precipitate by centrifugation, ion-exchange chromatography, crystallization and separation of the precipitate by centrifugation, drying and packaging), which are given in the technological and equipment schemes.

The qualification work consists of an introduction, seven chapters, a list of used literature, technological (format A1) and equipment schemes (A1). The total volume of the work is 93 pages, 7 tables, 13 figures.

*Keywords:* rifamycin, antibiotics, strain, isolation, purification, tuberculosis, resistance.

## Зміст

Реферат .....	4
Abstract .....	8
Вступ .....	10
<b>РОЗДІЛ 1. Туберкульоз та шляхи його подолання .....</b>	<b>12</b>
<b>1.1. Розвиток інфекційних захворювань та шляхи їх подолання у XXI столітті.....</b>	<b>12</b>
<b>1.2. Огляд ринку протитуберкульозної продукції .....</b>	<b>14</b>
<b>РОЗДІЛ 2. Біологічний агент .....</b>	<b>20</b>
<b>2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента.....</b>	<b>20</b>
<b>2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки <i>Amycolatopsis mediterranei</i> U32.....</b>	<b>30</b>
<b>РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування .....</b>	<b>32</b>
<b>3.1. Характеристика цільового продукту .....</b>	<b>32</b>
<b>3.2. Розрахунок потреби у цільовому продукті .....</b>	<b>40</b>
<b>3.3. Розрахунок річної потужності виробництва .....</b>	<b>41</b>
<b>РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору післяферментаційних процесів отримання субстанції (напівфабрикату).....</b>	<b>43</b>
<b>4.1. Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях.....</b>	<b>62</b>
<b>4.2. Специфікація обладнання .....</b>	<b>67</b>
<b>РОЗДІЛ 5. Опис технологічної схеми виділення і очищення субстанції (напівфабрикату) .....</b>	<b>69</b>
<b>РОЗДІЛ 6. Контроль виробництва .....</b>	<b>74</b>
<b>6.1. Підбір сучасних методів контролю виробництва субстанції (напівфабрикату) .....</b>	<b>74</b>
<b>РОЗДІЛ 7. Проект заявки на корисну модель .....</b>	<b>82</b>
<b>ВИСНОВКИ .....</b>	<b>84</b>
<b>Список використаної літератури .....</b>	<b>86</b>

## Вступ

У 2023 році за оцінками 10,8 мільйонів людей захворіли на туберкульоз у всьому світі, з них 55% були чоловіки, 33% жінки 12% діти та підлітки.

За оцінками експертів рівень захворюваності на туберкульоз збільшився на 4,6% між 2020 і 2023 роками, попри те що у 2010-2020 роках був спад близько 2%.

У 2023 році в усьому світі туберкульоз став причиною приблизно 1,25 мільйонів смертей, у тому числі 161 000 людей з ВІЛ. На вісім країн припадало понад дві третини світового загального обсягу: Індонезія, Китай, Філіппіни, Пакистан, Нігерія, Бангладеш та ін.

Глобальні зусилля по боротьбі з туберкульозом врятували приблизно 79 мільйонів життів в період з 2000 року.

Основним джерелом боротьби із туберкульозом були і залишаються антибіотики. Великої популярності на початку ХХІ століття набула група антибіотиків рифаміцинового ряду, проте із вдосконаленням антибіотику, мутував і штам, який викликає захворювання, що в подальшому призводило до резистентності.

У всьому світі приблизно 400 000 людей розвинули мультирезистентний або рифампіцин-резистентний туберкульоз у 2020 роках.

Проте завдяки вдосконаленням та відкриттям нових напів-синтетичних чи синтетичних штамів у 2023 році рівень успішності лікування чутливого до ліків туберкульозу залишався на рівні 88%, що є досить непоганим результатом.

					НУХТ БТЕК 02.01.02. КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Бережна К.І.				ВСТУП	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.	Стабніков В.П.						7	890
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							

На даний час боротьба із туберкульозом поширюється і набуває нових сил для супротиву, як наприклад:

- Розширення доступу до ранньої та точної діагностики за допомогою молекулярної рекомендації ВООЗ;

- Збільшення доступу до більш короткого (1-3 місяці) режиму лікування на основі рифаміцину;

- Діагностичний портфель значно розширився з точки зору кількості діагностичних класів, тестів, продуктів і методів у розробці.

- ВООЗ почало рекомендувати профілактичне лікування туберкульозу для людей, які живуть з ВІЛ, побутових контактів з бактеріологічно підтвердженим туберкульозом легень та групи клінічного ризику (наприклад, ті, хто отримує діаліз).

- Станом на серпень 2024 року в клінічних випробуваннях було 15 вакцин-кандидатів: чотири в Фазі I, п'ять у Фазі II та шість у Фазі III. Вони включали кандидатів для запобігання зараженню туберкульозом і захворюванням на туберкульоз, а також для покращення результатів лікування;

- У серпні 2024 року на випробуваннях I, II та III фази було 29 препаратів для лікування туберкульозу. Це збільшення з восьми у 2015 році;

- Існують принаймні дослідження, які проводяться, щоб оцінити схеми лікування та моделі доставки для профілактики туберкульозу.

Тому у висновку можна сказати, що глобальні цілі щодо зниження тягаря захворювання можуть бути досягнуті лише за умови діагностики, лікування та профілактики туберкульозу.

## РОЗДІЛ 1. Туберкульоз та шляхи його подолання

### 1.1. Розвиток інфекційних захворювань та шляхи їх подолання у XXI столітті

Розвиток – це незворотній процес спрямований на зміни, у результаті якого можливе утворення трансформації або удосконалення, зникнення або винаходу певних елементів досліджуваного об'єкту або ж і самих об'єктів.

Послідовником розвитку є прогрес, який орієнтований на поступовий рух уперед - від нижчого до вищого.

Ці твердження стосуються, як біотехнології, так і усіх галузей, без виключення. Щодо біотехнології, то за останні декілька років ми, як ніколи раніше потребуємо інновацій у сфері медицини та фармакології, а саме інновацій у лікуванні інфекційних та бактеріальних захворювань.

У минулому столітті було створено значну кількість, нині відомих нам антибіотиків. Однак, починаючи з 1990-х років, кількість нових протимікробних препаратів різко скоротилася з одночасним і тривожним зростанням антибіотикорезистентності. Бактерії, що виявляють стійкість принаймні до трьох різних класів антимікробних препаратів, стали поширеними, особливо в лікарнях. Існує ризик, що через декілька років ми ризикуємо вступити у так звану «постантибіотичну еру», коли інфекції, які зараз знаходяться під контролем, легко перетворюються на смертельну загрозу (Ponovush, 2022). На даний час, результати боротьби із важкими інфекційними захворюваннями поліпшуються завдяки новітнім методам діагностики, які надають можливість виявлення хвороби на більш ранній стадії та удосконаленням методам лікування

					НУХТ БТЕК 02.01.02. КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Бережна К.І.				РОЗДІЛ 1. Туберкульоз та шляхи його подолання	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.	Стабніков В.П.						9	892
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							



Рис.1.1.1. Дані по захворюванню на туберкульоз за 2023 рік

Одним із найдієвіших засобів по боротьбі із нею є прийом антибіотиків, а саме препаратів на основі антибіотиків групи рифаміцинів.

Ця група антибіотиків представлена такими препаратами, як рифаміцин (природний антибіотик) і рифампіцин (напівсинтетичний антибіотик). Останній відрізняється тим, що призначається не лише парентерально, а і всередину (висока біодоступність), а також має ширший спектр дії. Через це рифампіцин частіше застосовують у клінічній практиці.

Рифаміцини блокують синтез РНК на рівні ДНК-залежної РНК-полімерази, пригнічуючи початкову стадію зчитування коду ДНК. У результаті цього розвивається бактеріостатичний ефект.

Спектр дії рифаміцинів широкий, але рифаміцини впливають переважно на грампозитивну флору. Найбільшого значення має їх активність проти мікобактерій туберкульозу, у тому числі штамів,

стійких до інших протитуберкульозних засобів (Висоцький, Храмова, 2015).

Але вирішуючи одну проблему перед нами завжди постає інша. У даному контексті цією проблемою ми можемо назвати резистентність – здатність організму чинити опір до будь-яких факторів зовнішнього впливу. І саме тому на протязі останніх років проводяться удосконалення і синтез нових штамів антибіотиків роду рифаміцинів, які мають поліпшений імунітет до резистентності, яку проявляють мікроорганізми-збудники хвороби.

Також, вивчається комплексна можливість лікування групою рифаміцинів із іншими видами антибіотиків, що в результаті теж надає посилену стійкість до резистентності. Але слід зазначити, що багато досліджень знаходяться у стані розробки і удосконалення, тому і викликають таку зацікавленість.

Спираючись на наведені вище факти тема одержання антибіотиків групи рифаміцинів є актуальною для розгляду у кваліфікаційній роботі.

Новизною теми є розбір біотехнологічних особливостей антибіотиків роду рифаміцинів, їх вплив на мікроорганізми-збудники важких інфекційних хвороб та здатність до резистентності за певних умов.

## **1.2. Огляд ринку протитуберкульозної продукції**

За даними наукових джерел останнім часом у багатьох країнах світу, в тому числі й в Україні, спостерігається зростання показників низки інфекційних захворювань, а саме, туберкульозу та ін. Основними чинниками їх поширення є: недостатній рівень вакцинації і ревакцинації населення, незадовільне харчування і низький рівень життя, зниження імунітету, а також зростання неефективності антимікробних препаратів, що пов'язано з резистентністю до них мікроорганізмів. Резистентність до препаратів призводить до

зменшення ефективності лікування і необхідності заміни лікарських засобів на більш сучасні. Для лікування застосовуються препарати синтетичного походження, що мають значку кількість побічних ефектів зі сторони різних органів і систем організму: зокрема подразнення шлунково-кишкового тракту при пероральному застосуванні, порушення функцій печінки і нирок, алергійні реакції та ін.

Останнім часом вчені констатують, що усе більше штамів туберкульозної палички стають резистентними стосовно протитуберкульозних препаратів, нерідко відразу до всіх компонентів, що входять в основні засоби терапії туберкульозу. Суттєвим є й те, що ринок препаратів даної групи в Україні представлений, в основному, лікарськими засобами іноземного виробництва (більше 70 % від усієї продукції). Вітчизняні виробники приймають лише незначну участь у насиченні ринку протитуберкульозними препаратами, що спричиняє закупівлю дорогих імпорتنих лікарських препаратів, що може дозволити собі не кожний. Тому створення нових антимікробних лікарських засобів, ефективних і малотоксичних, є актуальним на сьогоднішній час (Богуцька, 2023).

Також, за результатами пошукового запиту згідно з АТС-класифікацією за кодом J04A – протитуберкульозні препарати, було встановлено, що станом на грудень 2022 року в Україні зареєстровано та представлено на фармацевтичному ринку 79 найменувань лікарських засобів цієї фармакологічної групи. Серед них більшу частину препаратів (54,43%) становлять закордонні лікарські засоби, вітчизняні представлені 36 найменуваннями, що складає 45,57%. За результатами досліджень країн-виробників протитуберкульозних препаратів встановлено, що на український фармацевтичний ринок лікарські засоби закордонного виробництва постачаються з 7 країн. Основними країнами-імпортерами препаратів для лікування

туберкульозу є Індія, Велика Британія та Нідерланди. Розподіл по країнах виробниках наведено на рис. 1.2.1. (Паламар, Ключко, Паліброда & Грозав, 2023).

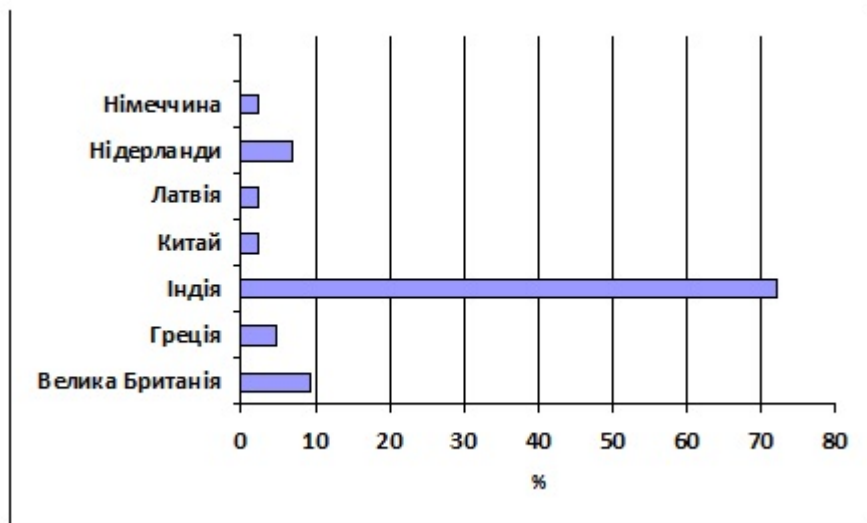
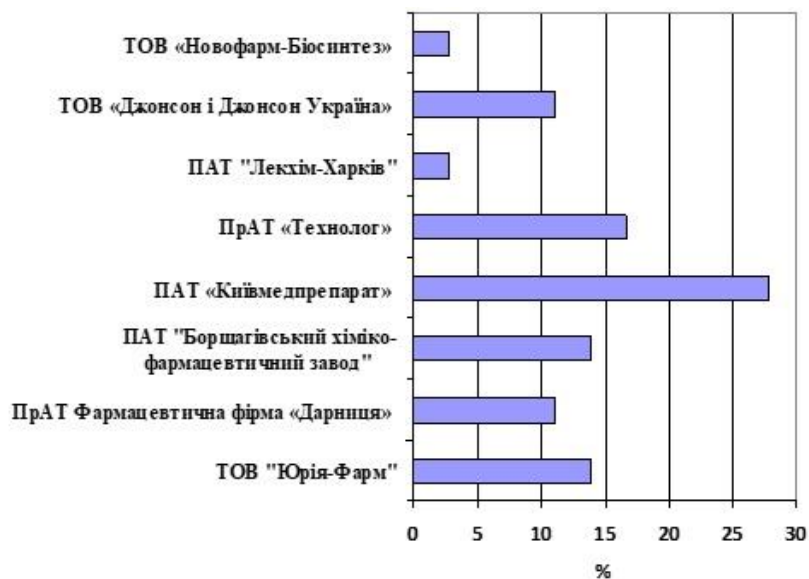


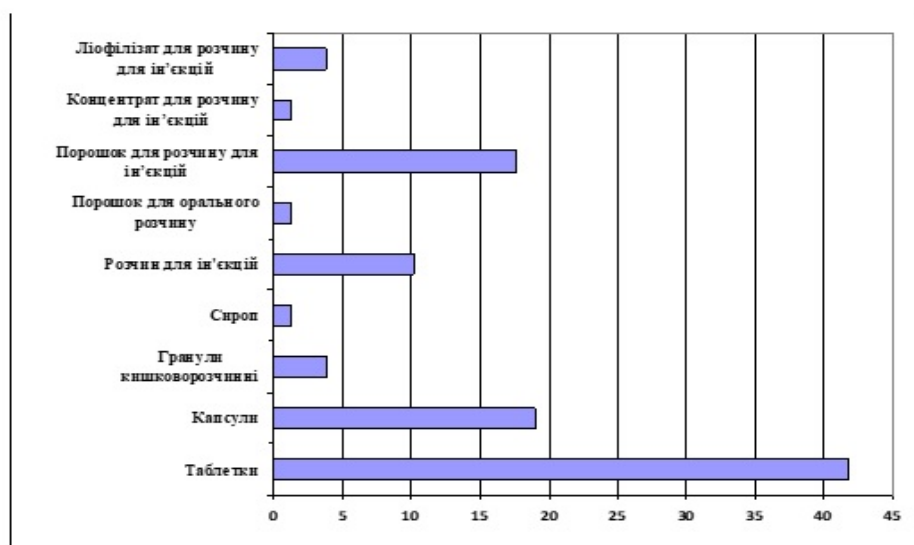
Рис. 1.2.1. Розподіл протитуберкульозних ЛЗ за країною-виробником

Відповідно до одержаних результатів номенклатуру вітчизняних протитуберкульозних препаратів забезпечують 8 виробників, серед яких провідними є ПАТ «Київмедпрепарат», ПрАТ «Технолог», а також ПрАТ «Дарниця» та ПАТ НВЦ «Борщагівський хіміко-фармацевтичний завод» (рис.2.1.2).



