

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

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

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

Віктор СТАБНІКОВ

“ 01 ” березня 2024 року

ЗАВДАННЯ

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

ПАШКО Анни Олександрівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Біосинтез капреоміцину *Streptomyces capreolus*

керівник роботи СУЛЕЙКО Тетяна Леонідівна, ас.

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від 29 березня 2024 року № 238-кс

2. Строк подання здобувачем роботи 28 травня 2024 р.

3. Вихідні дані до роботи Продукт: капреоміцин.

Біологічний агент: *Streptomyces capreolus*

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) Опис капреоміцину. Обґрунтування вибору *Streptomyces capreolus*. Техніко-економічне обґрунтування капреоміцину. Біосинтез капреоміцину. Обґрунтування вибору технологічної схеми капреоміцину. Специфікація обладнання для виробництва капреоміцину. Опис технологічної схеми біосинтезу капреоміцину. Контроль виробництва капреоміцину. Перспективи впровадження системи екологізації виробництва капреоміцину

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема - 1 аркуш формату А1. Апаратурна схема - 1 аркуш формату А1.

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 01.03.2024 р.

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Опис капреоміцину	01.03.24 – 06.03.2024	
2	Обґрунтування вибору <i>Streptomyces capreolus</i>	07.03.24 – 14.03.2024	
3	Техніко-економічне обґрунтування капреоміцину	15.03.24 – 22.03.2024	
4	Біосинтез капреоміцину	23.03.24 – 29.03.2024	
5	Обґрунтування вибору технологічної схеми капреоміцину	01.04.24 – 13.04.2024	
6	Специфікація обладнання для виробництва капреоміцину	14.04.24 – 19.04.2024	
7	Опис технологічної схеми біосинтезу капреоміцину	20.04.24 – 28.04.2024	
8	Контроль виробництва капреоміцину	29.04.24 – 12.05.2024	
9	Перспективи впровадження системи екологізації виробництва капреоміцину	13.04.24 – 17.05.2024	
10	Графічна частина (креслення)	18.05.24 – 24.05.2024	
11	Оформлення кваліфікаційної роботи	25.05.24 – 28.05.24	

Здобувач _____
(підпис)

Анна ПАШКО _____
(ім'я та прізвище)

Керівник роботи _____
(підпис)

Тетяна СУЛЕЙКО _____
(ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Метою даної кваліфікаційної роботи є розробка апаратурної та технологічної схеми біосинтезу вторинного метаболіту антибіотику капреоміцину з використанням штаму бактерій *Streptomyces capreolus* A250, який має найбільшу здатність утворювати антибіотик капреоміцин серед порівнюваних штамів.

Технологічна схема біосинтезу антибіотику виробництва даного антибіотику містить різні види допоміжних робіт (підготовка аераційного повітря, підготовка титрувальних агентів підготовка поживних середовищ, стерилізація поживних середовищ), основних технологічних процесів (посів, культивування, вирощування інокуляту та виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 3 м³). Під час написання даної роботи додаткового було досліджено структуру та властивості самого антибіотику.

Методом ідентифікації капреоміцину є спектрофотометричне визначення. Наведено показники якості капреоміцину: опис, значення рН, втрата в масі при висушуванні, сульфатна зола, вміст важких металів, кількісне визначення капреоміцину, кількісне визначення компонентів капреоміцину та споріднених речовин, токсичність антибіотику. Біологічну дію капреоміцину визначають як методом мінімальної інгібуючої концентрації, так і методом дифузії в агар.

Також у праці висвітлено особливості систем знешкодження рідких, тердих та газоподібних відходів.

Кваліфікаційна робота складається зі вступу, дев'яти розділів та списку літератури із 85 найменувань. Загальний обсяг роботи – 110 сторінок. У даній роботі міститься 8 рисунків та 13 таблиць. Графічна частина включає технологічну (1 аркуш формату А1) та апаратурну схеми (1 аркуш формату А1).

Ключові слова: капреоміцин, *Streptomyces capreolus* A250, туберкульоз, антибіотик, біосинтез, мікробіологічний контроль, стічні води, анаеробний біореактор.

ABSTRACT

The aim of this qualification work is to develop a hardware and technological scheme for the biosynthesis of the secondary metabolite of the antibiotic capreomycin using the bacterial strain *Streptomyces capreolus* A250, which has the highest ability to form the antibiotic capreomycin among the compared strains.

The technological scheme of antibiotic biosynthesis for the production of this antibiotic includes various types of auxiliary work (preparation of aeration air, preparation of titration agents, preparation of culture media, sterilization of culture media), main technological processes (sowing, cultivation, inoculum cultivation and production biosynthesis in a 3 m³ fermenter). In the course of writing this paper, the structure and properties of the antibiotic itself were additionally investigated.

The method of capreomycin identification is spectrophotometric determination. The quality indicators of capreomycin are presented: description, pH value, weight loss during drying, sulfate ash, heavy metal content, quantitative determination of capreomycin, quantitative determination of capreomycin components and related substances, and antibiotic toxicity. The biological effect of capreomycin is determined by both the method of minimum inhibitory concentration and the method of diffusion into agar.

The work also highlights the features of liquid, solid and gaseous waste disposal systems.

The qualification work consists of an introduction, nine chapters and a list of 85 references. The total volume of the work is 110 pages. This work contains 8 figures and 13 tables. The graphic part includes technological (1 sheet of A1 format) and hardware schemes (1 sheet of A1 format).

Key words: capreomycin, *Streptomyces capreolus* A250, tuberculosis, antibiotic, biosynthesis, microbiological control, wastewater, anaerobic bioreactor.