*Рис. 1.2.2.* Розподіл за кількістю пропозицій протитуберкульозних засобів вітчизняними фірмами-виробниками

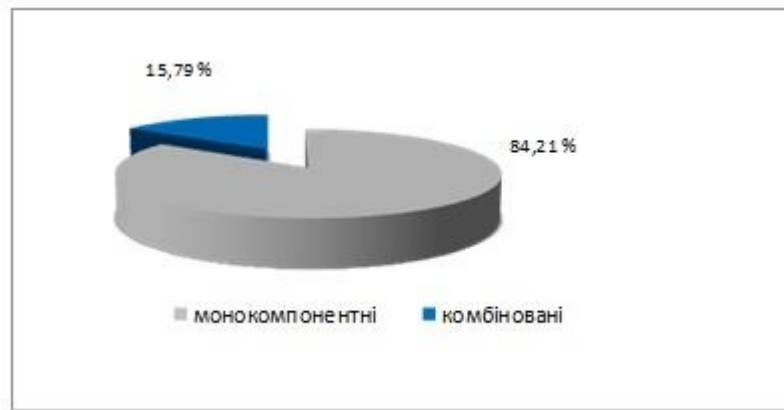
Аналіз розподілу протитуберкульозних засобів за лікарськими формами на українському ринку показав, що препарати досліджуваного сегмента випускаються у вигляді різних лікарських форм (рис. 1.2.3), що дозволяє застосовувати їх для різних категорій населення, при гострих та хронічних станах. Зокрема, пероральні форми, представлені таблетками (41,77%), що складають більшість, капсулами (18,99%), гранулами кишковорозчинними (3,80 %), сиропами (1,27 %) та порошками для оральних розчинів (1,27%) . Лікарські форми для парентерального застосування, а саме розчини для ін'єкцій становлять 10,13%. До цієї групи можна також віднести порошки для розчину для ін'єкцій (17,72%), концентрат для розчину для ін'єкцій ( 1,27%) та ліофілізат для розчину для ін'єкцій ( 3,80%) (Паламар, Ключко, Паліброда & Грозав, 2023).



*Рис. 1.2.3.* Розподіл протитуберкульозних ЛЗ за лікарськими формами

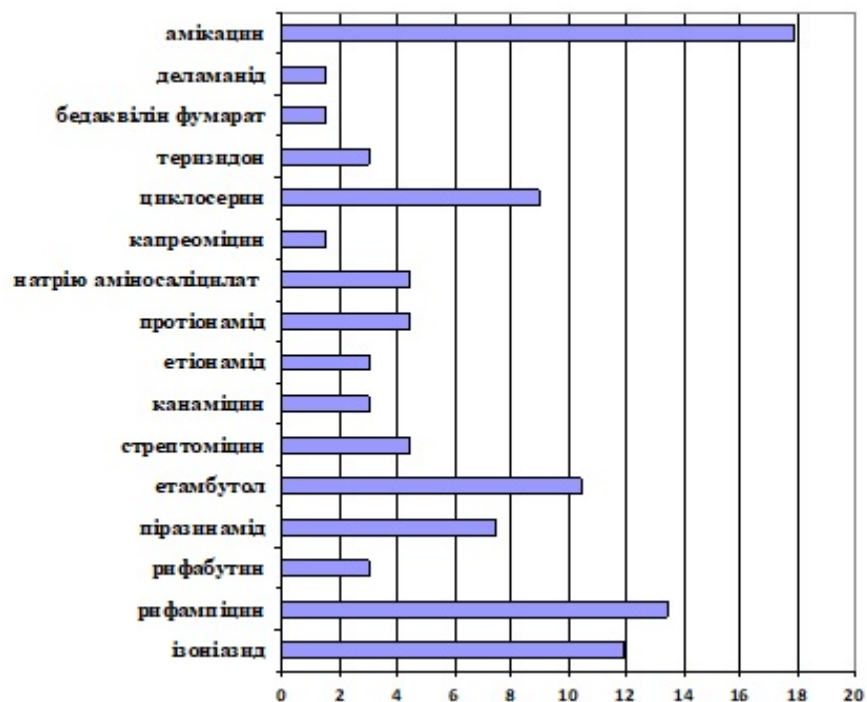
Огляд фармацевтичного ринку свідчить, що більшість препаратів, які застосовуються для лікування туберкульозу, за складом є монокомпонентними – 67 торгових найменування (84,81 %),

відповідно комбіновані препарати становлять 15,19 % (рис. 1.2.4). (Паламар, Ключко, Паліброда & Грозав, 2023).



*Рис. 1.2.4.* Розподіл препаратів, які застосовуються для лікування туберкульозу, зареєстрованих в Україні за складом

Розподіл протитуберкульозних препаратів групи «J04A – протитуберкульозні засоби» за діючими речовинами представлений на рисунку 1.2.5. (Паламар, Ключко, Паліброда & Грозав, 2023), (Фещенко, Тодоріко, Кужко & Гуменюк, 2018).



*Рис. 1.2.5.* Розподіл протитуберкульозних препаратів групи «J04A – протитуберкульозні засоби» за діючими речовинами

Висновки. За результатами аналізу асортименту зареєстрованих в Україні лікарських препаратів групи «J04A – протитуберкульозні засоби» за АТС-класифікацією, країною-виробником, кількістю компонентів і видом лікарської форми, встановлено, що: зареєстровано 79 найменувань лікарських засобів, з яких 54,43% становлять закордонні лікарські засоби. Препарати закордонного виробництва постачаються з 7 країн світу, основними країнами-імпортерами цих препаратів є Індія, Велика Британія та Нідерланди. Номенклатуру вітчизняних протитуберкульозних препаратів забезпечують 8 виробників, серед яких провідними є ПАТ «Київмедпрепарат», ПрАТ «Технолог», а також ПрАТ «Дарниця» та ПАТ НВЦ «Борщагівський хіміко-фармацевтичний завод». Препарати представлені в твердих (таблетки, капсули, гранули кишковорозчинні) та рідких (розчини для ін'єкцій, концентрати для розчину для ін'єкцій, ліофілізати) лікарських формах, при цьому більшість у даній групі складають таблетки (41,77%).

## РОЗДІЛ 2. Біологічний агент

### 2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента

Наука про антибіотики сформувалася ще у ХХ столітті. До 1960-х років усі основні групи відомих на сьогодні антибіотиків були відомі людству. На відміну від попереднього півстолітнього періоду, протягом якого були описані всі основні класи антибіотиків, у двадцять першому столітті ефективність пошуку нових природних антибіотиків значно знизилася. Додатковою проблемою стала поява стійких до антибіотиків мікроорганізмів.

Поява стійкості до антибіотиків була природною біологічною реакцією на застосування протимікробних препаратів, що створило селективний тиск, який сприяв відбору, виживанню та розмноженню стійких до антибіотиків штамів мікроорганізмів.

Поширення стійких до антибіотиків мікроорганізмів знижує ефективність профілактики та лікування інфекційних і паразитарних захворювань у людини, тварин і рослин, що призводить до збільшення тяжкості та тривалості перебігу цих захворювань, зростання смертності серед населення, загибелі тварин і рослин.

Зниження ефективності існуючих клінічно важливих антибіотиків спонукало дослідників до пошуку нових молекул з антимікробними властивостями для подолання антимікробної резистентності.

					НУХТ БТЕК 02.01.02. КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 2. Біологічний агент		
Розроб.	Бережна К.І.				Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.	Стабніков В.П.					17	20
Реценз.					Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Затверд.	Стабніков В.П.						

Рід *Streptomyces* є джерелом 70-80% всіх вторинних метаболітів але крім того, важливими продуцентами антибіотиків є *Amurolatopsis*, *Actinoplanes*, *Micromonospora* та *Saccharopolyspora* [1].

В представленій роботі цільовою речовиною є група антибіотиків рифаміцини, синтезовані грампозитивними бактеріями роду *Amurolatopsis* або виробляються в штучних умовах, тому далі мова піде саме про цей рід продуцентів.

Історія роду *Amurolatopsis* тісно пов'язана з історією відкриття антибіотиків. Рід *Amurolatopsis* раніше широко використовувався як одне з найефективніших джерел продуцентів вторинних метаболітів з бактеріальними, антибактеріальними та протигрибковими або противірусними властивостями і продовжує залишатися в центрі уваги при пошуку нових лікарських засобів і сьогодні [2,3,4].

Окрім виробництва антибіотиків, важливість штамів *Amurolatopsis* існує і в промисловості та екології, а саме біоремедіації (імобілізація важких металів, біодеградація гербіцидів та біодеградації полімерів) та біоконверсії (виробництво вуксистатину та ваніліну) [2,3,4].

Деякі представники роду *Amurolatopsis* спочатку були помилково ідентифіковані як *Streptomyces* або *Nocardia*. Лише в 1986 році Лешвальє остаточно визнав *Amurolatopsis* як унікальний рід нокардіоформних актиноміцетів, які не мають мікологічних кислот, але містять мезодіамінопімелінову кислоту, арабінозу та галактозу в пептидоглікані клітинної стінки [5].

*A. orientalis* був першим зареєстрованим видом цього роду. Штами *Amurolatopsis* широко розповсюджені і виділяються переважно з ґрунту. Крім того, штами *Amurolatopsis* були виділені з середньовічної шахти з виробництва галунового сланцю, лишайників, океанічних відкладів, рослинної сировини, комах, клінічних джерел та кінських плацент [6,7,8].

Відомо, що лише чотири види *Amycolatopsis* мають патогенні властивості [8].

Станом на 2021 рік кількість офіційно визнаних та опублікованих видів роду *Amycolatopsis* становить 83. Зібрано послідовності геномів 120 штамів *Amycolatopsis*, з них 71 - з типового матеріалу [9].

Геномні дослідження показали, що види *Amycolatopsis* мають геноми від 5,62 Мб (*A. granulosa* DSM45669) до 10,94 Мб (*A. anabasis* EGI 650086) (в середньому, приблизно 8,5-9 Мб), кільцеву хромосому та високий вміст ГЦ ДНК (66-75 мол. %). Пангеномний аналіз виявив основний геном з 1212 генів, допоміжний геном з 27 483 генів і 33 342 унікальних генів [20,21].

Завдяки такому значному пан-геному, види *Amycolatopsis* мають значний адаптивний потенціал. Значна частина допоміжних та унікальних генів штамів *Amycolatopsis* беруть участь у біосинтезі вторинних метаболітів [9].

Після опрацювання літератури, частина із якої наведена вище, і так як тема даної кваліфікаційної роботи є «Біотехнологічні особливості одержання антибіотків групи рифаміцинів», спираючись на дослідження вчених останніх десяти років, було прийнято рішення розглянути вид грампозитивних бактерій роду *Amycolatopsis*, а саме *Amycolatopsis rifamycinica*.

Ця бактерія продукує рифаміцинові антибіотики (наприклад, рифаміцин SV), які застосовуються у лікуванні мікобактеріальних захворювань, як-от туберкульоз та проказа.

Всі дані про склад поживного середовища, умови культивування, вихід цільового продукту і особливості біосинтезу наведено в таблиці 2.1.1.

Таблиця 2.1.1

Біологічний агент	Склад поживного середовища, г/л	Тривалість культивування, год	Концентрація рифаміцин, С, г/л	Особливості процесу біосинтезу	Використана література
Amycolatopsis mediterranei OVA5-E7	Знежирена бавовняна макуха – 10 CaCO <sub>3</sub> – 0,006 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> – 0,007 K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O – 0,0065 Глюкоза – 20 Пептон – 5 Дріжджовий екстракт – 5 М'ясний екстракт – 5 Ферментований гідролізат казеїну – 2,5 NaCl – 1,5	264	1,97	Вологість – 80% pH – 7,0 t – 30° C	N., Mandali, P.S., P., Ponamgi, V. Girijashankar, L., V., Rao. (2015). Solid State Fermentation and production of Rifamycin SV using Amycolatopsis mediterranei. doi:10.1111/lam.12332. [10].

## Продовження таблиці 2.1.1

<p>Amycolatopsis mediterranei RCP 1001</p>	<p>Арахісовий шрот – 25 Соевий шрот – 10 Декстроза – 140 Пропіленгліколь – 0,01 Діетилбарбітурат натрію – 1,7 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 9,6 CaCO<sub>3</sub> – 11 MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 1 FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 0,05; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 0,012; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1; CaCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O – 0,003</p>	<p>56-72</p>	<p>1,03-1,2</p>	<p>pH – 7,6 – 7,9 t – 28° C</p>	<p>El-Tayeb, O.,M., Salama, A.,A., Hussein, M.,M.M., El-Sedawy, H.F. (2004). Optimization of industrial production of rifamycin B by Amycolatopsis mediterranei. I. The role of colony morphology and nitrogen sources in productivity. doi: 10.5897/AJB2004.000-2049. [11].</p>
--	---	--------------	-----------------	-------------------------------------	--

Закінчення таблиці 2.1.1

Amycolatopsis mediterranei U32	Глюкоза – 10 Триптон – 2 Дріжджовий екстракт – 1 Яловичий екстракт – 1 Гліцерин – 1 KNO <sub>3</sub> - 8	96	0,5	pH – 7,0 t – 30° C	Z., H., Shao, та інші. (2015). A preliminary study of the mechanism of nitrate-stimulated remarkable increase of rifamycin production in Amycolatopsis mediterranei U32 by RNA-seq. doi: 10.1186/s12934-015-0264-y. [12].
--------------------------------	---	----	-----	-----------------------	---

Проаналізувавши дані із таблиці 2.1.1 можна дійти висновку, що штам *Amycolatopsis mediterranei* OVA5-E7 є найкращим продуцентом рифаміцину, бо продукує майже у два, а то й три рази більше рифаміцину ніж інші продуценти, проте час його культивування складає 264 години, що є більшим ніж у двох його штамів-суперників. *Amycolatopsis mediterranei* U32 має коротший час культивування і менш вибагливі вимоги, проте і концентрація рифаміцину у кінці культивування є меншою ніж у попередника приблизно у чотири рази. *Amycolatopsis mediterranei* RCP 1001 у свою чергу має нижчий час культивування та більший вміст кінечного продукту, ніж у попередника, що здавалося ставить фаворитом при виборі його, але можливо поживне середовище цього штаму є більш затратним по ціні ніж у конкурентів.

Для дослідження економічного аспекту даних штамів і вибору в подальшому підходящого за всіма критеріями зробимо порівняння ціни усіх компонентів поживних середовищ трьох обраних продуцентів.

Дані про вартість кожного компоненту поживного середовища представлених продуцентів наведено в таблиці 2.1.2

Таблиця 2.1.2

Вартість компонентів поживного середовища для культивування продуцентів рефаміцину.

Продуцент	Компоненти поживного середовища г/л	Ціна компонента грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації
Amycolatopsis mediterranei OVA5-E7	Знежирена бавовняна макуха – 10	20	0,2	1
	CaCO <sub>3</sub> – 0,006	55	0,00033	2
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> – 0,007	115	0,00805	3
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O – 0,0065	101	0,000657	4
	Глюкоза – 20	104	2,08	5
	Пептон – 5	1120	5,6	6
	Дріжджовий екстракт – 5	1800	9	7
	М'ясний екстракт – 5	27206	136,03	8
	Ферментований гідролізат казеїну – 2,5	640	1,6	9
	NaCl – 1,5	254	0,381	10
	Вартість 1 л середовища – 154,90 грн			

Amycolatopsis mediterranei RCP 1001	Арахисовий шрот – 25	320	8	11
	Соевий шрот – 10	28	0,28	12
	Декстроза – 140	104	14,56	13
	Пропіленгліколь – 0,01	210	0,0021	14
	Діетилбарбітурат натрію – 1,7	87571	148,87	15
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> – 9,6	115	1,10	3
	CaCO <sub>3</sub> – 11	55	0,61	2
	MnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O – 1	99	0,099	16
	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O – 0,05	80	0,004	17
	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O – 0,012	95	0,00114	18
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – 1	93,60	0,0936	19
	CaCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O – 0,003	90	0,00027	20
	Вартість 1 л середовища – 173,62 грн			
Amycolatopsis mediterranei U32	Глюкоза – 10	104	1,04	5
	Триптон – 2	3490	6,98	21
	Дріжджовий екстракт – 1	1800	1,8	7
	Яловичий екстракт – 1	27206	27,21	8
	Гліцерин – 1	100	0,1	22
	KNO <sub>3</sub> - 8	92	0,736	23
	Вартість 1 л середовища – 37,87 грн			

Виходячи із наведених даних таблиці 2.1.2 можна припустити, що найкращим економічно вигідним рішенням буде використання штаму *Amycolatopsis mediterranei* U32, компоненти поживного середовища якого в разі поступають в ціні компонентам двох інших штамів. Але дані наведеної таблиці не є вирішальними у виборі біологічного агента для синтезу рифаміцину бо, попри явну економічну вигідність у використанні штаму *Amycolatopsis mediterranei* U32 ще треба порівняти ціну одного граму рифаміцину у

представлених продуцентів, при заданій вище вартості компонентів поживного середовища і часу культивування.

Цей показник був розрахований та об'єднаний у таблицю 2.1.3 наведену нижче.

*Таблиця 2.1.3*

Біологічний агент	Концентрація ПАР, г/л	Тривалість культивування, год	Кількість утворених ПАР за годину, г/год	Вартість 1 л середовища, грн/л	Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г
1	2	3	4	5	6
Amycolatopsis mediterranei OVA5-E7	1,97	264	0,0075	154,90	78,63
Amycolatopsis mediterranei RCP 1001	1,2	72	0,0167	173,62	144,68
Amycolatopsis mediterranei U32	0,5	96	0,0052	37,87	75,74

Проаналізувавши дані із таблиці 2.1.3 наведеної вище можна побачити, що лідерами серед заявлених штамів є *Amycolatopsis mediterranei* OVA5-E7 та *Amycolatopsis mediterranei* U32. Їх умовна вартість на 1 грам цільового продукту менше, на відміну від *Amycolatopsis mediterranei* RCP 1001, вартість якого виявилась у двічі лорозчою за конкурентів. Проте, враховуючи умови, а головне надто довгий час культивації штаму *Amycolatopsis mediterranei* OVA5-E7, однозначним фаворитом є *Amycolatopsis mediterranei* U32, що має змогу за короткий проміжок часу наздігнати концентрацію ПАР до кількості свого суперника, завдяки скороченню термінів процесу культивування.

## 2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки *Amycolatopsis mediterranei* U32

Це вид грам-позитивних бактерій роду *Amycolatopsis*. Ця бактерія продукує рифаміцинові антибіотики (наприклад, рифаміцин SV), які застосовуються у лікуванні мікобактеріальних захворювань, як-от туберкульоз та проказа. *Amycolatopsis rifamycinica* кілька разів перейменовувався. Коли цю бактерію вперше було виділено з французького зразка ґрунту в 1957 році, вона була ідентифікована як *Streptomyces mediterranei*. У 1969 році, цю бактерію було перейменовано на *Nocardia mediterranei*, тому що її клітинна стінка вважалася схожою на клітинну стінку видів роду *Nocardia*. Бактерія була перейменована в *Amycolatopsis mediterranei* в 1986 році після того, як було виявлено, що вона є не сприйнятливою до фагів *Nocardia*, а її клітинна стінка не містить миколову кислоту. Нарешті, у 2004 році за результатами секвенування 16S рРНК ця бактерія була перейменована на *Amycolatopsis rifamycinica*, а згодом дістала назву *Amycolatopsis mediterranei*.

*Amycolatopsis mediterranei* U32 є похідним удосконаленням штамом від *Amycolatopsis mediterranei* S та SV, які у свою чергу показали найкращі результати по продукуванню антибіотику рафаміцин.



Рисунок 2.2.1. *Amycolatopsis mediterranei* U32

Біологічна класифікація:

Домен – Бактерії

Тип – Актинобактерії

Ряд – Актиноміцети

Родина – Pseudonocardiaceae

Рід – Amycolatopsis

Вид - Amycolatopsis mediterranei

Структура всіх представників Amycolatopsis ж дуже різноманітна і включає циклічні, ациклічні, малі, великі, прості та складні молекули (представлені на Рис. 3.1).

Також серед антибіотиків що продукуються родом Amycolatopsis є не лише рифаміцини, а й хелокардин, толіпоміцин, канглеміцин А, макроміцини А-Д, ванкоміцин, тетраценоміцин Х та рифаморфоліни А-Е.

Культуральні ознаки:

Має культуральні ознаки, які повністю залежать від середовища на якому проводять культивування Amycolatopsis mediterranei U32. Чутливі до введення нітратогрупи у середовище живлення. Із внесенням її внесенням значно збільшується кількість концентрації ПАР під час культивування.



Рифаміцини вперше були виділені в 1957 році з ферментаційної культури *Streptomyces mediterranei* в лабораторії Gruppo Lepetit SpA в Мілані двома вченими на ім'я П'єро Сенсі та Марія Тереза Тімбал, які працювали з ізраїльським вченим Пінхасом Маргалітом. Спочатку було виявлено сімейство близьких антибіотиків, які називаються рифаміцином А, В, С, D, Е. Єдиним компонентом цієї суміші, достатньо стабільним для виділення в чистому вигляді, був рифаміцин В, який, на жаль, мав низьку активність. Проте подальші дослідження показали, що хоча рифаміцин В був по суті неактивним, він спонтанно окислювався та гідролізувався у водних розчинах з утворенням високоактивного рифаміцину S. Просте відновлення рифаміцину S дало форму гідрохінону під назвою рифаміцин SV, який став першим членом цього клас для введення клінічного використання як внутрішньовенний антибіотик. Подальша хімічна модифікація Rifamycin SV дала покращений аналог Rifamide, який також був введений у клінічну практику, але так само був обмежений внутрішньовенним застосуванням. Після обширної програми модифікації решті-решт був створений Рифампін, який доступний перорально і став основою терапії туберкульозу (Sensi, 1983).

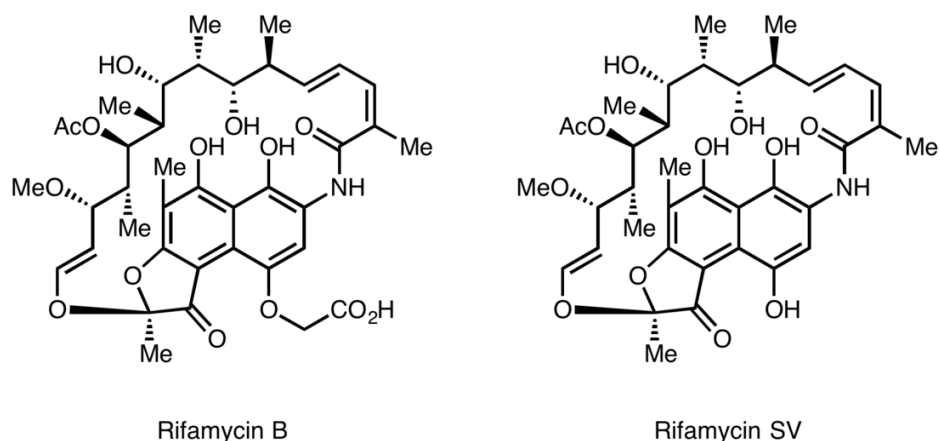


Рис.3.1.2. Структурна формула рифаміцину В та SV

Lepetit подав заявку на захист патенту на рифаміцин В у Великобританії в серпні 1958 року та в США в березні 1959 року.

Британський патент GB921045 було видано в березні 1963 року, а патент США 3 150 046 було видано у вересні 1964 року. Лікарський засіб широко вважається таким, що має допоміг вирішити проблему стійкого до ліків туберкульозу в 1960-х роках.

#### Клінічні випробування

Рифаміцини використовуються для лікування багатьох захворювань, найважливішим з яких є туберкульоз.

Рифаміцини мають унікальний механізм дії, вибірково пригнічуючи бактеріальну ДНК-залежну РНК-полімеразу, і не виявляють перехресної резистентності з іншими антибіотиками при клінічному застосуванні. Однак, незважаючи на їх активність проти бактерій, стійких до інших антибіотиків, самі рифаміцини страждають від досить високої частоти резистентності. Через це рифампін та інші рифаміцини, як правило, використовуються в комбінації з іншими антибактеріальними препаратами. Це регулярно практикується в терапії туберкульозу та служить для запобігання утворенню мутантів, стійких до будь-якого з препаратів у комбінації. Рифаміцин швидко вбиває штами бацил, що швидко діляться, а також «персистентні» клітини, які залишаються біологічно неактивними протягом тривалого періоду часу, що дозволяє їм уникнути дії антибіотиків (Позняк, Міллер, Ормерод, 1999).

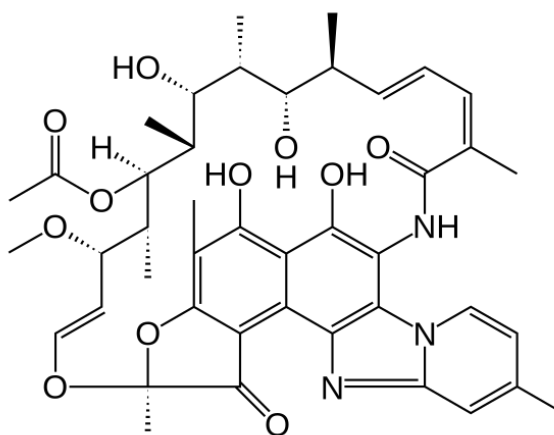


Рис.3.1.3. Структурна формула рифаксиміну

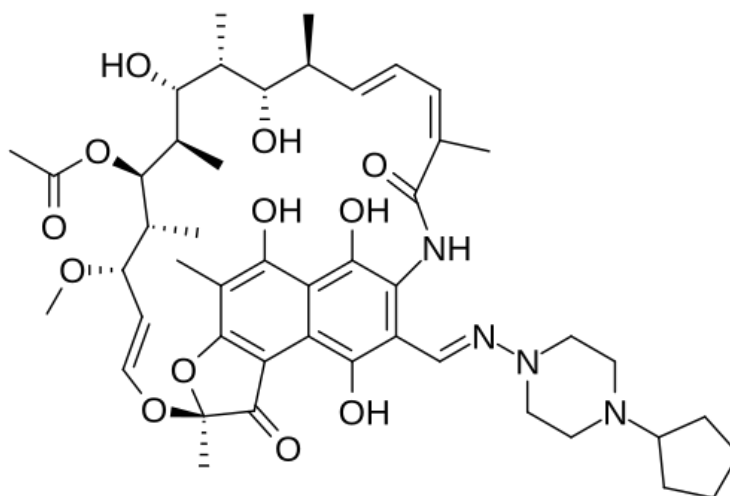
Рифаксимін — це невсмоктуваний антибіотик широкого спектру дії, який в основному використовується для лікування діареї мандрівників. Він заснований на сімействі антибіотиків рифаміцину. З моменту схвалення в Італії в 1987 році він був ліцензований у більш ніж 30 країнах для лікування різноманітних шлунково-кишкових захворювань, таких як синдром подразненого кишечника та печінкова енцефалопатія. Він діє шляхом інгібування синтезу РНК у сприйнятливих бактерій шляхом зв'язування з ферментом РНК-полімерази. Це зв'язування блокує транслокацію, що припиняє транскрипцію. Він продається під торговою маркою Xifaxan компанією Salix Pharmaceuticals (Koo, DuPont, 2010), (Taylor, 2005).

Рифаксимін використовується для лікування синдрому подразненого кишечника (СРК). Він має протизапальні та антибактеріальні властивості, є антибіотиком, який не всмоктується і діє локально в кишечнику. Ці властивості роблять його ефективним у полегшенні хронічних функціональних симптомів СРК без запорів. Він зберігає свої терапевтичні властивості для цього показання навіть після повторних курсів. Це особливо показано, якщо є підозра, що надмірний ріст бактерій у тонкій кишці причетний до СРК людини. Полегшення симптомів або покращення можна отримати при загальних симптомах СРК, включаючи: біль у животі, метеоризм, здуття живота та консистенцію стільця. Недоліком є те, що повторні курси можуть знадобитися для рецидиву симптомів. (Song та ін., 2018), (Малік, Шей, 2015).

#### Механізм дії

Рифаксимін перешкоджає транскрипції шляхом зв'язування з  $\beta$ -субодиницею бактеріальної РНК-полімерази. Це призводить до блокування етапу транслокації, який зазвичай слідує за утворенням першого фосфодієфірного зв'язку, що відбувається в процесі транскрипції. Що у свою чергу, призводить до зменшення популяції

бактерій, у тому числі бактерій, що утворюють газ, що може зменшити запалення слизової оболонки, епітеліальну дисфункцію та вісцеральну гіперчутливість. Рифаксимін має широкий спектр антибактеріальних властивостей проти як грампозитивних, так і грамнегативних анаеробних і аеробних бактерій. Внаслідок розчинності жовчних кислот його антибактеріальна дія обмежена здебільшого тонким кишечником і меншою мірою товстим кишечником. Скидання складу бактерій також було запропоновано як можливий механізм дії для полегшення симптомів СРК. Крім того, рифаксимін може мати прямий протизапальний ефект на слизову кишечника через модуляцію рецептора прегнану X (Pimentel, 2016). Інші механізми його терапевтичних властивостей включають інгібування бактеріальної транслокації через епітеліальну оболонку кишечника, інгібування прилипання бактерій до епітеліальних клітин і зниження експресії прозапальних цитокінів (Lee, 2015).



*Рис.3.1.4.* Структурна формула рифапентину

Рифапентин, що продається під торговою маркою Priftin, є антибіотиком, який використовується для лікування туберкульозу. При активному туберкульозі використовується разом з іншими протитуберкульозними препаратами. При латентному туберкульозі зазвичай використовується з ізоніазидом.

Поширені побічні ефекти включають низький рівень нейтрофілів у крові , підвищення рівня печінкових ферментів і лейкоцитів у сечі. Серйозні побічні ефекти можуть включати проблеми з печінкою або пов'язану з *Clostridium difficile* діарею. Використання під час вагітності під питанням. Рифапентин входить до групи ліків рифаміцину та діє шляхом блокування ДНК-залежної РНК-полімерази.

Рифапентин був схвалений для медичного використання в Сполучених Штатах у 1998 році. Він входить до списку основних лікарських засобів Всесвітньої організації охорони здоров'я .

#### Медичне використання

Систематичний огляд схем профілактики активного туберкульозу у ВІЛ-негативних осіб з латентним туберкульозом виявив, що щотижнева схема прийому рифапентину з ізоніазидом під прямим спостереженням протягом трьох місяців була такою ж ефективною, як щоденна схема самостійного застосування ізоніазиду протягом дев'яти місяців. Тримісячна схема рифапентин-ізоніазид мала вищі показники завершення лікування та нижчі показники гепатотоксичності. Однак частота побічних реакцій, що обмежують лікування, була вищою в режимі рифапентин-ізоніазид порівняно з дев'ятимісячним режимом ізоніазиду (Sharma, Sharma, Kadhiravan, 2013).

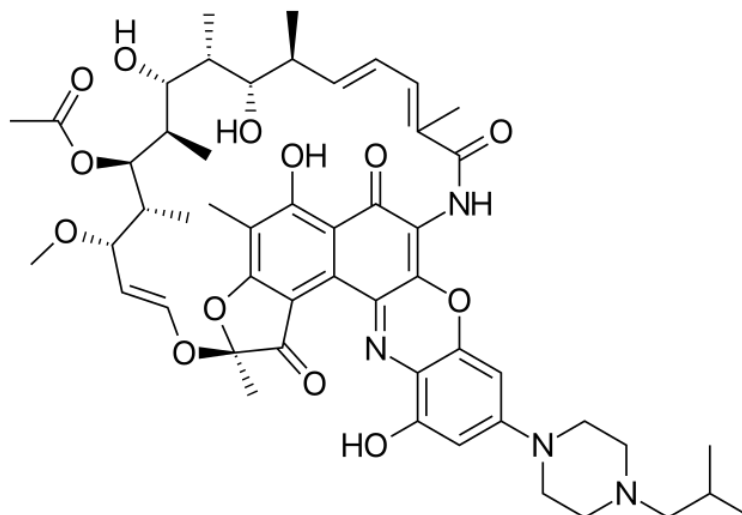


Рис.3.1.5. Структурна формула рифалазилу

Рифалазил (також відомий як KRM-1648 і AMI-1648) – це антибіотична речовина, яка вбиває бактеріальні клітини шляхом блокування  $\beta$ -субодиниці РНК-полімерази. Рифалазил використовується для лікування багатьох різних захворювань. Найбільш поширеними є хламідійна інфекція, діарея, пов'язана з *Clostridium difficile* (CDAD), і туберкульоз (ТБ). Застосування рифалазилу та ефекти, які збігаються з прийомом рифалазилу для лікування бактеріальних захворювань, відрізняються від людини до людини, як і будь-який інший препарат, який вводиться в організм. Взаємодія з їжею та генетичні варіації є кількома причинами варіації побічних ефектів від використання рифалазилу. Його розробка була припинена в 2013 році через серйозні побічні ефекти (Осборн, Мерфі & Ротштейн, 2006).

Рифалазил добре працює як окремо, так і в поєднанні з іншими антибіотиками. У дослідженні, проведеному в 2005 році, було виявлено, що поєднання рифалазилу з ванкоміцином збільшує знищення бактерій у 3 рази. Рифалазил також має дуже тривалий період напіввиведення, що дозволяє використовувати більш рідкісні дози на відміну від частих невеликих доз антибіотиків (Осборн, Мерфі & Ротштейн, 2006).

Було проведено багато різних досліджень, які вивчали вплив рифалазилу на певні штами бактеріальних захворювань. У дослідженні, проведеному в 2004 році, було виявлено, що рифалазил знижує кількість штамів *C. difficile* при дослідженні *in vitro* (Антон, та ін., 2004).

#### Використання

Рифалазил був розроблений для лікування випадків туберкульозу та хламідіозу. Це дуже хороший засіб для лікування туберкульозу, оскільки рифалазил досягає дуже високої концентрації в клітинах крові та легенях. Крім того, рифалазил набуває все більшого застосування, оскільки його можна використовувати разом з багатьма іншими показаннями, такими як ВІЛ, туберкульоз і MRSA. Рифалазил має дуже довгий період напіврозпаду, що дуже корисно для деяких ліків. Препарат застосовують перорально, що також зручно в плані прийому препарату. Довший період напіврозпаду дозволяє використовувати меншу кількість процедур і доз, що робить цей препарат перспективним для лікування туберкульозу, CDAD і хламідіозу. Хоча використання рифалазилу здається дуже ефективним, існують негативні побічні ефекти, які обмежують його використання. Рифалазил взаємодіє з іншими препаратами і, крім того, швидко розвивається стійкість до інших препаратів (Антон, та ін., 2004).