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	4
ВСТУП	9
РОЗДІЛ 1. ОПИС КАПРЕОМІЦИНУ	10
РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ <i>STREPTOMYCES CAPREOLUS</i>	13
2.1. Обґрунтування вибору продуцента капреоміцину та поживного середовища	13
2.2. Перевірочний розрахунок складу поживного середовища	17
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ КАПРЕОМІЦИНУ	20
3.1. Потреба в капреоміцині	20
3.2. Розрахунок річної потреби капреоміцину	23
3.3. Розрахунок потужності виробництва капреоміцину	24
3.4. Розрахунок кількості стадій отримання посівного матеріалу для вирощування культури у ферментері 3 м ³	25
3.4.1. Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в інокуляторі 300 л	26
3.4.2. Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в інокуляторі 30 л	26
3.4.3. Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в колбах на качалці	27
РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ КАПРЕОМІЦИНУ	28
4.1. Шляхи катаболізму глюкози у <i>Streptomyces capreolus</i>	28
4.2. Біотрансформація ростового субстрату в капреоміцин	30
РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ КАПРЕОМІЦИНУ	34
5.1. Вибір способу культивування та типу ферментера для отримання капреоміцину	34
5.2. Обґрунтування підготовки аераційного повітря для отримання капреоміцину	35
5.3. Обґрунтування вибору та опис стадій санітарної підготовки виробництва капреоміцину	36
5.3.1. Мийні та дезінфікуючі засоби для обробки поверхонь та приміщень	36

5.3.2. Мийні та дезінфікуючі засоби для обробки обладнання та комунікацій	39
5.4. Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища для біосинтезу капреоміцину	47
5.4.1. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках	47
5.4.2. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в посівних апаратах	49
5.4.3. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу	52
5.5. Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН	53
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА КАПРЕОМІЦИНУ	55
РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ КАПРЕОМІЦИНУ	59
РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА КАПРЕОМІЦИНУ	68
8.1. Мікробіологічний контроль	68
8.1.1. Мікробіологічний контроль стерильності поживних середовищ	68
8.1.2. Мікробіологічний контроль чистоти культури	68
8.2. Контроль концентрації джерел вуглецевого і азотного живлення	69
8.2.1. Визначення вмісту редуруючих цукрів	69
8.2.2. Визначення амінного азоту	71
8.3. Контроль показників росту і біосинтезу	72
8.3.1. Визначення концентрації біомаси	72
8.3.2. Визначення концентрації капреоміцину	73
8.3.3. Визначення активності антибіотика канпреоміцину	74
8.4. Карта постадійного контролю виробництва капреоміцину	75
8.5. Ідентифікація капреоміцину	81
8.6. Показники якості капреоміцину	81
8.7. Біологічна дія капреоміцину	85
РОЗДІЛ 9. ПЕРСПЕКТИВИ ВПРОВАДЖЕННЯ СИСТЕМИ ЕКОЛОГІЗАЦІЇ ВИРОБНИЦТВА КАПРЕОМІЦИНУ	87

9.1. Система знешкодження рідких відходів	87
9.1.1. Розрахунки об'ємів стічних вод	87
9.1.2. Середні витрати стічних вод від виробництва	88
9.1.3. Система очищення стічних вод	90
9.2. Система знешкодження газоподібних відходів	92
9.3. Система знешкодження твердих відходів	94
ЛІТЕРАТУРА	96
ДОДАТКИ	107

ВСТУП

На сучасному етапі Україна віднесена до групи країн з високим рівнем захворюваності на туберкульоз, і цей рівень суттєво вищий, ніж у переважній більшості країн Центральної та Східної Європи. Протягом останніх десятиріч проблема позалегеневого туберкульозу зберігає свою актуальність як у більшості країн світу, так і в країнах пострадянського простору. Однак практично повсюди органи охорони здоров'я приділяють недостатньо уваги даним захворюванням, що спричиняє суттєву шкоду здоров'ю і працездатності різних категорій населення [1].

Капреоміцин, важливий препарат для лікування мультирезистентного туберкульозу, є макроциклічним пептидним антибіотиком, що виробляється підвидом *Streptomyces capreolus*. Основу резистентності до цього препарату було досліджено шляхом виділення та характеристики капреоміцин-резистентних штамів *Mycobacterium smegmatis* та *Mycobacterium tuberculosis* [2].

З поширенням резистентності мікроорганізмів до багатьох існуючих антибіотиків стає все важче лікувати інфекційні захворювання. Вивчення капреоміцину також сприяє розробці нових стратегій використання антибіотиків для подолання резистентності бактерій. Мета виготовлення капреоміцину полягає в отриманні цього антибіотика в чистому форматі з високим виходом.

					НУХТ БТЕК 04.01.30 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Пашко А.О.			Вступ	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Сулейко Т.Л.					9	1
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

РОЗДІЛ 1. ОПИС КАПРЕОМІЦИНУ

Загальний опис антибіотику. Капреоміцин - це тип антибіотику, який використовується для лікування бактеріальних інфекцій, особливо тих, які спричинені *Mycobacterium tuberculosis*. Він належить до групи препаратів, які називаються аміноглікозидами, і діє шляхом пригнічення синтезу бактеріальних білків, що зрештою призводить до загибелі бактерій [3].

Капреоміцин зазвичай використовується в комбінації з іншими антибіотиками для лікування стійкого до ліків форми туберкульозу, яка не реагує на звичайні антибіотики, що використовуються для лікування захворювання. Зазвичай його вводять у вигляді ін'єкцій, внутрішньовенно або внутрішньом'язово. Як і всі антибіотики, капреоміцин може мати побічні ефекти. Поширені побічні ефекти включають втрату слуху, пошкодження нирок і нервів. Через ці потенційні побічні ефекти капреоміцин, як правило, зарезервований для використання у випадках, коли інші методи лікування не дали результатів або недоступні [3].

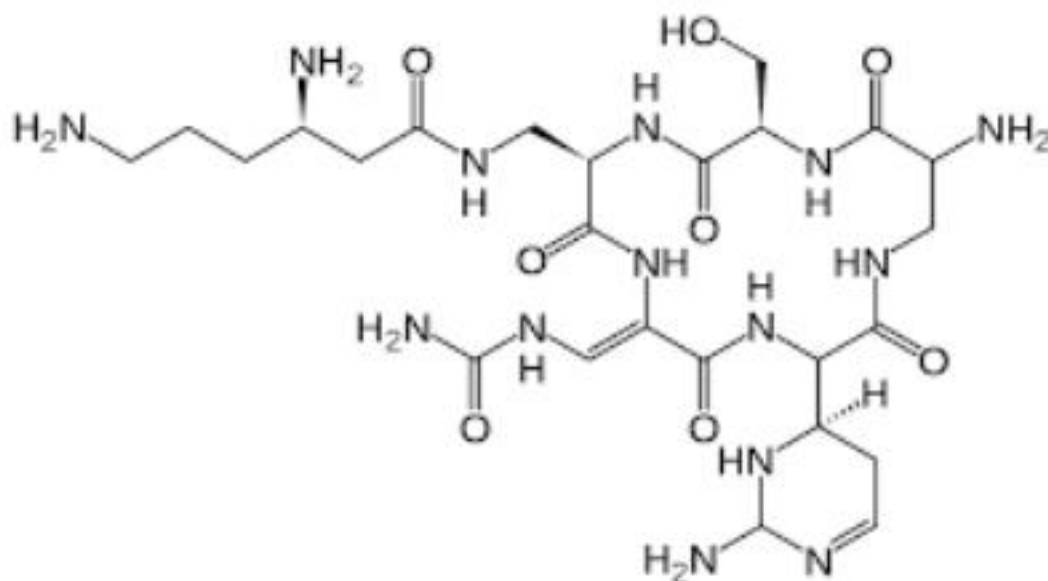


Рис. 1.1 Структурна будова капреоміцину [4].