У висновку, можна сказати, що група рифаміцинів є досить широкою, як і за різновидами антибіотиків, так і за їх спектром призначення.

Так як дана група націлена на лікування або профілактику попередження розвитку таких важких захворювань, як туберкульоз, хламідіоз, лепра та ін., можна сміло заявити, що тема розглянута у даній роботі є дуже актуальною на сьогоднішній день.

### 3.2. Розрахунок потреби у цільовому продукті

Виробництво лікарського засобу під назвою «Рифампіцин» в Україні відбувається ПАТ НВЦ «БОРЩАГІВСЬКИЙ ХФЗ». Форма випуску – капсули, кожна із яких містить 150 мг рифампіцину.

Для розрахунку та забезпечення усіх хворих на туберкульоз (так як, ця хвороба є однією із найнебезпечніших і важковиліковних, було взято саме статистичні дані по її захворюваності) необхідні такі дані:

Туберкульоз:

- дорослим призначати у дозі 8–12 мг/кг маси тіла на добу. Пацієнтам з масою тіла менше 50 кг –450 мг/добу, 50 кг та більше — 600 мг/добу;

- дітям віком від 6 до 12 років – 10–20 мг/кг маси тіла на добу; максимальна добова доза не повинна перевищувати 600 мг.

Тривалість протитуберкульозної терапії індивідуальна, зумовлена терапевтичним ефектом та може становити 1 рік і більше. Щоб уникнути розвитку стійкості мікобактерій до рифампіцину, препарат слід призначати, як правило, разом з іншими протитуберкульозними препаратами I та II ряду у їх звичайних дозах.

Із наведених статистичних даних вище можемо встановити середню добову потребу лікарського засобу (ЛЗ) на одну людину 600 мг/кг.

Так як лікування туберкульозу може тривати рік і більше (приймаємо за середнє рік при можливості зміни концентрації або виду ЛЗ), і так потреба ЛЗ для однієї людини на рік становитиме:

219000 мг/на одну людину на рік, так як у березні 2024 року було зареєстровано 1560 випадків туберкульозу.

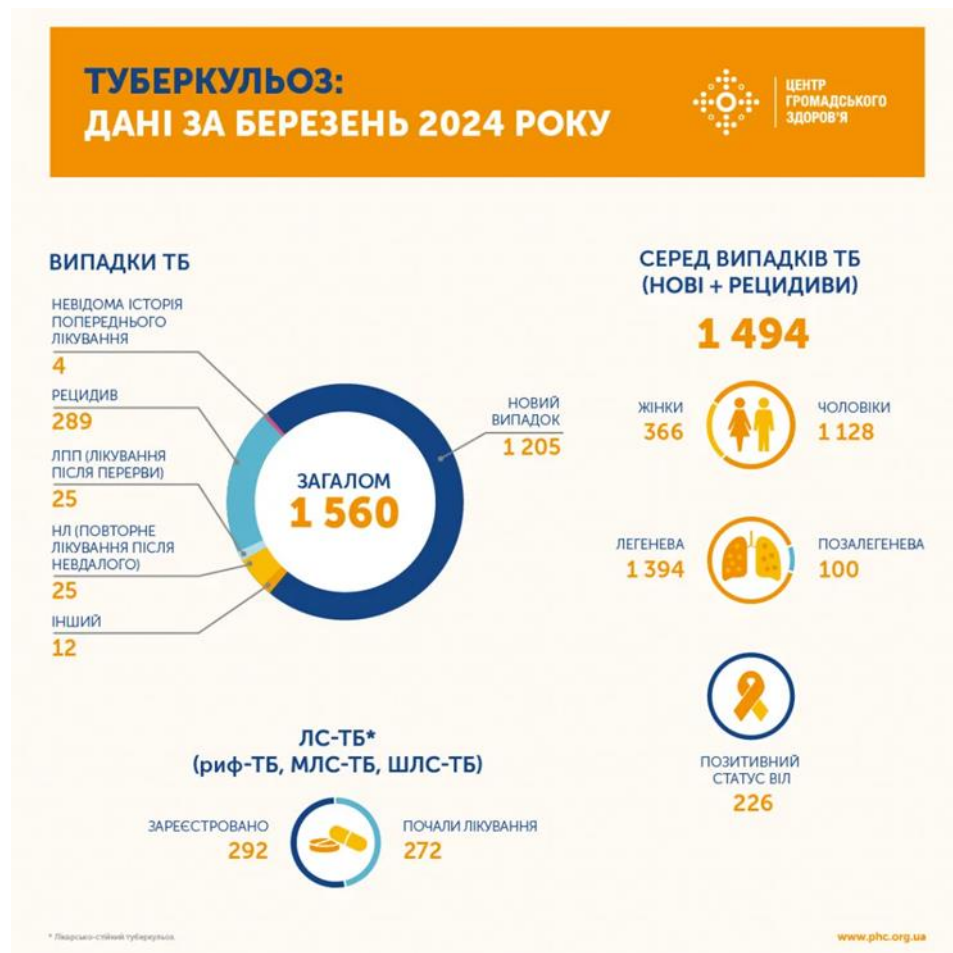


Рис 3.2.1. Статистика туберкульозу за березень 2024

### 3.3. Розрахунок річної потужності виробництва

Тоді потужність виробництва складає:

$$G_{\text{гп}} = 219000 \text{ мг} \cdot 1560 = 341640000 \text{ мг} = 341640 \text{ кг.}$$

Розраховуємо кількість культуральної рідини, яку необхідно одержати, щоб забезпечити на рік хворих України субстанцією для лікарського препарату.

В березні 2024 року в Україні офіційно зареєстровано 1560 випадків туберкульозу.

Опрацювавши ринок цільової продукції, як українських, так і закордонних постачальників приходимо до висновку, що від всієї потрібної кількості ЛЗ на всіх захворілих туберкульозом ми беремо 8% (27331,2 кг) для виготовлення рифаміцину.

Для синтезу рифаміцину ми використовуємо вид грам-позитивних бактерій роду *Amycolatopsis*, а саме *Amycolatopsis*

mediterranei U32. Цей штам продукує 0,5 г/л цієї речовини за 96 годин. Тому для отримання 27331,2 кг рифаміцину необхідна така кількість культуральної рідини:

1 л культуральної рідини – 0,50 г

X л культуральної рідини - 27331,2 кг

Отримаємо,  $x = 27331,2/0,5 = 286977,6$  л культуральної рідини.

Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера

Приймаємо кількість робочих днів на рік – 300, тоді кількість продукту за цикл становить:

$G_{цк} = G_{гп} \cdot T_{цф}/24 \cdot T_{рд} = 286977,6 \cdot 82/24 \cdot 300 = 3268,4$  л/цикл

Урахувавши витрати, що складають 40% маємо 4575,7 л/цикл

Розрахуємо цикл роботи ферментера:

$T_{цф} = T_{ф} + T_{др} = 72 + 10 = 82$  (год), де

$T_{ф}$  – тривалість виробничої ферментації (біосинтезу);

$T_{др}$  – тривалість допоміжних робіт (допоміжні роботи включають: миття та огляд (2 год), перевірка на герметичність (2 год), стерилізація (2 год), охолодження (1 год), завантаження середовища (1,5 год), засів (0,5 год), вивантаження культуральної рідини (1 год).

Отже, кількість циклів становить

$N_{цк} = G_{нт}/G_{цк} = 286977,6 / 4575,7 = 62,7$

$K_1$  – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій.

Приймаємо  $K_1 = 1,1$ .

4575,7 л культуральної рідини можна отримати у ферментері, геометричний об'єм якого має становити:

$V_{г} = V_{цк}/K_{зап} = 4575,7/0,6 = 7626,2$  л

де  $K_{зап}$  — коефіцієнт заповнення ферментера. Найближчий за геометричним об'ємом ферментер  $V_{гф} = 10$  м<sup>3</sup>.

## РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору післяферментаційних процесів отримання субстанції (напівфабрикату)

Сучасне промислове отримання антибіотиків - складна багатоступенева біотехнологічна система, що складається з ряду послідовних стадій.

### 1. Стадія біосинтезу (утворення) антибіотику.

Головне завдання на цій стадії - створення оптимальних умов для розвитку продуцента й максимально можливого біосинтеза антибіотику.

Висока результативність цієї стадії залежить від рівня біосинтетичної активності продуцента антибіотику, часу його максимального накопичення, вартості середовищ для культивування, в тому числі вартості застосовуваних попередників, загальних енергетичних витрат на процеси, пов'язані з розвитком продуцента антибіотику.

### 2. Стадія попередньої обробки культуральної рідини, клітин (міцелію) мікроорганізму і фільтрації (відділення культуральної рідини від біомаси продуцента).

Ефективність цієї стадії визначається складом середовища для вирощування продуцента, характером його росту, місцем основного накопичення біологічно активної речовини (у культуральній рідині або всередині клітин).

### 3. Стадія виділення й очищення.

На цій стадії залежно від властивостей антибіотика, його хімічної будови і основного місця накопичення антибіотичної речовини використовуються різні методи виділення і очищення.

					НУХТ БТЕК 02.01.02. КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Бережна К.І.			РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору післяферментаційних процесів отримання субстанції (напівфабрикату).	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Стабніков В.П.					40	489
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Основні методи – екстракція, осадження, сорбція на іонообмінних матеріалах, випарювання, сушіння. Особливість цієї технологічної стадії визначається тим, що на першому етапі роботи використовуються невеликі концентрації (не більше 1%) антибіотику, а на подальших етапах вона збільшується до 20-30%.

4. Стадія одержання готової продукції, виготовлення лікарських форм, розфасовка.

Особливість цієї стадії – дуже високі вимоги до якості кінцевого продукту. При хімічному очищенні антибіотичних речовин необхідно дотримуватись високої чистоти приміщень, устаткування, проводити систематичну їх дезінфекцію. Упакування й фасування (дозування), особливо для речовин, призначених для ін'єкцій, повинна здійснюватися в асептичних умовах.

У сучасних умовах виробництва антибіотиків необхідно уживати заходи для максимального зниження собівартості препаратів. Насамперед - це підвищення ефективності першої стадії. Для цього необхідно:

- впровадження у виробництво найбільш високопродуктивних штамів мікроорганізмів (продуцентів антибіотиків);
- створення й забезпечення самих сприятливих умов розвитку продуцента на відносно дешевих середовищах;
- широке використання математичних методів планування процесу розвитку організму й електронно-обчислювальної техніки з метою оптимізації й моделювання умов його культивування, що забезпечує максимальний вихід антибіотику;
- застосування сучасного обладнання на всіх стадіях технологічного процесу й використання автоматизованих контролюючих пристроїв основних параметрів розвитку організмів.

Наведені фактори разом з науковою організацією праці можуть забезпечити зниження собівартості антибіотиків, що випускаються.

Також необхідні підвищення якості антибіотиків, що випускаються, і їх стандартизація (Головей, 2017).

В процесі розвитку продуценту утворюваний ним антибіотик в більшості випадків повністю виділяється з клітин в середовище. Однак в деяких випадках частина антибіотика може залишатися в клітинах продуцента або антибіотик повністю накопичується в середині клітин продуценту.

В залежності від місця накопичення антибіотика підбирають методику його виділення. Так, якщо антибіотик знаходиться в культуральній рідині, його виділяють методами екстрагування, використовуючи з цією метою розчинники, що не змішуються з водою, осаджують у вигляді нерозчинної сполуки або сорбують іонообмінними смолами.

З клітин мікроорганізмів антибіотики виділяють екстрагуванням органічними розчинниками. При цьому досить часто клітини продуцентів бактерій необхідно руйнувати, тоді як мікроміцети мають більшу проникність клітин і антибіотик може бути екстраговано з неушкоджених клітин.

Відділення нативного розчину, що містить антибіотик, від біомаси та зважених частинок здійснюють методами фільтрації і центрифугування (Буценко, 2009).

Першим етапом у процесі очищення цільового продукту є етап сепарації - розділення культуральної рідини та клітинної біомаси. У деяких випадках сепарації передуює спеціальна обробка реакційної суміші, що сприяє ефективнішому відділенню біомаси та стабілізації продукту.

Для відділення біомаси застосовують різні методи сепарації.

Флотація. Метод застосовують у випадку, коли клітини продуцента через низьку змочуваність накопичуються в поверхневих шарах вмісту біореактора. Особливі пристрої (флотатори) різної

конструкції видаляють піну, що утворюється при культивуванні, разом із клітинами в ній.

Підвищення ефективності відбору біомаси досягається шляхом спінювання рідини з подальшим відділенням її верхнього шару механічним способом. Перевагами методу є його економність, висока продуктивність і можливість використання в безперервних процесах.

Фільтрування - це розділення твердої та рідкої фаз суспензії при її пропусканні через пористу перегородку. Кінцева мета фільтрування - одержання твердої або рідкої фази (коли одна з них належить до відходів) або одночасне одержання обох фаз.

Фільтрування - гідродинамічний процес, швидкість якого прямо пропорційна різниці тисків, яка виникає по обидва боки від фільтрувальної перегородки, й обернено пропорційна опору, якого зазнає рідина при проходженні через пори перегородки та шар осаду, що утворився.

На процес фільтрування впливають фактори, які можна поділити на дві групи.

Макрофактори - різниця тисків, товщина шару осаду, в'язкість рідкої фази та ін. Ці фактори відомі й контролюються за допомогою приладів.

Мікрофактори - розмір і форма часток осаду та пор фільтрувальної перегородки, товщина подвійного електричного шару на поверхні часток та ін. Ці фактори менш вивчені, їх характеризують лише непрямыми методами. Саме мікрофактори здійснюють вирішальний вплив на процес фільтрування й ускладнюють його масштабування.

При фільтруванні культуральної рідини утворюються здебільшого драглисті пластівчасті або дрібнозернисті осадки, що характеризуються більшим опором. Середня швидкість фільтрації при

цьому становить лише 50 л/м за годину. Для збільшення швидкості фільтрування зазвичай використовують два прийоми:

- Попередня обробка суспензій.
- Застосування допоміжних фільтрувальних матеріалів.

Попередня обробка культуральної рідини дозволяє повніше перевести цільовий продукт у рідку або тверду фазу, забезпечити краще розділення фаз і одержати продукт, придатний для подальшого очищення та виділення. У результаті попередньої обробки відбувається коагуляція завислих часток.

Найпоширенішими є такі способи попередньої обробки:

- Кислотна коагуляція (застосовується для виділення антибіотиків, стійких до низьких рН).
- Обробка електролітами.

Теплова коагуляція (застосовується у випадках, коли продукт стійкий до нагрівання при 70-80 °С).

Утворення наповнювачів при додаванні хімічних агентів.

Як допоміжні фільтрувальні матеріали використовують фільтрувальні порошки, що додають до фільтрованої рідини як наповнювачі або попередньо наносять на робочу поверхню фільтра у вигляді ґрунтового шару.

Різноманітні фільтруючі системи (барабанні, стрічкові, тарілчасті, мембранні фільтри, карусельні вакуум-фільтри, фільтри-преси) засновані на однаковому принципі - затримці біомаси на пористій фільтруючій перегородці.

Недоліком способу є налипання клітин на фільтр, шар яких знижує швидкість протікання рідини під безперервної час фільтрування. Для фільтрів безперервної дії передбачаються системи автоматичного очищення від біомаси, що забиває пори. Біомаса може видалятися з поверхні фільтрів стрімким потоком стисненого повітря

або спеціальними ножами. Існують також фільтри для багато або одноразового періодичного використання.

Наприклад, мембранні (зокрема тефлонові) фільтри дозволяють фільтрувати дуже розведені клітинні суспензії. Однак проблемою їх використання є швидка закупорка пор клітинами, білками та іншими колоїдними частками. Прийоми механічного видалення матеріалу, що забиває фільтри, при цьому способі фільтрації не придатні, оскільки ушкоджують мембрани. Для подолання ускладнень такого роду мембранні фільтри покривають гідрофільним шаром, що перешкоджає контакту білків (колоїдів) з поверхнею фільтра, або обробляють їх гідролітичними ферментами.

Центрифугування - це розділення неоднорідних систем під дією поля відцентрових сил. Для центрифугування застосовують центрифуги різних конструкцій. Центрифуги, що мають високий фактор розділення й оснащені тарілчастим барабаном, називають сепараторами. У мікробіологічній промисловості вони є одним з найпоширеніших типів центрифуг. Сепаратори дозволяють сконцентрувати осад до вологості 60-90%. Також існують спеціальні герметичні сепаратори, що дозволяють проводити процес сепарування у автоматизованому режимі, оптимально підібраному для специфічних умов конкретних культуральних рідин. Сфери застосування центрифугування такі:

- Отримання біомаси з культуральної рідини (дріжджі, бактерії, гриби).

- Відділення різноманітних цільових продуктів мікробіологічного синтезу (антибіотики, ферменти, вітаміни та ін.), переведених попередньо у тверду фазу.

- Розділення емульсій, що утворюються при екстракції.

Недоліки центрифугування:

- Складність конструкції, висока енергоємність і вартість.

- Складність експлуатації (ненадійність, вібрація, шум тощо).

- Вплив на клітини відцентрової сили, нагрівання, труднощі герметизації та забезпечення асептичних умов.

Основні переваги центрифугування й сепарування - висока продуктивність і високий ступінь концентрування, що дозволяють успішно конкурувати з іншими способами отримання й концентрування як у промислових, так і в лабораторних умовах. Цей спосіб дорожчий, ніж фільтрування, тому він застосовується, якщо:

- суспензія фільтрується занадто повільно;

- виникає необхідність максимального звільнення культуральної рідини від часток, що містяться в ній;

- необхідно забезпечити безперервний процес сепарації, коли фільтри розраховані на періодичну дію.

Центрифугування та фільтрація в деяких біотехнологічних процесах здійснюються комбіновано, тобто застосовуються фільтраційні центрифуги, у яких розділення рідкої та твердої фаз засновано на двох процесах - фільтруванні й центрифугуванні. Досить широко використовуються прийоми, коли розділення забезпечується лише відцентровою силою.

Найперспективнішими тут є центрифуги-сепаратори, у яких відокремлювана біомаса осідає на стінках обертового циліндра або спеціальних тарілчастих вставках (Кравченко, Савчук & Остапченко, 2019).

З урахуванням особливостей виробництва, для виділення біомаси з культуральної рідини застосовуємо центрифугування.

Отримання й очищення цільових продуктів

Отримання цільового продукту з культуральної рідини або гомогенату зруйнованих клітин, одержаного в результаті процесів дезінтеграції, здійснюється шляхом осадження, екстракції або із застосуванням різних методів адсорбції.

Осадження (седиментація) - це процес розшарування дисперсних систем під дією сили тяжіння й відділення дисперсної фази у вигляді осаду. Найпростіший приклад седиментації - відстоювання - застосовують у таких випадках:

-при діаметрі часток більше 3 мкм, коли броунівський рух істотно не впливає на процес відстоювання;

-при отриманні стабільних продуктів, коли фактор часу не має вирішального значення;

за нижчих порівняно з іншими методами витрат;

-в особливих випадках, коли необхідно розділити частки на фракції за розміром або щільністю на підставі різних швидкостей їх осадження;

-якщо необхідно попередньо розділити суспензію на дві фракції - осад і надосадову рідину, які надалі можна обробляти на різному обладнанні.

Швидкість осадження біомаси з культуральної рідини незначна і становить близько  $10^{-10}$  м/с.

Для прискорення процесу осадження застосовують:

-коагулянти - речовини, що переводять завислі частки в агрегатно-нестійкий стан;

-флокулянти - речовини, що сприяють руйнуванню колоїдних структур і утворенню великих пластівців.

Як коагулянти застосовують желатин, рибний клей, казеїн, а як флокулянти - метилцелюлозу, пектин, альгінат натрію та ін.

Осадження розчинених речовин здійснюється фізичними методами - нагріванням, розведенням або концентруванням, охолодженням розчину чи хімічними впливами, що забезпечують розчиненої речовини в малорозчинний стан. Зрозуміло, що залежно від цілей і властивостей продукту використовують той чи інший метод.

Екстракція - процес розділення суміші твердих і рідких речовин за допомогою вибіркового (селективного) розчинників (екстрагентів). Фізична сутність екстракції полягає в переході компонента, що екстрагується, з однієї фази (рідкої чи твердої) у фазу рідкого екстрагента при їх взаємному контакті. Компоненти, що екстрагуються, переходять із вихідного розчину в розчинник унаслідок різниці концентрацій, тому процес належить до дифузійних. Екстракція зазвичай проводиться у двофазних системах "тверде тіло — рідина" або "рідина - рідина". Сфера застосування екстракції: виділення й очищення антибіотиків, вітамінів, амінокислот.

Переваги методу:

- 1) низькі витрати;
- 2) висока швидкість екстракційних процесів.

Недоліки:

-використання шкідливих, вибухонебезпечних органічних розчинників.

Екстракція поділяється на твердо-рідкофазну (при якій продукт із твердої фази переходить у рідку) і рідко-рідкофазну (при якій продукт із однієї рідкої фази переходить у іншу, також рідку фазу). Твердо-рідкофазна екстракція може зводитися до простої обробки твердого зразка водою або органічним розчинником з метою екстракції з нього розчинних сполук.

Досить широко застосовуються різноманітні органічні розчинники, зокрема ацетон, який забезпечує ефективне переведення в розчин деяких ліпідних і білкових компонентів клітин. При рідко-рідкофазній екстракції також використовують різні органічні розчинники - алкілфеноли, ефіри, галогеніди, гексан, хлороформ та ін.

Ефективність екстракції можна істотно підвищити:

- багаторазовою обробкою екстрагуючим агентом;
- підбором оптимального розчинника;

-підігрівом екстрагуючого агента чи екстрагуючої рідини, що містить продукт;

-зниженням тиску в апараті для екстракції, що забезпечує досить ефективну екстракцію за відносно низької температури (останнє знижує витрати та зменшує ризик інактивації продукту)

Майже повністю інактивації дозволяє екстрагування на холоді, тобто кріоекстракція. При цьому вирівнюються відмінності між твердим субстратом і культуральною рідиною, оскільки обидва перебувають у замороженому стані (в одній фазі). Кріоекстракція проводиться з використанням розчинників, температура кипіння яких низька і які за кімнатної температури перебувають у газоподібному стані. Кріоекстракцію можна застосовувати в поєднанні з кріоконсервацією клітин. Клітинна біомаса може тривалий час зберігати властивості за умов глибокого заморожування, а потім з неї може бути екстрагований цільовий продукт.

У деяких випадках екстрагуючий агент може перебувати не в рідкому, а в газоподібному стані (при рідко-газофазній або твердо-газофазній екстракції).

Хроматографія, що поділяє за розмірами (гель-фільтрація).

Відмінності в розмірах молекул є основною властивістю, на якій ґрунтується метод гель-фільтрації. Механізм гель-фільтрації був вивчений ще в середині 50-х рр. ХХ ст. Метод набув популярності завдяки м'якому механізму розділення, що дозволяє зберігати біологічну активність, і належному макропористому сорбенту (сефадекс), який майже відразу стали випускати в промислових масштабах. Препаративна гель-фільтрація може бути умовно поділена на буферний обмін і фракціонування. Буферний обмін підходить для ситуацій, коли компоненти з низькою молекулярною масою (зазвичай молекули солі) обмінюються на іншу буферну речовину (тобто для кондиціонування до початку наступної стадії) або розчинник.

При фракціонуванні потрібна розчинена речовина має бути відділена від інших розчинених речовин подібного розміру, що зумовлює жорсткіші вимоги до вибору хроматографічного сорбенту й умов фракціонування. Отже, сефадекси – це поперечно зшиті декстриани із заданими розмірами пор. Зшиті ланцюги декстрану тривуглецевими містками за допомогою епіхлоргідрину. Чим більше поперечних зшивок, тим менш розміри пор. Отриманий таким способом гель відіграє роль молекулярного сита. При пропусканні розчину із сумішшю речовин через колонку, наповнену гідратованими гранулами сефадексу, великі частки, розмір яких перевищує розмір пор сефадексу, будуть рухатися швидко. Дрібні ж молекули, наприклад солі, рухатимуться повільно, оскільки в процесі руху проникатимуть усередину гранул (Кравченко, Савчук & Остапченко, 2019).

З урахуванням обробленої вище інформації нижче наведено обґрунтування вибору післяферментаційних процесів отримання біотехнологічного продукту.

Виділення біомаси

Промислові центрифуги поділяють:

- за принципом поділу - на осадні, поділяючі (сепару), фільтруючі та комбіновані;

- за характером перебігу процесу центрифугування - періодичної та безперервної дії;

- за конструктивною ознакою - на горизонтальні (з горизонтальним валом), похилі (з похилим валом) та вертикальні.

Вертикальні можуть бути підвісними з верхнім приводом, у яких вал підвішений на верхній пружній шарнірній опорі, а ротор закріплений на нижньому кінці валу, маятниковими з вертикальним валом, опори яких - поміщені в загальний жорсткий корпус, підвішений на трьох колонах, а ротор закріплений на верхньому кінці валу і маятниковими з вертикально підвішеним трубчастим ротором;

За способом вивантаження осаду з ротора центрифуги можуть бути:

- з вивантаженням осаду через верхній борт або днище;
- з ручною вигрузкою;
- із контейнерною чи касетною, гравітаційною, ножевою вигрузкою, пульсуючою із допомогою поршня та шнеків.

При виробництві біологічно активних речовин застосовують центрифуги періодичної дії з ручним і механізованим вивантаженням осаду, а при великотоннажному виробництві - автоматизовані центрифуги безперервної дії. При виборі центрифуг необхідно враховувати їх технологічні характеристики і фізичні властивості оброблюваного матеріалу (дисперсність твердої фази, в'язкість рідкої фази та її концентрація).

Концентрація суспензії дорівнює відношенню кількості твердої фази загальної кількості суспензії. Концентрація суспензії може бути виражена в масових (вагових) або об'ємних відсотках. Чим більша різниця між щільностями твердої фази і рідкою, тим вище продуктивність відстійної центрифуги (Голгер, Еслашов, 1987).

#### Ультрафільтрація

Ультрафільтраційні установки у біотехніці розроблені для концентрування та очищення ферментних та інших біологічно активних розчинів. Процес ультрафільтрації здійснюється в мембранних блоках плоскорамного типу. Ультрафільтраційний блок складається з 20-25 фільтруючих елементів і 20-24 ацетатцелюлозних мембран. Як опорні пластини можна застосовувати полістирол, органічне скло, міпласт та ін. Як прокладки застосовуються пароніт, гума і релін різної товщини. Прокладки з реліну добре ущільнюють зазори між фільтруючими елементами і при сильному стисканні пакета не призводять до механічних пошкоджень ультрафільтраційних мембран. Перевагами таких ультрафільтраційних блоків є

герметичність, надійна фіксація фільтруючих елементів та розділових прокладок та незначна кількість роз'ємних частин та деталей; недоліком - трудомісткість складання та розбирання блоку (Голгер, Еслашов, 1987).

Цей метод забезпечує найкращі результати при швидкому очищенні супернатанту від високомолекулярних сполук завдяки використанню фільтрів з малими порами.

Для ефективного концентрування рифаміцину, необхідно підібрати мембрани з необхідним розміром пор, тому розрахуємо розміри пор мембран:

Молекулярна маса рифаміцину становить 822,94 г/моль, діаметр молекул:

$$D = 0,098 \cdot M^{0.38} = 0,098 \cdot 822,94 \cdot 0.38 \approx 2 \text{ нм}$$

Отже, для концентрування рифаміцину та видалення низькомолекулярних домішок використовують мембрани з розміром пор 2 нм.

#### Екстракція

Основний метод виділення рифаміцину оснований на екстракції його з водної фази (очищеного супернатанту) органічними розчинниками: етилацетат чи бутилацетат, оскільки розчинність рифаміцину у органічних розчинниках у декілька разів вища ніж у воді. Для екстракції рифаміцину з водної фази необхідно використовувати розчинники які не змішуються з водою, наприклад бутилацетат чи етилацетат (в них антибіотик добре розчиняється). З двох розчинників етилацетат і бутилацетат обираємо для екстракції бутилацетат, оскільки перед етилацетатом він має такі переваги: нижча вартість, нелеткий при температурах до 90°C та досить нетоксичний тож потребуватиме менше засобів захисту для роботи з ним персоналу. До того ж хлороформ набагато дорожчий від бутилацетату. Потрібно відмітити, що рідку фракцію до екстрагування

треба підкислити до рН2 6М соляною кислотою. Для кращої екстракції рифаміцину та зменшення втрат обираємо 2 стадійну екстракцію (Zhao та ін., 2010).

#### Концентрування та видалення розчинника

Апарати, у яких процес згущення розчинів полягає у видаленні розчинника шляхом його випаровування, називають випарними. Випарні апарати, що застосовуються в хімічній, харчовій, мікробіологічній та інших галузях, можна класифікувати:

за розташуванням поверхні нагріву - на горизонтальні, вертикальні та похилі;

за видом теплоносія - на апарати з паровим, газовим обігрівом, з обігрівом високотемпературними теплоносіями під високим тиском (олією, даутермом, водою) і з електрообігрівом.

Найчастіше використовується обігрів парою, тому в подальшому розглядатимемо випарні установки тільки з паровим обігрівом:

за способом проходження теплоносія - на апарати з подачею теплоносія всередину трубок (кипіння розчину у великому обсязі в міжтрубному просторі) та з подачею теплоносія в міжтрубний простір (кипіння розчину в обмеженій зоні в трубках): на вигляд гріючих елементів - на апарати з паровими сорочками, вертикальними внутрішніми гріючими трубами, змійовиками і середнім змішуванням гріючої пари з розчином;

За характером циркуляції - на апарати з одноразовою, багатократною циркуляцією;

По тиску всередині апарату - на працюючі під надлишкоковим тиском та під вакуумом;

за режимом роботи - на періодичні та безперервні апарати.

У мікробіологічній промисловості найбільш широко використовується процес випарювання у вакуумних установках як

найбільш економічний спосіб попереднього концентрування продуктів мікробного синтезу (Голгер, Еслашов, 1987).

### Очищення рифаміцину за допомогою хроматографії

Існує багато видів хроматографії як по агрегатним станам: рідкофазова та твердофазова (при рідко фазовій сорбент або у вигляді гелю або у вигляді рідкої речовини прикріпленої до стінок колонки, при твердофазовій сорбент має тверду форму), а також по специфічності сорбентів: класична сорбційна, іонообмінна, афінна, лігандообмінна. Оглянувши достатньо літератури та наукових джерел інформації було прийнято рішення для очищення рифаміцину буде застосована іонообмінна хроматографія з твердою фазою-сорбентом та рідкою фазою (розчинником), оскільки даний тип хроматографії найбільше підходить до такого типу речовин по специфічності сорбції та відносній простоті ведення процесу. Після стадій екстракції та концентрації очищений рифаміцин доочищають за допомогою іонообмінної хроматографії аби антибіотик відповідав вимогам очищення.

Іонообмінна хроматографія — це метод розділення, аналізу й очищення речовин, заснований на їх взаємодії з іонообмінною смолою, що утримує заряджені молекули. Цей метод широко застосовується в біохімії, аналітичній хімії, фармацевтиці й інших галузях для розділення і аналізу сумішей іонів, білків, пептидів і нуклеїнових кислот.

### Принцип роботи

Іонообмінна хроматографія використовує здатність іонів у розчині взаємодіяти з зарядженими функціональними групами іонообмінника, що нанесені на тверду фазу (матрицю). В основі лежить електростатична взаємодія:

- Катіонообмінна хроматографія утримує катіони, використовуючи негативно заряджені групи (наприклад, сульфонати, карбоксилати).

- Аніонообмінна хроматографія утримує аніони за допомогою позитивно заряджених груп (наприклад, аміногруп).

Молекули утримуються в колонці іонною взаємодією, а їх елюювання (вимивання) здійснюється поступовою зміною умов (наприклад, рН, концентрації солі).

Етапи проведення

1. Підготовка системи:

- Вибір іонообмінника відповідно до типу заряджених молекул (катіони або аніони).

У нашому випадку, це буде катіонообмінна смола смола CM-Sepharose (на основі агарозного гелю)

- Регенерація іонообмінної смоли.

2. Завантаження зразка:

- Зразок вводять у колонку, і цільові молекули зв'язуються з іонообмінною матрицею.

3. Елюювання:

- Відбувається за рахунок зміни рН, концентрації іонів або розчинника.

- Більш слабо зв'язані компоненти вимиваються першими, а сильніше зв'язані — пізніше.

4. Збір фракцій:

- Очищені молекули збираються у фракції для подальшого аналізу.

Матеріали для іонообмінників

Іонообмінники виготовляють із полімерних матеріалів (наприклад, поліакриламід, агароза, декстран), які несуть заряджені функціональні групи:

- Катіонообмінники: сульфонатні ( $-\text{SO}_3^-$ ), карбоксильні ( $-\text{COO}^-$ ).
- Аніонообмінники: аміногрупи ( $-\text{NH}_3^+$ ,  $-\text{NR}_3^+$ ).

#### Застосування

##### 1. Розділення білків і пептидів:

- Використовується в біотехнології для очищення рекомбінантних білків.
- Дозволяє розділити білки за їх ізоелектричною точкою (pI).

##### 2. Аналіз нуклеїнових кислот:

- Виділення РНК і ДНК.

##### 3. Очистка антибіотиків і лікарських засобів.

##### 4. Аналіз іонів у воді:

- Використовується для виявлення іонів металів і аніонів у пробах води.

##### 5. Фармацевтика:

- Відділення і аналіз лікарських речовин.

#### Переваги

- Висока роздільна здатність.
- Висока ефективність очищення.
- Можливість працювати зі складними сумішами.

#### Недоліки

- Чутливість до зміни рН і концентрації солі.
- Обмежена ємність смоли.
- Витрати на підготовку й регенерацію колонок.

Іонообмінна хроматографія є незамінним інструментом для очищення біомолекул і розділення складних зразків у науці й промисловості. Її ефективність залежить від правильного вибору іонообмінника та умов елюювання.