					НУХТ БТЕК 04.01.30 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 1. Опис капреоміцину		
Розроб.		Пашико А.О.			Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Сулейко Т.Л.				10	5
Реценз.					Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Затверд.		Стабніков В.П.					

Хімічні властивості. Капреоміцин - це складна молекула, що складається з кількох аміноцукрів і циклічних пептидів, що надає йому антибіотичних властивостей. Його хімічна формула - $C_{50}H_{88}N_{28}O_{15}$, а молекулярна маса - 1321,4 г/моль. Капреоміцин є позитивно зарядженою молекулою і тому притягується до негативно заряджених клітинних стінок бактерій. Він має високу спорідненість з бактеріальною рибосомою, яка є місцем синтезу білка, і зв'язується з нею, щоб запобігти трансляції білків. Це в кінцевому підсумку призводить до загибелі бактерій [4].

Капреоміцин розчинний у воді і зазвичай вводиться у вигляді водного розчину шляхом ін'єкції. Він має діапазон рН 4-8 і стабільний у кислих умовах. Однак він не є стабільним при високих температурах і його слід зберігати при температурі нижче 25°C, щоб зберегти його ефективність [4].

Принцип дії. Капреоміцин діє шляхом пригнічення синтезу білка в бактеріях. Зокрема, він зв'язується з субодиницею рибосомальної РНК 16S бактеріальної рибосоми та перешкоджає ініціації синтезу білка. Це заважає бактеріальній клітині виробляти білки, необхідні для її виживання та росту, що зрештою призводить до загибелі бактерій. Капреоміцин особливо ефективний проти *Mycobacterium tuberculosis*, бактерії, яка викликає туберкульоз. Його часто використовують як частину комбінованої терапії для лікування стійкого до ліків туберкульозу, оскільки він здатний проникати крізь клітинні стінки бактерій і досягати свого цільового місця всередині бактеріальної рибосоми. Важливо відзначити, що капреоміцин є бактеріостатиком, що означає, що він пригнічує ріст і розмноження бактерій, а не вбиває їх повністю. Тому його зазвичай використовують у комбінації з іншими антибіотиками для досягнення синергічного ефекту та повного усунення бактеріальної інфекції [5].

Показання для застосування. Комбіноване лікування туберкульозу легень, у випадку неефективності або непереносимості препаратів I ряду [6].

Спосіб застосування та дози. Тільки парентерально: 1 г попередньо розчиняють у 2 мл 0,9% розчину натрію хлориду або стерильної води для

ін'єкцій (в/м вводять глибоко у м'яз). Дорослим - 1 г 1 раз на добу, щодня протягом 60-120 днів, потім 2-3 рази втиждень протягом 12-24 міс, у комбінації з іншими протитуберкульозними препаратами [6].

Максимальна добова доза - не більше 20 мг/кг.

Побічна дія. З боку сечостатевої системи: нефротоксичність - ушкодження нирок з некрозом каналців, дизурія (збільшення/зменшення частоти сечовипускання або кількості сечі), ниркова недостатність, підвищення рівня азоту сечовини в крові більше 20-30 мг/100 мл (46%), поява в сечі аномального осаду або формених елементів крові [6].

Нервова система й органи чуття: незвична утома або слабкість, сонливість; ототоксичність - зниження слуху, шум, дзенькіт, гудіння або відчуття "закладання" у вухах; порушення координації рухів, нестійкість ходи, запаморочення; нервово-м'язова блокада [6].

ШКТ: нудота, блювання, анорексія, спрага, гепатотоксичність з порушенням функціональних показників печінки (особливо на фоні захворювань печінки в анамнезі) [6].

Алергічні реакції: шкірні висипи, свербіж, почервоніння шкіри, набряки.

Серцево-судинна система і крова (кровотворення, гемостаз): лейкоцитоз, лейкопенія, еозинофілія, тромбоцитопенія [6].

Інші: ускладнення дихання (унаслідок зниження тонусу дихальних м'язів); підвищення температури тіла (відмічалось при комплексній терапії); інфільтрація, посилена кровоточивість у місці введення [6].

РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ *STREPTOMYCES* *CAPREOLUS*

2.1. Обґрунтування вибору продуцента капреоміцину та поживного середовища

На сьогоднішній час виробництво капреоміцину є однією з невідомих складових медицини, оскільки антибіотики можуть лікувати та запобігати інфекційним захворюванням, спричиненим бактеріями. Вони діють, вбиваючи або зупиняючи ріст бактерій, дозволяючи організму подолати інфекцію. Тому правильно підібране поживне середовище для культивування є запорукою продуктивного виробництва, що забезпечить великий вихід продукту.

Streptomyces capreolus - це промислово важливий актиноміцет, з якого здійснюється виробництво аміноглікозидного антибіотика капреоміцину.

Дані, що продемонстровані в таблиці 2.1. свідчать, що найбільшою концентрація продукту у *Streptomyces capreolus* NRRL2773 – 6 г/л, далі *Streptomyces capreolus* A250 – 3 г/л.

Порівнюючи з іншими штамми, *Streptomyces capreolus* NRRL2773 має високий вихід антибіотика, умови культивування дуже схожі. Натомість у *Streptomyces capreolus* A250 вихід антибіотика менший, хоча сам процес культивування коротший. Якщо ж порівнювати за економічністю то *Streptomyces capreolus* A250 є більш вигідним, адже ціна 1 л поживного середовища значно менше. Між цими двома штамми варто зазначити що *Streptomyces capreolus* A250 буде найкращим вибором, адже тривалість культивування для виготовлення 3 г/л капреоміцину менша при тому мікроорганізм росте на дешевшому середовищі, що є більш вигідним для виробничих установ.

					НУХТ БТЕК 04.01.30 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Пашко А.О.			Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Сулейко Т.Л.				13	8
Реценз.					Кафедра БТМ --		
Н. Контр.							
Затверд.		Стабніков В.П.					

Тому для дослідження було обрано *Streptomyces capreolus* A250, який є найкращим штамом для утворення антибіотика капреоміцину.

Таблиця 2.1

Порівняльні відомості щодо продуцентів капреоміцину

Продуцент	Склад поживного середовища, г/л	Концентрація капреоміцину, г/л	Умови культивування	Тривалість процесу (год)	Література
<i>Streptomyces capreolus</i> A250	Глюкоза - 28; Бакто-пептон - 15; N-Z Амін А - 4; Меляса - 10; Крохмаль (картопляний) - 10; CaCO ₃ - 2; MgSO ₄ ·7H ₂ O - 5.	3 г/л	30°C pH 6,5	144 год або 6 днів	Mu Wang for the degree of Master of Science in Chemistry “Studies on the Biosynthesis of Capreomycin” - 1993. 15, 45-46 p [7].
<i>Streptomyces capreolus</i> NRRL2773	Глюкоза - 30; N-Z Амін А - 4; CaCl ₂ - 0,3; MgSO ₄ ·7H ₂ O - 22,5; Геліта Сол П - 29,2; Бурякова меляса - 7; Натрій едетат - 0,5; Полігліколь P2000 - 0,2.	6 г/л	30 °C pH 7,5	168 год або 7 днів	Lea, M.L., Wigley, L. & Hobbs, G. (2006) Development of a quantifiable method for the determination of culture viability of <i>Streptomyces capreolus</i> . Genetics of Industrial Microorganisms, 10th International Symposium, Prague, Czech Republic. (49, 77, 85 p.) [8].

Таблиця 2.2

Вартість поживних середовищ, використовуваних для вирощування штамів *Streptomyces capreolus*

Продуцент	Компонент поживного середовища	Концентрація у ПС, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації (1, 2, 3)
<i>Streptomyces capreolus</i> A250	Глюкоза	28	80	2,24	[9]
	Бакто-пептон	15	1120	16,8	[10]
	N-Z Амін А	4	1188	4,752	[11]
	Меляса(тростинна)	10	135	1,35	[12]
	Крохмаль (картопляний)	10	48	0,48	[13]
	CaCO ₃	2	6	0,012	[14]
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	5	82	0,41	[15]
	Вартість 1 л середовища – 26,044 грн				
<i>Streptomyces capreolus</i> NRRL2773	Глюкоза	30	80	2,4	[9]
	N-Z Амін А	4	1188	4,752	[11]
	CaCl ₂	0,3	91	0,0273	[16]
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	22,5	82	1,845	[15]
	Геліта Сол П	29,2	1833,33	53,53	[17]
	Бурякова меляса	7	75	0,525	[18]
	Натрій едетат	0,5	222	0,111	[19]
	Полігліколь Р2000	0,2	1883,65	0,3767	[20]
	Вартість 1 л середовища – 63,567 грн				

Примітка. * – Ціни наведено станом на березень 2023 р.

Умовна вартість 1 г капреоміцину при вирощуванні штамів *Streptomyces capreolus*

Біологічний агент	Концентрація капреоміцину, г/л	Тривалість культивування, год	Кількість капреоміцину за годину, г/год	Вартість 1 л середовища, грн/л	Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г
<i>Streptomyces capreolus</i> A250	3 г/л	144 год	0,02 г/год	26,044 грн/л	8,68 грн/г
<i>Streptomyces capreolus</i> NRRL2773	6 г/л	168 год	0,035 г/год	63,567 грн/л	10,6 грн/г

2.2. Перевірочний розрахунок складу поживного середовища

Поживні середовища повинні містити всі елементи, з яких складається клітина, причому в такій формі, в якій мікроорганізми здатні їх засвоювати. Хімічний склад мікробної клітини: Карбон – 50; Оксиген – 20; Нітроген – 10...14; Гідроген – 8; Фосфор – 3; Сульфур, Калій, Натрій - 1; Кальцій, Магній, Хлор – 0,5; Ферум – 0,2; решта елементів – близько 0,3 [21].

Для процесів росту та розмноження мікроорганізми повинні отримувати всі речовини що потрібні для біосинтезу клітинних компонентів та отримання енергії. Ці речовини, що називаються поживними, повинні бути присутніми в культуральному (поживному) середовищі при цьому в кількості, що відповідає специфічним потребам мікроорганізму [21].

Склад даного нам середовища:

Глюкоза - 28 г/л;

Бакто-пептон - 15 г/л;

N-Z Амін А - 4 г/л;

Меяса - 10 г/л;

Крохмаль (картопляний) - 10 г/л;

CaCO₃ - 2 г/л;

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 5 г/л.

Дивлячись на середовище наведеного складу можна зробити висновки глюкоза є джерелом вуглецю, кисню та водню. Карбонат кальцію є джерелом кальцію, сульфат магнію - сірки та магнію. В поживному середовищі необхідне знаходження 10 головних елементів для вирощування мікроорганізмів. Тростинна меляса - джерело калію та феруму. Основним джерелом азоту є Бакто-пептон. У складі поживного середовища є всі головні елементи для росту та розвитку мікроорганізма.

Розрахунок вмісту в середовищі джерела вуглецевого живлення

Потреби для синтезу капреоміцину.

У нашому випадку джерелом вуглецю є глюкоза. Розрахунки починаються з того, що потрібно знати молекулярну масу нашого продукту. Формула капреоміцину - $\text{C}_{50}\text{H}_{88}\text{N}_{28}\text{O}_{15}$, його молекулярна маса дорівнюватиме 1321,4 г/моль за даними джерела [2]. Далі знайдемо вміст вуглецю, $12 \times 50 = 600$ г. Тобто у 1321,4 г/моль міститься 600 г/моль вуглецю. Тоді для 100 г нашого продукту вміст вуглецю буде $(600 \times 100) / 1321,4 = 45,4$ г. В середовищі, де ми продукуємо капреоміцин, його концентрація становить 3 г/л, розрахуємо вміст вуглецю для 3 г/л - $(600 \times 3) / 1321,4 = 1,36$ г.