## Кристалізація

Стадія направлена на виділення продукту з рідкої фази розчинника з подальшим його очищення. Тип кристалізації залежить від апаратів-кристалізаторів, які використовуються. Як основний апарат для кристалізації буде використовуватися реактор-кристалізатор з заповненням до 50 % та центрами кристалізації.

## Відділення кристалів

Кристали відділяються за допомогою центрифугування в осаджувальній центрифугі.

## Сушіння

Сушіння антибіотиків, зважаючи на термолабільність, може відбуватись за допомогою:

- ліофільної сушки;
- розпилювальної сушки;
- у вакуум-сушильних шафах.

Сублімаційна (ліофільна сушка).

Метод сублімаційного зневоднення дозволяє отримати продукти найвищої якості, оскільки в них повністю зберігається біологічна активність.

В процесі основного зневоднення матеріал знаходиться в замороженому стані, тому мікроструктура і властивості матеріалу зберігаються в максимальному ступені. Препарати, висушені цим методом зберігають початковий об'єм і легко поглинають вологу при зволоженні, зберігають колір, запах і ін..

## Переваги:

- волога видаляється при низьких температурах, що практично виключає термоінактивацію продукту;
- зберігається стабільна структура матеріалу (не відбувається руйнування або конгломерації частинок);

- практично виключається видалення летких компонентів матеріалу, що висушується, порушення його хімічного складу;

- полегшується можливість отримання сухого продукту, упакованого у стерильному вигляді.

Недоліки:

- складність сублімаційного обладнання;

- тривалість і енергоємність процесу.

Розпилювальне сушіння.

Відбувається при високих температурах. Розчин антибіотика пневматично розпилюється до мікрокрапинок в камері з потоком нагрітого повітря. Процес сушіння антибіотиків триває декілька секунд. За таких умов зберігаються навіть термолабільні препарати.

Вакуумна сушка.

Сушіння при низьких температурах (30-35°C). Дешевий та ефективний метод.

Недоліки:

- отримання матеріалу у вигляді коржа;

- не можна піддавати такому сушінню рідини;

- малоефективний, оскільки є необхідним великий обсяг площ (Буценко, 2009).

Висушені препарати мають вологість трохи більше 5-12 %. Слід пам'ятати, більшість ферментних препаратів термолабільні і можуть інактивуватися при температурах понад 35-40°C. Тому зневоднення ферментних розчинів та суспензій здійснюють у низькотемпературних умовах сушіння.

Кормові антибіотики (препарати теравіту, бновіту, бациліхіну, бацитрацину та ін) також чутливі до температур сушіння. Їх піддають сушінню в стрічкових і розпилювальних сушилках до залишкової вологості 8-10%. Хороші результати отримані при сушінні антибіотиків у сушарках із киплячим шаром.

Максимальна температура продукту при цьому сушінні не повинна перевищувати 60°C. Підвищення температури сушіння значно знижує активність препаратів та збільшує втрати в них вітамінів. Так, при сушінні біовіту на стрічковій сушарці при 80 °C активність препарату знижується до 20%, а вміст вітаміну В 13 - 20-10%.

Процес сушіння бактеріальних добрив та засобів захисту рослин (мігратин, азотобактерин, фосфобактерин, боверин, інсектин, токсобактерін та ін.) має ту особливість, що після сушіння в препаратах має зберегтися максимальна кількість життєздатних високоактивних мікроорганізмів.

Сушіння цих препаратів здійснюють на розпилювальних сушарках; отримані хороші результати сушіння цих препаратів на сублімаційних сушарках. На розпилювальних сушарках процес протікає при температурі сушильного агента 130°C, при температурі продукту, що висушується, не більше 50 °C.

Так як, температура сушіння продуктів у вигляді твердих кристалів чи волого порошку рідко перевищує 40...50°C, отже немає сенсу використовувати вакуумну сушарку, до того ж рифаміцин не відноситься до термолабільних сполук.

Так як кількість рифаміцину за 1 цикл культивування становить лише 1,37 кг, для сушіння обираємо вакуум-сушильну шафу.

#### **4.1. Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях**

Вихідні дані:

a. об'єм культуральної рідини (КР) з однієї ферментації  $V_{кр} = 4575,7$  л

b. концентрація цільового продукту у КР, 0,5 г/л;

c. концентрація біомаси у КР, 6 г/л

d. втрати (у %) на стадіях виділення цільового продукту 43%

Початкова кількість цільового продукту, яка поступає з КР складає  $4575,7 \text{ л} \cdot 0,5 \text{ г/л} = 2287,9 \text{ г}$ ; кінцева кількість (з урахуванням 40 % втрат) має становити 1372,7 г.

В 4575,7 л культуральної рідини 27,5 кг біомаси, яка після культивування піде на утилізацію.

Таблиця 4.1.1. Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях

№ п/п	Назва стадії (операції)	Матеріальні потоки на стадії	Кількість по стадіях			Необхідне обладнання
			Надійшло	Втрати, (Разом .... %)	Вийшло	
1	2	3	4	5	6	7
<b>ТП1. Зберігання культуральної рідини</b>						
1	ТП1.1. Зберігання культуральної рідини	КР	4,6 м <sup>3</sup> (4575,7 л)	-	4,6 м <sup>3</sup> (4575,7 л)	Збірник 5000 л
<b>ТП2. Відділення біомаси</b>						
2	ТП2.1. Центрифугування культуральної рідини	Біомаса	4548,2 л	2%	4457,2 л	Осаджувальна центрифуга зі шнековою вигрузкою осаду, частота обертання – 2000 л/год
		Фугат	4457,2 л	(4320,8 -1 л)	4456,2 л	Збірник 5000 л
<b>ТП3. Ультрафільтрація</b>						
3	ТП3.1. Ультрафільтрація супернатанту	Супернатант	4456,2 л	1%	4411,6 л	Ультрафільтраційна установка Р – 200 л/год Діаметр пор мембрани 2 нм
		Концентрат	4411,6 л	-	442 л	

ТП4. Екстракція						
4	ТП4.1. Екстракція етилацетатом	Концентрат	442 л	-	-	Екстрактор роторного типу Продуктивність – 450 л/год
		Етилацетат	884 л	-	-	
		Суміш	1326 л	2%	1299,5 л	
ТП5. Центригування						
5	ТП5.1. Центригування	Етилацетатний екстракт	1299,5 л	-	-	500 л/год
		Супернатант	909,65 л	1%	900,55 л	
		Побічні продукти (відходи)	389,85 л	-	-	
ТП6. Концентрування						
6	ТП6.1. Вакуумне випарювання	Супернатант	900,55 л	-	-	Вакуум випарна установка Продуктивність – 450 л/год
		Випарений етилацетат	770,65 л	-	-	
		Концентрат	129,9 л	1%	128,6 л	
ТП7. Кристалізація						
7	ТП7.1. Кристалізація рифаміцину	Концентрат	128,6 л	-	-	Реактор- кристалізатор 1м <sup>3</sup>
		Кристалізована маса	2,3 кг	5%	2,19 кг	
ТП8. Центрифугування						
8	ТП8.1. Центрифугування	Кристалізована маса	2,19 кг	-	-	Осаджувальна центрифуга зі шнековою вигрузкою осаду, частота обертання – 2000 л/год
		Відфільтровані кристали	1,97 кг	1%	1,95 кг	

ТП9. Очистка на хроматографі						
9	ТП9.1. Перерозчинення кристалів	Відфільтровані кристали	1,95 кг	-	-	Реактор із перемішувальним пристроєм 0,1 м <sup>3</sup>
		Фосфатний буферний розчин рН 7,4	2 л	-	-	
		Суміш	3,95 л	-	-	
	ТП9.2. Процес хроматографічної очистки	Суміш	3,95 л	14%	3,48 л	Хроматограф: АКТА Process (Швейцарія) Колонка: Діаметр 5 см Довжина 25 см Матеріал нержавіюча сталь Аніонна смола Q-Sepharose (на основі агарозного гелю)
		Елюент (NaCl)	12 л	-	-	
ТП10. Екстракція						
10	ТП10.1. Екстракція етилацетатом	Очищений рифаміцин	2,96 кг	-	-	Екстрактор роторного типу Продуктивність – 450 л/год
		Етилацетат	5,9 л	-	-	
		Суміш	8,88 кг	2%	8,7 кг	
ТП11. Повторне випарювання						
11	ТП11.1. Концентрування	Етилацетатний екстракт	8,7 кг	-	-	Вакуум випарна установка Продуктивність – 350 л/год
		Концентрат	3,1 кг	3%	3,0 кг	
ТП12. Кристалізація						
12	ТП12.1. Кристалізація рифаміцину	Концентрат	3,0 кг	-		Реактор-кристалізатор об'ємом 50 л
		Суспензія кристалами	з 1,65 кг	2%	1,62 кг	

ТП13. Центрифугування						
13	ТП13.1. Відділення кристалів	Суспензія з кристалами	1,62 кг	5%	1,54 кг	Осаджувальна центрифуга зі шнековою вигрузкою осаду, частота обертання – 2000 л/год
		Кристалізований рифаміцин	1,54 кг	-	1,45кг	
ТП14. Висушування кристалів						
14	ТП14.1. Висушування у сушильній шафі	Кристалізований рифаміцин	1,45 кг	1%	1,44 кг	Вакуум- сушильна шафа Потужність – 2500Вт Максимальна загрузка – 25 кг
		Осад	1,44 кг	-	1,38 кг	
ПМВ15. Пакування, маркування, відвантаження						
15	ПМВ15.1. Пакування у первинну упаковку	Пакування у первинну упаковку	1,38 кг	1%	1,37 кг	Пакувальна машина

## 4.2. Специфікація обладнання

Таблиця 4.2.1 Специфікація обладнання ділянки стадій виділення рифаміцину

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
РЗ-1 РЗ-3 РЗ-5 РЗ-6 РЗ-24	Реактор-змішувач	5	Ємність із нержавіючої сталі, різних об'ємів обладнана пристроєм перемішування із спуском знизу
З-21	Збірник	1	Ємність із нержавіючої сталі AISI 316L
Н-2 Н-4 Н-7 Н-10 Н-12 Н-15 Н-18 Н-20 Н-24 Н-26 Н-29	Насос	11	Насос відцентровий із нержавіючої сталі Alfa Laval. Продуктивність: 500 м <sup>3</sup> /год Робочий тиск: до 15 бар Температура рідини: -10° до +150°С
Ц-8 Ц-14 Ц-19 Ц-30	Центрифуга осаджувальна	4	Центрифуга Alfa Laval Робочий об'єм: 2000 л. Мішалка: 0-6000 об/хв. Виробник: Швеція
УФ-9	Ультрафільтраційна установка	1	Vivaflow 50 Продуктивність – 200 л/год Діаметр пор поліетилсульфонової мембрани 2 нм
Е-13 Е-25	Екстрактор	2	Екстрактор об'ємом 500 л, виготовлений із нержавіючої сталі AISI 316L

## Закінчення таблиці 4.2.1

ХК-23	Хроматограф	1	Хроматограф: АКТА Process (Швейцарія) Колонка: Діаметр 5 см Довжина 25 см Матеріал нержавіюча сталь
ВВУ-16 ВВУ-27	Вакуум випарна установка	2	ІКА RV 10 Digital V / Control V (Німеччина) Основні параметри: Температурний діапазон нагрівального блоку: Від +20 °С до +180 °С. Об'єм нагрівального блоку: До 4 літрів (залежить від моделі бані). Діапазон вакууму: До 5 мбар (залежно від підключеного вакуумного насоса). Швидкість обертання колби: Від 20 до 280 об/хв. Розмір випарної колби: Стандартно 50 мл – 3 літри.
СПШ-25	Шафа сушильна	1	Шафа вакуумна Memmert VO Series (Німеччина) Температурний діапазон від +20 до +200°С Тиск до 5мбар Об'єм камери до 29 літрів

## РОЗДІЛ 5. Опис технологічної схеми виділення і очищення субстанції (напівфабрикату)

*ДР 1. Санітарна підготовка та приготування допоміжних розчинів*

*ДР1.1. Приготування екстрагенту.*

У реактор змішувач РЗ-1 подають 890 л попередньо проконтрольованого (вхідний контроль виробництва) етилацетату, перемішують для однорідності та відправляють на стадію екстрагування Е-13 там Е-25.

*ДР1.2. Приготування елюенту.*

У реактор змішувач РЗ-3 подають 12 л попередньо проконтрольованого (вхідний контроль виробництва) NaOH, перемішують для однорідності та відправляють на стадію елюювання ХК-23.

*ДР1.3. Приготування фосфатного буферного розчину рН 7,4.*

Для утворення 2 літрів фосфатного буферного розчину рН 7,4 у реактор змішувач РЗ-5 додають близько 1,5 л дистильованої води, 17,11 г  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  та 13,52 г  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , добре перемішують, доводять рН до потрібного і подають у збірник З-21.

*ТП2. Відділення біомаси.*

*ТП2.1. Центрифугування культуральної рідини.*

З реактора збірника через відцентровий насос подається 4548,2 л культуральної рідини у ємність центрифуги Ц-8 для розділення та осадження біомаси від культуральної рідини.

В результаті, супернатант, який виділився одразу подяють насосом Н-10 до ультрафільтраційної установки УФ-9.

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	НУХТ БТЕК 02.01.02. КР ПЗ			
Розроб.		Бережна К.І.			РОЗДІЛ 5. Опис технологічної схеми виділення і очищення субстанції (напівфабрикату).	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Стабніков В.П.					66	869
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

### *ТПЗ. Ультрафільтрація.*

#### *ТПЗ.1. Ультрафільтрація супернатанту.*

У процесі ультрафільтрації, використовуючи поліетилсульфонові мембрани діаметром пор 2 нм, ми концентруємо наш супернатант у 10 разів, в результаті утримуючи 442 л концентрату, які йдуть на стадію ТП4.1. екстракція.

#### *ТП4. Екстракція.*

##### *ТП4.1. Екстракція етилацетатом.*

До екстрактора Е-13, де вже міститься відконцентрований супернатант, після стадії ТПЗ.1. через насос Н-12 подають етилацетат із РЗ-1 в кількості 890 літрів, включаючи перемішування мішалки на 200об/хв. Подають пару у сорочку та нагрівають місткість ректора до 20°C та витримують 40-45 хв.

Після завершення процесу мішалку зупиняють перекриваючи подачу пари. Вистоюють суміш до настання ефекту розділення фаз. Перша верхня фаза – етилацетатна суміш із рифаміцином, друга фаза - водна. Далі водну фазу зливають у каналізацію, а етилацетатну лишають у реакторі.

#### *ТП5. Центрифугування.*

##### *ТП5.1. Центрифугування етилацетатного розчину.*

Проводять повторне центрифугування Ц-14 для розділення фаз, так як після стадії екстракції рифаміцин знаходиться в органічному розчиннику (етилацетаті), а непотрібні речовини (наприклад, водорозчинні залишки або тверді частки) – у водній фазі. Тому, центрифугування допомагає нам швидко і ефективно розділити ці фази, особливо коли рідини не змішуються або важко відокремлюються шляхом осадження.

### *ТП6. Концентрування.*

#### *ТП6.1. Вакуумне випарювання.*

Після розділення фаз насосом Н-15 супернатант з центрифуги Ц-14 перекачують до вакуум випарної установки ВВУ-16 виставляючи всі необхідні параметри, подають пару до апарата, підтримуючи температуру на рівні 50°C під час усього процесу випарювання.

Упарювання відбувається із 900,55 л до 128,6 л разом із втратами під час процесу.

#### *ТП7. Кристалізація.*

##### *ТП7.1. Кристалізація рифаміцину.*

У сорочку реактора кристалізатора КР-17, в який надійшло 128,6 л концентрату подають охоложену воду температурою близько 4°C та охолоджують сам реактор до 5°C, вмикають мішалку на 50-70 об/хв.

Триває процес близько 20-30 хв, під час якого ми візуально контролюємо процес формування та випадіння кристалів.

#### *ТП8. Центрифугування.*

##### *ТП.8.1. Відділення кристалів.*

Скристалізовану масу 2,19 кг відправляють в осаджувальну центрифугу Ц-19 для подальшого розділення фаз. В результаті отримують відфільтровані кристали, які далі йдуть на перерозчинення та хроматографічну очистку.

#### *ТП9. Очистка на хроматографі.*

##### *ТП9.1. Перерозчинення кристалів.*

У збірник із перемішуванням З-21 додають 2 літри фосфатного буферного розчину рН 7,4 вносять всю кількість відфільтрованих кристалів та вмикають перемішуючий пристрій. Тривалість процесу близько 10 хвилин.

### *ТП9.2. Хроматографічна очистка.*

Зі збірника З-21 насосом Н-22 порційно подають розчин рифаміцину до проміжної ємності у хроматографічній системі ХК-23. Розчин подають рівними порціями зі швидкістю 1л/год.

Протягом процесу рифаміцин адсорбується на сорбент колонки і затримується на ній. Орієнтовно процес триває 4 години. Розчин, що виходить з колонки зливають каналізацію. Після з реактора через проміжну ємність хроматографу подають елюент (NaOH) у кількості 12 л. Пропускають елюент зі швидкістю 1 л/год. Елюент з колонки з рифаміцином збирають у реактор РЗ-24.