Потреби для синтезу біомаси

Вміст вуглецю в біомасі бактерій становить 50% від маси сухої речовини. Потрібно спочатку розрахувати вміст елементного вуглецю в даній речовині. Глюкоза – $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, молекулярна маса 180 г/моль. В 180 г/моль глюкози міститься 72 г/моль вуглецю. В даному нам складі поживного середовища міститься 28 г/л глюкози. Ми можемо розрахувати вміст вуглецю в глюкозі - $(28 \times 72) / 180 = 11,2$ г. Враховуючи, що при вирощуванні мікроорганізмів на вуглеводах (наприклад, глюкозі) близько 40 % субстрату окиснюється до CO_2 для одержання енергії, вміст становитиме - $11,2 - 4,48 = 6,72$ г.

Далі для розрахунку візьмем мелясу. В ній містить 50% сахарози. Сахароза - $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$, молекулярна маса - 342,3 г/моль. В 342,3 г/моль

міститься 144 г/моль вуглецю. В даному нам складі поживного середовища міститься 10 г/л меляси. Розраховуємо вміст вуглецю - $(144 \times 10) / 342,3 = 4,21$ г, знову враховуючи процес окиснення, вміст - $4,21 - 1,684 = 2,526$ г.

Отже загальний вміст вуглецю становить $6,72 + 2,526 = 9,256$ г. Цього цілком достатньо для того, щоб синтезувати 3 г/л капреоміцину.

Розрахунок вмісту в середовищі джерела азоту

Згаходимо вміст азоту, $14 \times 28 = 392$ г. Тобто у 1321,4 г/моль міститься 392 г/моль азоту. Тоді для 100 г нашого продукту вміст вуглецю буде $(392 \times 100) / 1321,4 = 29,67$ г. В середовищі, де ми продукуємо капреоміцин, його концентрація становить 3 г/л, розраховуємо вміст азоту для 3 г/л - $(392 \times 3) / 1321,4 = 0,89$ г.

В бакто-пептоні міститься 14% азоту. В 15 г бакто-пептону міститься $(15 \times 14) / 100 = 2,1$ г азоту, а за умови окиснення 90 % в середовищі для отримання маси є 0,21 г.

Вміст азоту у N-Z Амін А становить 32%. В 4 г міститься $(4 \times 32) / 100 = 1,28$ г, а за умови окиснення 90 % в середовищі для отримання маси є 1,152 г.

Отже загальний вміст азоту становить $0,21 + 1,152 = 1,362$ г. Цього цілком достатньо для того, щоб синтезувати 3 г/л капреоміцину.

Всі джерела основних елементів наявні у середовищі. За розрахунками ми підтвердили, що це середовище можна використовувати для синтезу антибіотика.

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ КАПРЕОМІЦИНУ

3.1. Потреба в капреоміцині

У даній кваліфікаційній роботі наведено процес біотехнологічного одержання антибіотика капреоміцину, що продукується *Streptomyces capreolus* A250 у ферментері 3 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,6 з метою одержання препарату для лікування туберкульозу.

Проблематика лікування та профілактики туберкульозу

За роки незалежності України доводиться констатувати факти зростання такого небезпечного захворювання, як туберкульоз. Якщо у 1991 р. на 100 тис. осіб захворіло на туберкульоз дещо більше 32 осіб, то у 1998 р. ця цифра становила 55,3, а в 2005 р. — 84,1. Епідемічні показники щодо туберкульозу в Україні в 10—12 разів вищі за відповідні у розвинених країнах. У ряді областей України, зокрема Херсонській, Луганській, Миколаївській, Кіровоградській, Донецькій захворюваність на туберкульоз сягає 103—174 випадків на 100 тисяч населення, що втричі вище за епідемічний поріг, зокрема, зросла захворюваність на відкриті форми туберкульозу, які становлять особливу небезпеку для оточуючих [22].

В зв'язку з негативними соціально-економічними наслідками, що спричиняються туберкульозом, цю хворобу відносять до групи соціально небезпечних (ч. 2 ст. 1 Закону України «Про боротьбу із захворюванням на туберкульоз»). Проте, туберкульоз вражає також і осіб, які не відносяться до соціально дезадаптованих груп населення. Тобто, погіршення епідеміологічної ситуації в Україні — гігантська проблема, яка загрожує безпеці держави [22].

					НУХТ БТЕК 04.01.30 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Пашко А.О.			РОЗДІЛ 3. Техніко- економічне обґрунтування капреоміцину		
Перевір.		Сулейко Т.Л.					
Реценз.							
Н. Контр.							
Затверд.		Стабніков В.П.					
					Літ.	Арк.	Аркушів
						20	9
					Кафедра БТМ		

У 2014 р. Україна вперше ввійшла і досі перебуває серед п'яти країн світу з найвищим тягарем мультирезистентного туберкульозу (надалі – МРТБ). Результат успішного лікування МРТБ – один із найнижчих в Європейському регіоні та становить 46 % [23].

Туберкульоз – це інфекційне захворювання, викликане кислотостійкими мікобактеріями з групи *Mycobacterium tuberculosis complex* – *M. tuberculosis*, *M. bovis* і *M. africanum*. Патомеханізм інфекційного процесу: вдихання мікобактерій фагоцитоз макрофагами розмноження всередині макро фага розпад макрофага та інфікування наступних клітин утворення туберкульозної гранульоми (містить також епітеліоїдні клітини та гігантські клітини Лангерганса), яка оточує зруйновані клітини (вогнища казеозного некрозу). Паралельно розвивається імунологічна відповідь за участю Т-хелперів 1 (Th1) CD4+ лімфоцитів, які активують макрофаги (у тому числі опосередковано через гамма-інтерферон. Ушкодження можуть загоюватися самостійно, шляхом фіброзу. В осіб із порушенням клітинного імунітету спостерігають виділення розріджених казеозних мас, надзвичайно інтенсивне розмноження збудника і утворення порожнин. Допоки розвинеться специфічна імунологічна відповідь, макрофаги, наповнені фагоцитованими мікобактеріями, можуть через лімфатичну систему потрапляти у кров і викликати бактеріємію. У такий спосіб мікобактерії потрапляють до багатьох органів, але затримуються лише у місцях із сприятливими для їх росту умовами.

Мікобактерії тривалий час можуть залишатись в організмі людини (латентна туберкульозна інфекція) і, навіть, через багато років спричинити ТБ легень або позалегеневий ТБ. Один хворий на туберкульоз може інфікувати в середньому 10–15 здорових осіб, а якщо він перебуватиме в школі, театрі чи в громадському транспорті, то більше. Це призводить до значного поширення туберкульозу.

Ось чому Всесвітня організація охорони здоров'я в 1993 р. проголосила туберкульоз глобальною небезпекою. Останнім часом щороку 24 березня всі країни світу відзначають Всесвітній день боротьби з туберкульозом [23].

Загальні принципи лікування:

1) схеми лікування повинні включати в інтенсивній фазі ≥ 3 -х лікарських засобів (ЛЗ), а в фазі продовження ≥ 2 -х ЛЗ, до яких є ймовірно чутливими виявлені у хворого МБТ;

2) до схеми лікування, яка виявилася неефективною, ніколи не потрібно додавати по одному новому препарату;

3) лікування повинно проходити під наглядом, особливо у випадку значної ймовірності недотримання хворим рекомендацій та у випадках, значущих для громадського здоров'я (резистентність до ЛЗ, рецидив захворювання);

4) на початку лікування про кожен випадок туберкульозу має бути повідомлено до санітарно-епідеміологічної станції (захворюваність на ТБ реєструють);

5) перед початком лікування визначають активність печінкових ферментів, рівень білірубіну, сечовини, креатиніну і сечової кислоти у сироватці крові, рівень тромбоцитів у крові, у разі призначення етамбутолу (Е) хворого скеровують на консультацію до окуліста, необхідно продумати обстеження на ВІЛ-інфекцію або інші причини імуносупресії, оцінити ймовірність резистентності до ЛЗ та готовність пацієнта до співпраці;

6) проведення моніторингу небажаних ефектів та взаємодії ЛЗ [23].

Найдієвішим методом специфічної профілактики туберкульозу є вакцинація й ревакцинація вакциною БЦЖ, або специфічна імунопрофілактика, або вакцинопрофілактика. В Україні для активної специфічної профілактики туберкульозу застосовують вакцину туберкульозну (БЦЖ) суху для внутрішньошкірного введення [24].

Протитуберкульозні препарати першого ряду не допомагають при інфекціях, викликаних штамами МРТБ; таким чином, для клінічного

використання вкрай необхідні нові протитуберкульозні препарати. Капреоміцин— це циклічний пептидний антибіотик, який особливо активний проти мікобактерій і вважається ідеальним протитуберкульозним препаратом другого ряду для лікування мультирезистентних та персистуючих інфекцій [25].

Отже, особливості лікування туберкульозу та наявність резистентності збудника даного захворювання до різних терапевтичних підходів обумовлює актуальність відкриття нових шляхів отримання ефективних протитуберкульозних препаратів.

3.2. Розрахунок річної потреби капреоміцину

За даними Центру громадського здоров'я сьогодні в Україні близько 18 500 людей хворіють на туберкульоз. За 2022 рік кількість захворюваності на туберкульоз зросла на 2,5%. Зазначають, що війна також впливає на поширення хвороби [26].

В даний час існує 10 препаратів, затверджених Управлінням з контролю за продуктами та ліками США (FDA) для лікування туберкульозу. Із затверджених препаратів першими лініями протитуберкульозних препаратів, які становлять ядро схем лікування, є:

- ізоніазид (INH)
- рифампін (RIF)
- етамбутол (EMB)
- піразинамід (PZA) [27].

Зважаючи на присутність інших препаратів як основних для лікування туберкульозу, приймемо, що наше виробництво буде забезпечувати 5% від загальної кількості хворих на туберкульоз:

$$(18\ 500 \times 5) / 100 = 925 \text{ пацієнтів.}$$

Згідно схеми лікування, капреоміцин застосовують дорослим — 1 г 1 раз на добу, щодня протягом 60-120 днів, потім 2-3 рази на тиждень протягом 12-24 міс [28].

Приймаємо схему лікування 1 г на добу протягом 60 днів та 2 рази на тиждень протягом 12 місяців. Тоді сумарна кількість капреоміцину для протитуберкульозного лікування одного пацієнта становитиме:

$$60 + 2 \times 48 = 156 \text{ г капреоміцину}$$

Розрахуємо, яка кількість капреоміцину необхідна для лікування 925 пацієнтів:

$$156 \times 925 = 144\,300 \text{ г} = 144,3 \text{ кг капреоміцину}$$

За результатом розрахунку, для забезпечення потреби у капреоміцині на курс тривалістю 60 днів та 12 місяців для лікування туберкульозу у 925 пацієнтів необхідно 144,3 кг цільового антибіотика.

3.3. Розрахунок потужності виробництва капреоміцину

За 144 год (6 днів) продуцент *Streptomyces capreolus* A250 утворює капреоміцин в концентрації 3 г/л на дешевому поживному середовищі [7].

Тому слід визначити кількість культуральної рідини, з якої отримаємо 144,3 кг капреоміцину.

$$144,3 / 0,003 = 48\,100 \text{ л}$$

Прийmemo загальну кількість втрат цільового антибіотика при його напрацюванні 10 %, тоді об'єм культуральної рідини:

$$V_{\text{кр}} = 48\,100 \text{ л} / (1 - 0,1) = 53\,444 \text{ л}$$

Приймаємо кількість робочих трудоднів ($T_{\text{рд}}$) 200. Тоді кількість продукту на добу ($V_{\text{д}}$) становитиме:

$$V_{\text{д}} = V_{\text{кр}} / T_{\text{рд}} = 53\,444 / 200 = 267,2 \text{ л}$$

Далі визначаємо кількість виробничих циклів на рік:

$$N_{\text{ц}} = V_{\text{кр}} / ((V_{\text{д}} \times T_{\text{цф}}) / 24) = 53\,444 / ((267,2 \times 150) / 24) = 32 \text{ цикли,}$$

де $T_{\text{цф}}$ – цикл роботи ферментера (мийка та огляд – 1,5 год, перевірка на герметичність – 0,5 год, підігрів та стерилізація апарату – 1,5 год, охолодження ферментера – 0,5 год, завантаження поживного середовища – 1,5 год, засів культурою – 0,5 год та ферментація – 144 год).