### *ТП10. Екстракція.*

#### *ТП10.1. Екстракція етилацетатом.*

Даний технологічний етап потрібен для відокремлення рифаміцину від залишкових натрієвих солей та видалення залишків лужного розчину NaOH, який може лишитись після елюювання і негативно впливати на подальші етапи очищення або зберігання.

### *ТП11. Повторне випарювання.*

#### *ТП11.1. Концентрування.*

Упарювання відбувається із 8,7 кг до 3,0 кг.

### *ТП12. Кристалізація.*

#### *ТП12.1. Кристалізація рифаміцину.*

У сорочку реактора кристалізатора КР-28, в який надійшло 3,0 кг концентрату подають охолоджену воду температурою близько 4°C та охолоджують сам реактор до 5°C, вмикають мішалку на 50-70 об/хв.

Триває процес близько 20-30 хв, під час якого ми візуально контролюємо процес формування та випадіння кристалів.

### *ТП13. Центрифугування.*

#### *ТП.13.1. Відділення кристалів.*

Скристалізовану масу 1,62 кг відправляють в осаджувальну центрифугу Ц-30 для подальшого розділення фаз. В результаті отримують відфільтровані кристали, які далі йдуть на стадію висушування.

#### *ТП14. Висушування.*

##### *ТП14.1. Висушування у сушильній шафі.*

Однією із кінцевих операцій є висушування кристалів у вакуумній сушильній шафі СШ-31.

Сушіння проводять при температурі 40°C під вакуумом до вологи 5-7%.

#### *ТП15. Пакування, маркування, відвантаження.*

##### *ТП.15.1. Пакування у первинну упаковку.*

Висушені кристали переносять у бункер пакувального апарату, завантажують пакувальну мішкову стрічку та починають процес пакування. Дозування виставляють на відмітку 50 г з точністю 0.1 г.

## РОЗДІЛ 6. Контроль виробництва

### 6.1. Підбір сучасних методів контролю виробництва субстанції (напівфабрикату)

C43H58N4O12

Характеристики:

Зовнішній вигляд: червонувато-коричневий або коричнево-червоний кристалічний порошок.

Розчинність: слабо розчинний у воді, розчинний у метанолі, слабо розчинний в ацетоні та етанолі (96 %).

Ідентифікація:

А. Ультрафіолетова та видима абсорбційна спектрофотометрія (2.2.25).

Тестовий розчин

50 мг розчиняють у 50 мл метанолу Р.

Розведіть 1 мл цього розчину до 50 мл розчином фосфатного буфера рН 7,4 Р.

Спектральний діапазон: 220-500 нм.

Максимуми поглинання: при 237 нм, 254 нм, 334 нм і 475 нм.

Коефіцієнт поглинання:  $A_{334}/A_{475} =$  приблизно 1,75.

В. Інфрачервона абсорбційна спектрофотометрія (2.2.24).

Приготування: розтирати в рідкому парафіні Р.

Порівняння: рифампіцин CRS.

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	НУХТ БТЕК 02.02.02. КР ПЗ			
Розроб.		Бережна К.І.			РОЗДІЛ 6. Контроль виробництва	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Стабніков В.П.					71	894
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

С. Розчиніть приблизно 25 мг у 25 мл води Р, струшуйте протягом 5 хв і відфільтруйте. До 5 мл фільтрату додають 1 мл 100 г/л розчину персульфату амонію Р у фосфатному буферному розчині рН 7,4 Р і струшують протягом кількох хвилин. Колір змінюється з оранжево-жовтого на фіолетово-червоний, осад не утворюється.

Споріднені речовини. Рідинна хроматографія (2.2.29). Готуйте досліджуваний розчин і розчин порівняння безпосередньо перед використанням.

Суміш розчинників. До 10 об'ємів 210,1 г/л розчину лимонної кислоти моногідрату Р додають 23 об'єми 136,1 г/л розчину калію дигідрофосфату Р, 77 об'ємів 174,2 г/л розчину калій гідрофосфату Р, 250 об'ємів ацетонітрилу і 640 об'ємів води.

Випробувальний розчин. 20,0 мг досліджуваної речовини розчиняють в ацетонітрилі Р і доводять до 10,0 мл тим самим розчинником. Розведіть 5,0 мл цього розчину до 50,0 мл сумішшю розчинників.

Еталонний розчин. 20,0 мг рифампіцин хінону CRS (домішка А) розчинити в ацетонітрилі Р і розвести до 100,0 мл. тим же розчинником. До 1,0 мл цього розчину додають 1,0 мл. досліджуваного розчину та розведіть до 100,0 мл. із сумішшю розчинників.

Колонка:

- розмір: 1 - 0,12 м, = 4,6 мм;

Нерухома фаза: октилсилил силікагель для хроматографії Р (5 мкм).

Рухома фаза: змішати 35 об'ємів ацетонітрилу Р і 65 об'ємів розчину, що містить 0,1 об.% кислоти фосфорної Р, 1,9 г/л натрію перхлорату Р, 5,9 г/л. кислоти лимонної моногідрату Р і 20,9 г/л. дигідрофосфату калію Р.

Швидкість потоку: 1,5 мл/хв.

Виявлення: спектрофотометр при 254 нм.

Ін'єкція: 20 мкл.

Тривалість дії: вдвічі більше часу утримування рифампіцину.

Придатність системи: еталонний розчин:

- роздільна здатність: мінімум 4,0 між піками рифампіцину та домішки А; при необхідності регулюють концентрацію ацетонітрилу в рухомій фазі.

Обмеження:

домішка А: не більше ніж у 1,5 рази перевищує площу відповідного піку на хроматограмі, отриманій з розчином порівняння (1,5 відсотка);

будь-які інші домішки: для кожної домішки не більше площі піку рифампіцину на хроматограмі, отриманій з розчином порівняння (1,0%);

сума домішок, крім А: не більше ніж у 3,5 рази перевищує площу піку рифампіцину на хроматограмі, отриманій з розчином порівняння (3,5 відсотка); межа неврахування: 0,05 площі піку рифампіцину на хроматограмі, отриманій з розчином порівняння (0,05%).

Втрати при висушуванні (2.2.32): максимум 1,0 %, визначені на 1000 г висушуванням при 80 °С і тиску не вище 0,67 кПа протягом 4 год.

Сульфатна зола (2.4.14): максимум 0,1%, визначена на 2,0 г

#### АНАЛІЗ

0,100 г розчиняють у метанолі Р і доводять до 100,0 мл тим самим розчинником. Розведіть 2,0 мл цього розчину до 100,0 мл фосфатним буферним розчином рН 7,4 Р. Виміряйте абсорбцію (2.2.25) при максимумі поглинання при 475 нм, використовуючи фосфатний буферний розчин рН 7,4 Р як компенсаційну рідину.

Обчисліть вміст C<sub>43</sub>H<sub>58</sub>N<sub>4</sub>O<sub>12</sub>, взявши питому абсорбцію рівною 187.

### ЗБЕРІГАННЯ

В атмосфері азоту в герметичному, захищеному від світла контейнері при температурі не вище 25 °С.

### ДОМІШКИ

Зазначені домішки: А.

Інші домішки, які можна виявити (наведені нижче речовини, якщо вони присутні на достатньому рівні, можуть бути виявлені тим чи іншим із тестів у монографії. Вони обмежені загальним критерієм прийнятності для інших/невизначених домішок та/або загальною монографією Речовини Для фармацевтичного використання (2034) немає необхідності ідентифікувати ці домішки для демонстрації відповідності. Див. також 5.10.

Контроль домішок у речовинах для фармацевтичного використання): В.

Більш стисла інформація представлена у таблиці 6.1.

Таблиця 6.1. Методи контролю виробництва субстанції рифаміцину

Показники якості	Критерії прийнятності	Методика контролю
Опис	Червонувато-коричневий або коричнево-червоний кристалічний порошок	Візуально Згідно «EUROPEAN PHARMACOPOEIA 11.0»
Розчинність	Слабо розчинний у воді, розчинний у метанолі, слабо розчинний в ацетоні та етанолі (96 %).	Згідно «EUROPEAN PHARMACOPOEIA 11.0»

Ідентифікація	Ультрафіолетова та видима абсорбційна спектрофотометрія. Інфрачервона абсорбційна спектрофотометрія.	Згідно ДФУ(2.2.25)  Згідно ДФУ(2.2.24)
Втрата маси при висушуванні	Максимум 1,0 %, визначені на 1000 г висушуванням при 80 °С і тиску не вище 0,67 кПа протягом 4 год.	Згідно ДФУ(2.2.32)
Сульфатна зола	Максимум 0,1%, визначена на 2,0 г	Згідно ДФУ(2.4.14)
Домішки	Домішка А: не більше ніж у 1,5 рази перевищує площу відповідного піку на хроматограмі, отриманій з розчином порівняння (1,5 відсотка); будь-які інші домішки: для кожної домішки не більше площі піку рифампіцину на хроматограмі, отриманій з розчином порівняння (1,0%); сума домішок, крім А: не більше ніж у 3,5 рази перевищує площу піку рифампіцину на хроматограмі, отриманій з розчином порівняння (3,5 відсотка); межа неврахування: 0,05 площі піку рифампіцину на хроматограмі, отриманій з розчином порівняння (0,05%).	Рідинна хроматографія Згідно ДФУ(2.2.29)

Кількісне визначення	Вміст рифаміцину (C <sub>43</sub> H <sub>58</sub> N <sub>4</sub> O <sub>12</sub> ) в субстанції має бути від 98,0 % до 102,0 % в перерахуванні на безводну речовину.	Рідинна хроматографія Згідно ДФУ(2.2.29)
Мікробіологічна чистота	Препарат не повинен мати сторонніх мікроорганізмів, цвілі і дріжджоподібних грибів.	Згідно ДФУ(2.6.13)

Також нижче наведена карта постадійного на кожній ділянці виробництва.

Таблиця 6.2. Карта постадійного контролю стадій ділянки виробництва

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
1	2	3	4	5
ДР 1. Приготування допоміжних розчинів				
Кх 1.1 Приготування екстрагенту	Концентрація розчину	Хімічний метод	Концентрація визначається після приготування розчину	Густина 0,880-0,882 г/см <sup>3</sup>
Кх 1.2 Приготування елюенту	Концентрація розчину	Хімічний метод	Концентрація визначається після приготування розчину	Масова доля ацетону, не менше 99,5% Густина 0,789-0,791 г/см <sup>3</sup>
Кх 1.3 Приготування буферного розчину рН 7,4	Концентрація розчину	Хімічний метод	Концентрація визначається після приготування розчину	рН = 7,4

ТП 2. Стадії виробництва субстанції				
Кт 2.1 Центрифугування культуральної рідини	Культуральна рідина, частота обертання, час, температура	Годинник, датчик обертів, Термометр технічний	Під час процесу центрифугування	$t = 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ $n=2600\text{ об/хв}$ $\tau = 40\text{ хв}$
Кт 3.1 Ультрафільтрація	Супернатант, температура, час, діаметр пор мембрани	Термометр технічний, годинник, перевірка діаметру пор згідно паспорту мембрани	Під час процесу ультрафільтрації	$t = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$ $\tau = 80\text{ хв}$ , $d\text{ пор} = 2\text{ нм}$
Кт 4.1 Екстрагування	Супернатант, температура	Термометр технічний	Під час процесу екстракції	$t = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ $\tau = 40\text{-}45\text{ хв}$
Кт 5.1 Концентрування	Температура	Термометр технічний	Під час процесу концентрування	$t = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ $\tau = 40\text{-}45\text{ хв}$
Кт, Кх 6.1 Хроматографічна очистка	Елюат, рН, час, швидкість потоку	Датчик рН, годинник, система хроматографа	Під час процесу хроматографії	$\text{pH}=7,5$ $\tau = 4\text{ год}$ , $V = 1\text{ л/год}$
Кт, Кх 7.1 Кристалізація	Концентрат, концентрація поліетиленгліколь, температура, час, рН	Термометр технічний, дозатор, годинник, рН датчик	Температура, рН визначається під час кристалізації	$t = 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ $\tau = 7\text{ днів}$
Кт 8.1 Центрифугування для відділення осаду	Кристалічний осад ферменту, частота обертання, час, температура	Годинник, датчик обертів, температура	Під час процесу центрифугування	$t = 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , $n=2000\text{ об/хв}$

## Закінчення таблиці 6.2

Кт 9.1 Висушування	Температура, тривалість	Технічний термометр, годинник	Під час висушування	$t=40\pm 3$ °С, $\tau = 12-17$ год $W = 6-7\%$
Кт 10.1 Пакування	Кількість препарату	Ваги	Під час пакування	Цілістність капсул, якість нанесення етикетки, правельність і чіткість маркування, а також комплектність упаковки

## РОЗДІЛ 7. Проєкт заявки на корисну модель

Постановка задачі корисної моделі та її вирішення

Задача корисної моделі полягає у створенні оптимальної технології одержання антибіотику на основі штамів *Amycolatopsis mediterranei* U32, яка б забезпечувала ефективну профілактику лікування туберкульозу.

Поставлена задача вирішується тим, що для синтезу *Amycolatopsis mediterranei* U32 потрібна присутність нітратів, у звичному середовищі для культивування, що в подальшому стимулює вихід ферментів для біосинтезу рифаміцину у більшій кількості.

Опис запропонованого способу

Причинно-наслідковий зв'язок між сукупністю запропонованих ознак та очікуваним технічним результатом полягає в наступному.

Використання *Amycolatopsis mediterranei* U32, дозволить створити лікарський засіб, який забезпечить ефективну профілактику лікування туберкульозу на даний період часу.

Бактерії культивуються у спеціальному поживному середовищі, що складається з триптон (2 г/л), дріжджового екстракту (1 г/л), глюкози (10 г/л), яловичий екстракт (1 г/л), гліцирин (1 г/л) та KNO<sub>3</sub> (8 г/л).

Культивування проводиться протягом 96 годин при температурі 30 °С та швидкості обертання 100 об/хв. Ці умови забезпечують оптимальний вихід біомаси бактерій.

					НУХТ БТЕК 02.01.02. КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 7. Проєкт заявки на корисну модель		
Розроб.	Бережна К.І.				Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.	Стабніков В.П.					79	882
Реценз.					Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Затверд.	Стабніков В.П.						

Під час культивування до спеціального поживного середовища вноситься оптимально розрахована кількість нітратної групи для збільшення виходу цільового продукту.

Після завершення процесу ферментації, бактерії проходять післяферментаційні процеси. Вони включають відокремлення біомаси шляхом центрифугування, центрифугування, екстрагування, осаджування, фільтрування, сушіння, фасування, пакування та маркування.

Відокремлення біомаси центрифугуванням дозволяє значно скоротити час фільтрування суспензії та забезпечити безперервний процес сепарації згодом.

В свою чергу сушіння біомаси здійснюється в універсальній сушарці, що дозволяє швидко і легко висушувати розчини, перетворюючи їх на ідеально подрібнений сухий продукт завдяки безперервному процесу з високою продуктивністю.

Завершальним етапами виробництва є здійснення операцій фасування, пакування та маркування.

Формула корисної моделі

Лікарський засіб синтезований на основі штаму бактерій *Amycolatopsis mediterranei* U32.

В основу запропонованого способу покладено використання штаму *Amycolatopsis mediterranei* U32, що культивується у спеціально підготовленому поживному середовищі. Під час культивування до спеціального поживного середовища вноситься оптимально розрахована кількість нітратної групи для збільшення виходу цільового продукту.

Культивування проводиться протягом 96 годин при температурі 30 °C та швидкості обертання 100 об/хв. Ці умови забезпечують оптимальний вихід біомаси бактерій.

Реферат

Винахід належить до галузі фармацевтичної біотехнології, зокрема до розробки біологічно активних добавок, спрямованих на покращення здоров'я населення.

Запропонована корисна модель стосується створення ЛЗ на основі штаму бактерій *Amuocolatopsis mediterranei* U32.

Винахід передбачає використання методу для збагачення нітратами, у звичному середовищі для культивування, що в подальшому стимулює вихід ферментів для біосинтезу рифаміцину у більшій кількості.

*Amuocolatopsis mediterranei* U32 має коротший час культивування (порівняно із аналогами на ринку) і досить не вибагливі вимоги, концентрація рифаміцину у кінці культивування (завдяки додаванню нітратної групи) є пропорційно вигідною із економічної точки зору.

Даний лікарський засіб призначений для профілактики лікування туберкульозу різної локалізації, а також лепрі (у комбінації з дапсоном), остеомієліті, бронхіті та пневмонії, отиті, холециститі, пієлонефриті, та для профілактики менінгококового менінгіту в осіб, що мали контакт з хворими.

## **ВИСНОВКИ**

За даними наведеними вище, можна сказати, що одержання антибіотиків групи рифаміцинів є досить актуальним в умовах сьогодення.

Нові штами можуть сприяти усуненню не лише локальної проблеми із туберкульозом та побічними захворюваннями, а почати переможну боротьбу із резистентністю *Mycobacterium tuberculosis* до антибіотиків присутній зараз на відчизняному і закордонному ринках.