Далі розрахуємо кількість культуральної рідини за один цикл, ($V_{\text{крц}}$):

$$V_{\text{крц}} = K1 \times V_{\text{д}} \times T_{\text{цф}} / 24 = 1,1 \times 267,2 \times 150 / 24 \approx 1800 \text{ л,}$$

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

Геометричний об'єм ферментера для отримання 1800 л культуральної рідини з коефіцієнтом заповнення 0,6 має становити:

$$V_{\Gamma} = V_{\text{крц}}/K_{\text{зап}} = 1800/0,6 = 3\,000 \text{ л} = 3 \text{ м}^3,$$

де $K_{\text{зап}}$ – коефіцієнт заповнення ферментера.

3.4. Розрахунок кількості стадій отримання посівного матеріалу для вирощування культури у ферментері 3 м³

За виробничий цикл отримують $V_{\text{кр}} = 1,8 \text{ м}^3$ культуральної рідини.

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом (з урахуванням втрат в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря (10%)) становитиме:

$$V_{\text{роб.1}} = \frac{V_{\text{кр}}}{1 - E_{\phi}} = \frac{1,8}{1 - 0,1} \approx 2 \text{ м}^3$$

де E_{ϕ} – втрати культуральної рідини під час біосинтезу.

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері з робочим об'ємом $V_{\text{роб.1}} = 3,3 \text{ м}^3$.

При вибраному коефіцієнті заповнення $K_{\text{зап}} = 0,6$ можливий геометричний об'єм ферментера $V_{\phi.1} = 2/0,6 = 3,3 \text{ м}^3$. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{сф}} = 3 \text{ м}^3$ та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап.1}} = \frac{V_{\text{роб.1}}}{V_{\text{сф}}} = \frac{2}{3} = 0,66$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах.

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить 10% від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища у ферментері становитиме:

$$V_{\text{пс1}} = \frac{V_{\text{роб.1}}}{1 + X_{\phi}} = \frac{2}{1 + 0,1} = 1,82 \text{ м}^3$$

де X_{ϕ} – доза посівного матеріалу для ферментера.

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить:

$$V_{пм1} = V_{роб.1} - V_{пс1} = 2 - 1,82 = 0,18 \text{ м}^3 = 180 \text{ л}$$

3.4.1. Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в інокуляторі 300 л

Для одержання 180 л культуральної рідини кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі (з урахуванням втрат в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря) становитиме:

$$V_{роб.2} = \frac{V_{пм1}}{1 - E_{ін}} = \frac{180}{1 - 0,1} = 200 \text{ л}$$

Можливий геометричний об'єм інокулятора $V_{ін.} = 200/0,6 = 333 \text{ л}$. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний інокулятор $V_{сін} = 300 \text{ л}$ та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{зап.2} = \frac{V_{роб.2}}{V_{сін}} = \frac{200}{300} = 0,66$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах.

Кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{пс2} = \frac{V_{роб.2}}{1 + X_{ін}} = \frac{200}{1 + 0,1} = 182 \text{ л}$$

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{пм2} = V_{роб.2} - V_{пс2} = 200 - 182 = 18 \text{ л}$$

3.4.2. Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в інокуляторі 30 л

Для одержання 18 л посівного матеріалу кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі (з урахуванням втрат в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря) становитиме:

$$V_{роб.3} = \frac{V_{пм2}}{1 - E_{ін}} = \frac{18}{1 - 0,1} = 20 \text{ л}$$

Можливий геометричний об'єм інокулятора $V_{ін.} = 20/0,6 = 33$ л. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний інокулятор $V_{сін} = 30$ л та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{зап.3} = \frac{V_{роб.3}}{V_{сін}} = \frac{20}{30} = 0,66$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах.

Кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{пс3} = \frac{V_{роб.3}}{1 + X_{ін}} = \frac{20}{1 + 0,1} = 18,2 \text{ л}$$

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{пм3} = V_{роб.3} - V_{пс3} = 20 - 18,2 = 1,8 \text{ л}$$

3.4.3. Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в колбах на качалці

1,8 л = 1800 мл інокуляту, таку кількість отримують у колбах на качалці об'ємом в 750 мл та коефіцієнтом заповнення 0,2.

Кількість колб при цьому становитиме:

$$n_{колб} = 1800 / (750 \times 0,2) = 12 \text{ колб}$$

Таким чином, процес культивування посівного матеріалу з метою забезпечення біосинтезу капреоміцину, що продукується *S. capreolus* A250 у ферментері розміром 3 м³ та коефіцієнтом заповнення 0,6, буде проходити упродовж 3 стадій.

РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ КАПРЕОМІЦИНУ

4.1. Шляхи катаболізму глюкози у *Streptomyces capreolus*

Streptomyces capreolus як єдине джерело вуглецю може використовувати глюкозу, арабінозу, ксилозу, фруктозу. Не спостерігається зростання з рафінозою, сахарозою, лактозою, рамнозою [29].

За даними досліджень дисертації Ліверпульського університету Джона Мура, джерелом вуглецю та енергії при вирощуванні *Streptomyces capreolus* є глюкоза [8].

Так як у Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes відсутня інформація про шляхи катаболізму ростового субстрату у *Streptomyces capreolus* та його аналогів, тому для побудови шляху метаболізму глюкози обираємо будь-якого представника стрептоміцетів - *Streptomyces coelicolor*.

Базуючись на інформації, яка представлена у Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes для *Streptomyces coelicolor*, катаболічним шляхом глюкози є гліколіз (шлях Ембдена-Меєргофа-Парнаса). Наводимо схему перетворення глюкози (рис 1).

На першому етапі за участю глікозоспецифічного ферменту - фосфоглюкомутаза (КФ.5.4.2.2), відбувається перетворення глікози на глюкозо-6-фосфат, яка потім за дії глюкозо-6-фосфат-ізомерази (КФ.5.3.1.9) стає фруктозо-6-дифосфат. Після чого ферментативна дія 6-фосфоглюкокінази (КФ.2.7.1.11) зумовлює перетворення фруктозо-6-дифосфат на фруктозо-1,6-дифосфат. Далі дифосфоглюкоальдолаза (КФ.4.1.2.13) активує перетворення цього ж фруктозо-1,6-дифосфату на гліцеральдегід-3-фосфат, який в подальшому під дією гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази (КФ.1.2.1.12) перетворюється на 1,3-дифосфогліцерат. В подальшому катаболізмі глюкози бере участь фермент фосфогліцераткіназа (КФ.2.7.2.3).