Великим плюсом також буде збагачення переліку вищенаведених препаратів на ринку, ще одним дієвим продуктом.

Сам же штам *Amuocolatopsis mediterranei* U32 має коротший час культивування (порівняно із аналогами на ринку) і досить не вибагливі

вимоги, концентрація рифаміцину у кінці культивування (завдяки додаванню нітратної групи) є пропорційно вигідною із економічної точки зору.

Для написання кваліфікаційної роботи було опрацьовано та проаналізовано вітчизняну та зарубіжну науково-технічну літературу. На основі проведеного дослідження було складено патентну заявку на розробку ЛЗ на основі штамів *Amicolatopsis mediterranei* U32.

Даний лікарський засіб призначений для профілактики лікування туберкульозу різної локалізації, а також лепрі (у комбінації з дапсоном), остеомієліті, бронхіті та пневмонії, отиті, холециститі, пієлонефриті, та для профілактики менінгококового менінгіту в осіб, що мали контакт з хворими.

Також, на базі опрацьованих наукових статей можна свідчити про те, що даний антибіотик можна (і використовується) у парі із іншими дієвими речовинами у боротьбі із туберкульозом насамперед. Тому, розвиток біотехнології у цьому напрямку є дуже цінним і важливим для подальшого розвинення метицини і фармації в нашій країні та усунення жахливих наслідків від важких хвороб або/та краще їх не розповсюдженню.

## Список використаної літератури

1. Роровуч, У.(2022). Нові антибіотики проти мультирезистентних бактерій. doi: <https://ingeniusua.org/articles/>
2. СТАТИСТИКА ВІЛ І ТБ В УКРАЇНІ: КВІТЕНЬ 2023 РОКУ. (2023)doi: <https://www.phc.org.ua/news/statistika-vil-i-tb-v-ukraini-kviten-2023-roku>
3. Висоцький І. Ю. Фармакологія [Текст] : навч. посіб. / І. Ю. Висоцький, Р. А. Храмова ; Сум. держ. ун-т. - Суми : Сумський державний університет, 2015. - 742 с. : табл.
4. Богущка, О.,Є.(2023). РЕЗУЛЬТАТИ ПОШУКУ АЛЬТЕРНАТИВНИХ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ З АНТИМІКРОБНОЮ ДІЄЮ. doi: <https://dspace.nuph.edu.ua/bitstream/123456789/31341/1/194-195.pdf>
5. А., О., Паламар, А., А., Ключко, Н., М., Паліброда, А., М., Грозав. (2023). АНАЛІЗ АСОРТИМЕНТУ ПРОТИТУБЕРКУЛЬОЗНИХ ПРЕПАРАТІВ ПРЕДСТАВЛЕНИХ НА ФАРМАЦЕВТИЧНОМУ РИНКУ УКРАЇНИ. [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://www.economy-confer.com.ua/full-article/4584/>
6. Державний реєстр лікарських засобів [Електронний ресурс]. – Режим доступу : <http://www.drlz.com.ua>
7. Державний формуляр лікарських засобів України 14 випуск [Електронний ресурс]. – Режим доступу: [https://moz.gov.ua/uploads/ckeditor/%D0%B4%D0%BE%D0%BA%D1%83%D0%BC%D0%B5%D0%BD%D1%82%D0%B8/dn\\_1011\\_13.06.2022\\_dod.pdf](https://moz.gov.ua/uploads/ckeditor/%D0%B4%D0%BE%D0%BA%D1%83%D0%BC%D0%B5%D0%BD%D1%82%D0%B8/dn_1011_13.06.2022_dod.pdf)
8. Фещенко Ю.І., Тодоріко Л.Д., Кужко М.М., Гуменюк М.І. (2018). Патоморфоз туберкульозу реалії сьогодення, хіміорезистентність як ознака прогресування. Укр. пульмонол. журн. doi: <http://www.ifp.kiev.ua/ftp1/books/Feschenko2019.pdf>
9. Рифаміцин.(2022). [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://go.drugbank.com/drugs/DB11753>

10. Koo, H.,L., DuPont, H.,L., (2010). Рифаксимін: унікальний гастроінтестинальний селективний антибіотик при кишкових захворюваннях. Сучасна думка в гастроентерології. doi : 10.1097/MOG.0b013e328333dc8d
11. Сонг К.Х., Юнг Х.К., Кім Х.Дж., Ку Х.С., Квон Ю.Х., Шін Х.Д. та ін. (2018). Клінічні практичні рекомендації щодо синдрому подразненого кишечника в Кореї, оновлене видання 2017 року. Журнал нейрогастроентерології та моторики..doi:10.5056/jnm17145.PMC 5885719
12. Н., Малік З., Шей Р. (2015). Профіль рифаксиміну та його потенціал у лікуванні синдрому подразненого кишечника».Клінічна та експериментальна гастроентерологія. doi: 10.2147/CEG.S67231
13. Taylor, D.,N. (2005). Антибіотики, що погано всмоктуються, для лікування діареї мандрівників. doi : 10.1086/432953
14. Pimentel, M. (2016). Оглядова стаття: потенційні механізми дії рифаксиміну в лікуванні синдрому подразненого кишечника з діареєю».Аліментарна фармакологія та терапія. doi: 10.1111/apt.13437
15. Lee, K.,J. (2015). Фармакологічні засоби для лікування хронічної діареї. Дослідження кишечника. doi : 10.5217/ir.2015.13.4.306
16. Sharma, S.,K., Sharma, A., Kadhiravan, T., et al. (2013). Рифаміцини (рифампіцин, рифабутин і рифапентин) у порівнянні з ізоніазидом для профілактики туберкульозу у ВІЛ-негативних людей із ризиком активного туберкульозу. doi : 10.1002/14651858
17. Sensi, P. (1983). Історія розвитку Рифампіну. Клінічні інфекційні хвороби. doi:10.1093/clinids/5.Supplement\_3
18. Позняк, А.,Л., Міллер, Р., Ормерод, Л.,П. (1999). Лікування туберкульозу у ВІЛ-інфікованих. СНІД. doi : 10.1097/00002030-199907300-00035
19. Рифалазил.Туберкульоз. (2008).doi:10.1016/S1472-9792(08)70023-4

20. Осборн, М., С., Мерфі, К., К., Ротштейн, Девід., М. (2006). Посилення активності рифалазилу в комбінації з левофлоксацином, лінезолідом або мупіроцином проти *Staphylococcus aureus* in vitro. Журнал антибіотиків. doi : 10.1038/ja.2006.43
21. Антон, П.,М., О'Браєн, М., Коккотоу, Е., Ейзенштейн, Б., Міхаеліс, А., Ротштейн, Д., Параскос, С., Келлі, С.,Р., Позолякіс, С. (2004). Рифалазил лікує та запобігає рецидивам діареї, пов'язаної з *Clostridium difficile*, у хом'яків . Антимікробні засоби та хіміотерапія. doi : 10.1128/AAC.48.10.3975-3979.2004
22. Рифампіцин.(2024). [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://tabletki.ua/%D0%A0%D0%B8%D1%84%D0%B0%D0%BC%D0%BF%D0%B8%D1%86%D0%B8%D0%BD/3711/#productCardInstructions>
23. Конспект лекцій з дисципліни «Технологія антибіотиків та лікарських препаратів» освітньо-професійної програми першого (бакалаврського) рівня вищої освіти зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» усіх форм навчання / Укладач: Головей О.П. – Кам'янське: ДДТУ, 2017. – 121 с.
24. Буценко Л.М. Технологія антибіотиків і ферментних препаратів. Конспект лекцій для студ. напряму 6.051401 “Біотехнологія” спец. “Біотехнологія біологічно активних речовин” ден. та заоч. форм навч. – К.:НУХТ, 2009. – 130 с.
25. Кравченко О. О., Савчук О. М., Остапченко Л. І. Загальна біотехнологія навчальний посібник - К.: ВПЦ "Київський університет", 2019. - 269 с.
26. Центрифуги фільтрувальні та осаджувальні з ножевим вивантаженням осаду типу ФГН і ОГН. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: [https://frunze.com.ua/wp-content/uploads/2023/06/Centrifuge\\_29-61.pdf](https://frunze.com.ua/wp-content/uploads/2023/06/Centrifuge_29-61.pdf)

27. Іванова, А.,Д., Олійник, С.,В., Вишневіська, Л.,І., Ковальов, В.,В.(2023). ЛІКАРСЬКІ ЗАСОБИ У ФОРМІ КАПСУЛ. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: [https://ztl.nuph.edu.ua/wp-content/uploads/2023/11/posterna-dopovid\\_ivanova-a.d.-svitlana-oliinyk.pdf](https://ztl.nuph.edu.ua/wp-content/uploads/2023/11/posterna-dopovid_ivanova-a.d.-svitlana-oliinyk.pdf)
28. Державна фармакопея України. – 2-е видання. Доповнення 3 – X.: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2018. – 416 с.
29. W., Zhao, Y., Zhong, H., Yuan<sup>1</sup>, J., Wang, H., Zheng, Y., Wang, X., Cen , F., Xu, J., Bai, X., Han, G., Lu, Y., Zhu, Z., Shao<sup>1</sup>, H., Yan, C., Li, N., Peng, Z., Zhang, Y., Zhang, W., Lin, Y., Fan, Z., Qin, Y., Hu, B., Zhu, S., Wang, X., Ding, G., Zhao. (2010). Complete genome sequence of the rifamycin SV-producing *Amycolatopsis mediterranei* U32 revealed its genetic characteristics in phylogeny and metabolism. doi: :10.1038/cr.2010.87
30. Ventura, M.; Canchaya, C.; Tauch, A.; Chandra, G.; Fitzgerald, G.F.; Chater, K.F.; van Sinderen, D. (2007). Genomics of Actinobacteria:Tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71, 495–548. doi: <https://doi.org/10.1128/mnbr.00005-07>
31. Song, Z.; Xu, T.; Wang, J.; Hou, Y.; Liu, C.; Liu, S.; Wu, S. (2021). Secondary Metabolites of the Genus *Amycolatopsis*: Structures, Bioactivities and Biosynthesis. *Molecules.* 26, 1884. doi:10.3390/molecules26071884
32. Chen, S.; Wu, Q.; Shen, Q.; Wang, H. (2016). Progress in understanding the genetic information and biosynthetic pathways behind *Amycolatopsis* antibiotics, with implications for the continued discovery of novel drugs. *ChemBioChem.* 17, 119–128. doi: 10.3390/molecules26071884
33. Kumari, R.; Singh, P.; Lal, R. (2016). Genetics and genomics of the genus *Amycolatopsis*. *Indian J. Microbiol.* 56, 233–246. doi:10.3390/molecules26071884

34. Lechevalier, M.P.; Prauser, H.; Labeda, D.P.; Ruan, J.S. (1986). Two new genera of nocardioform actinomycetes: *Amycolata* gen. nov. and *Amycolatopsis* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 36, 29–37. doi: 10.3390/molecules26071884
35. Sánchez-Hidalgo, M.; González, I.; Díaz-Muñoz, C.; Martínez, G.; Genilloud, O. (2018). Comparative genomics and biosynthetic potential analysis of two lichen-isolated *Amycolatopsis* strains. *Front. Microbiol.* 9, 369. doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00369>
36. Xiao, Y.S.; Zhang, B.; Zhang, M.; Guo, Z.K.; Deng, X.Z.; Shi, J.; Li, W.; Jiao, R.H.; Tan, R.X.; Ge, H.M. (2017). Rifamorpholines A–E, potential antibiotics from locust-associated actinobacteria *Amycolatopsis* sp. Hca4. *Org. Biomol. Chem.* 15, 3909–3916. doi: 10.1039/c7ob00614d
37. Beemelmans, C.; Ramadhar, T.R.; Kim, K.H.; Klassen, J.L.; Cao, S.; Wyche, T.P.; Hou, Y.; Poulsen, M.; Bugni, T.S.; Currie, C.R. (2017). Macrotermycins A–D, glycosylated macrolactams from a termite-associated *Amycolatopsis* sp. M39. *Org. Lett.* 19, 1000–1003. doi: 10.1021/acs.orglett.6b03831
38. Adamek, M.; Alanjary, M.; Sales-Ortells, H.; Goodfellow, M.; Bull, A.T.; Winkler, A.; Wibberg, D.; Kalinowski, J.; Ziemert, N. (2018). Comparative genomics reveals phylogenetic distribution patterns of secondary metabolites in *Amycolatopsis* species. *BMC Genomics* 19, 426. doi: 10.1186/s12864-018-4809-4
39. N., Mandali, P.,S.,P., Ponamgi, V. Girijashankar, L.,V., Rao. (2015). Solid State Fermentation and production of Rifamycin SV using *Amycolatopsis mediterranei*. doi:10.1111/lam.12332
40. El-Tayeb, O.,M., Salama, A.,A., Hussein, M.,M.M., El-Sedawy, H.F. (2004). Optimization of industrial production of rifamycin B by *Amycolatopsis mediterranei*. I. The role of colony morphology and nitrogen sources in productivity. doi: 10.5897/AJB2004.000-2049

41. Z., H., Shao, S., X., Ren, X., Q., Liu, J., Xu, H., Yan, G., P., Zhao, J., Wang. (2015). A preliminary study of the mechanism of nitrate-stimulated remarkable increase of rifamycin production in *Amycolatopsis mediterranei* U32 by RNA-seq. doi: 10.1186/s12934-015-0264-y
42. O., V., Kisil, T., A., Efimenko Olg, V., Efremenkova. (2021). Looking Back to *Amycolatopsis*: History of the Antibiotic Discovery and Future Prospects. doi: <https://doi.org/10.3390/antibiotics10101254>
43. Пирог Т.П., Ігнатова О.А. Загальна біотехнологія: Підручник. – К.: НУХТ, 2009. – 336 с.
44. Методичні вказівки до практичних робіт з дисципліни «Промислова та екологічна біотехнологія» для здобувачів очної форми навчання та після дипломної освіти зі спеціальності: 162 Біотехнології та біоінженерія першого (бакалаврського) рівня /Укладач: Корнієнко І. М. – Кам'янське: ДДТУ, 2017. – 75 с.
45. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів».— 1-е вид.— Доповнення 3. — Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2009. - 280 с. ISBN 978-966-96478-3-2
46. Оборудование микробиологических производств/Ка-луняни К. А. Голгер Л. И., Еслашов В. Е.— М.: Агро-промиздат, 1987.- 398 с.: ИЛ.- (Учебники и учебные пособия для студентов высших учебных заведений).
47. Романюк, Л.Б., Кравець, Н.Я., Климнюк, С.І., Копча, В.С., Дронова О.Й. (2019). Антибіотикорезистентність умовно-патогенних мікроорганізмів: актуальність, умови виникнення, шляхи подолання. doi: 10.11603/1681-2727.2019.4.10965.
48. Сергієнко Т.В., Дубініна Н.В. (2024). ДОСЛІДЖЕННЯ ЛАТЕНТНОЇ ФОРМИ ТУБЕРКУЛЬОЗУ –

- ВАЖЛИВИЙ ШЛЯХДОПОДОЛАННЯЗАХВОРЮАННЯ. doi:  
<https://dspace.nuph.edu.ua/bitstream/123456789/32604/1/155-157.pdf>
49. Богущька О.Є.(2023). РЕЗУЛЬТАТИ ПОШУКУ АЛЬТЕРНАТИВНИХ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ З АНТИМІКРОБНОЮ ДІЄЮ. doi:  
<https://dspace.nuph.edu.ua/bitstream/123456789/31341/1/194-195.pdf>
50. АНАЛІЗ АСОРТИМЕНТУ ПРОТИТУБЕРКУЛЬОЗНИХ ПРЕПАРАТІВ ПРЕДСТАВЛЕНИХ НА ФАРМАЦЕВТИЧНОМУ РИНКУ УКРАЇНИ. [Електронний ресурс] / Режим доступу:  
<https://www.economy-confer.com.ua/full-article/4584/>
51. Державний реєстр лікарських засобів [Електронний ресурс]. – Режим доступу : <http://www.drlz.com.ua>
52. Державний формуляр лікарських засобів України 14 випуск [Електронний ресурс]. – Режим доступу:  
[https://moz.gov.ua/uploads/ckeditor/%D0%B4%D0%BE%D0%BA%D1%83%D0%BC%D0%B5%D0%BD%D1%82%D0%B8/dn\\_1011\\_13.06.2022\\_dod.pdf](https://moz.gov.ua/uploads/ckeditor/%D0%B4%D0%BE%D0%BA%D1%83%D0%BC%D0%B5%D0%BD%D1%82%D0%B8/dn_1011_13.06.2022_dod.pdf)
53. Фещенко Ю.І., Тодоріко Л.Д., Кужко М.М., Гуменюк М.І. (2018). Патоморфоз туберкульозу реалії сьогодення, хіміорезистентність як ознака прогресування. Укр. пульмонол. журн. doi:  
<http://www.ifp.kiev.ua/ftp1/books/Feschenko2019.pdf>
54. Державна фармакопея України. Доповнення 1. — Х., 2004.
55. Державна фармакопея України. Доповнення 2. — Х., 2018.