					НУХТ БТЕК 04.01.30 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Пашко А.О.			РОЗДІЛ 4.Біосинтез канаміцину	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Сулейко Т.Л.					28	7
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Він перетворює 1,3- дифосфогліцерат в 3-фосфогліцерат, що у свою чергу переходить у 2-фосфогліцерат під дією фосфогліцератмутаза (КФ.5.4.2.11). Дія ферменту фосфопіруватгідратази (КФ.4.2.1.11) індукує перехід 2-фосфогліцерату у фосфоенолпіруват. На кінцевому етапі катаболізму глюкози відбувається перетворення фосфоенолпірувату під дією фермента 9 - піруваткінази (КФ.2.7.1.40) у піруват.

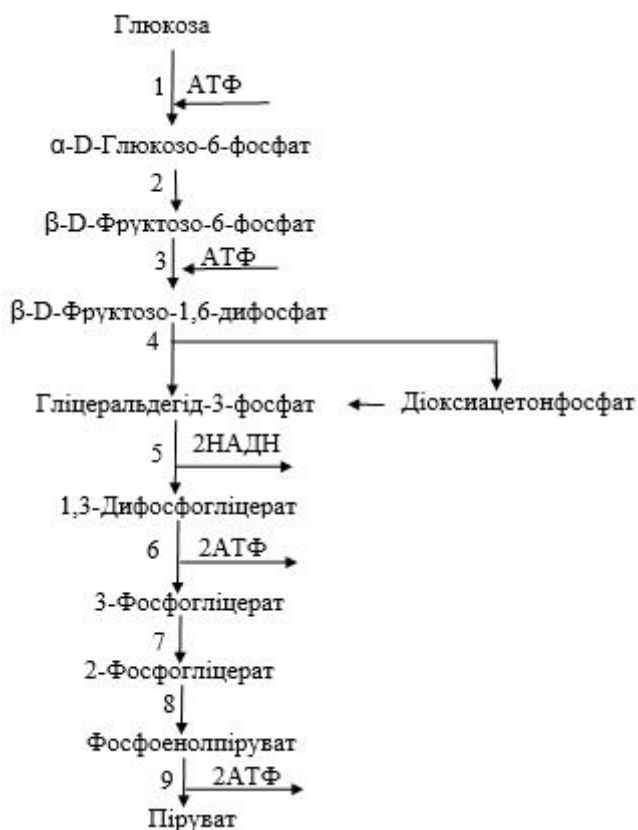


Рис.4.1. Фруктозо-1,4-дифосфатний шлях, який функціонує в *Streptomyces coelicolor* [30].

Ферменти, які беруть участь [30]: 1 - фосфоглюкомутаза (КФ.5.4.2.2); 2 - глюкозо-6-фосфат-ізомераза (КФ.5.3.1.9); 3 - 6-фосфофруктокіназа (КФ.2.7.1.11); 4 - дифосфофруктозо-альдолаза (КФ.4.1.2.13); 5 - гліцераальдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ.1.2.1.12); 6 - фосфогліцераткіназа (КФ.2.7.2.3); 7 - фосфогліцератмутаза (КФ.5.4.2.11); 8 - фосфопіруватгідратаза (КФ.4.2.1.11); 9 - піруваткіназа (КФ.2.7.1.40).

4.2. Біотрансформація ростового субстрату в капреоміцин

У даному випадку не вдалось знайти інформацію про біотрансформацію субстрату у *Streptomyces caprelous* у цільовий продукт - капреоміцин. Капреоміцин -це антибіотик, який належить до групи аміноглікозидів. Він містить в своєму складі амінокислоти. Тому наведемо опис та схему біосинтезу амінокислот. Так як цього мікроорганізму немає в KEGG всі ферменти схеми біосинтезу взяті у іншого представника стрептоміцетів - *Streptomyces coelicolor*.

Під час *Streptomyces caprelous* росту з використанням дріжджового екстракту як джерела вуглецю, внаслідок катаболізму глюкози, утворюється ацетил-КоА. В свою чергу ацетил-КоА вступає в подальші перетворення циклу трикарбонових кислот (ЦТК).

Всі необхідні для синтезу білків 20 амінокислот утворюються з певних метаболічних попередників. Попередником амінокислот глутаматної родини (глутамат, глутамін, пролін, аргінін) є 2-оксоглутарату (інтермедіату ЦТК).

Попередником амінокислот родини пірувату (валін, лейцин, аланін) відповідно є піруват.

Анаплеротичними реакціями, які забезпечують поповнення втрат інтермедіатів ЦТК – попередників біосинтезу амінокислот є карбоксилювання фосфоенолпірувату з утворенням оксалоацетату (фермент фосфоенолпіруваткарбоксилаза), карбоксилювання пірувату з утворенням оксалоацетату (фермент піруваткарбоксилаза), карбоксилювання пірувату з утворенням малату (фермент малатдегідрогеназа декарбоксилювальна).

Для утворення попередників ароматичних амінокислот глюкозо-6-фосфат залучається у пентозофосфатний цикл. У результаті утворюються еритрозо-4-фосфат та фосфорибозилпірофосфат. Еритрозо-4-фосфат разом з фосфоенолпіруватом є попередниками таких амінокислот, як фенілаланін, тирозин, триптофан, а фосфорибозилпірофосфат - гістидин.

Амінокислоти аспартатної родини (аспартат, аспарагін, метіонін, треонін, ізолейцин) утворюються з оксалоацетату, а серину, гліцину і цистеїну - з 3-фосфогліцерат.

Опишемо утворення амінокислоти глутаматної родини. З 2-оксоглутарату утворюється глутамат за допомогою ферменту аспартатамінотрансфераза (КФ.2.6.1.1), який далі під діє фермента АТФ-L-глутамат-5-фосфотрансфераза (КФ.2.7.2.11) перетворюється на L-глутамат-5-фосфат. В подальшому L-глутамат-5-фосфат за участю глутамат-5-семіальдегіддегідрогеназа (КФ.1.2.1.41) стає L-глутамат 5-семіальдегідом. L-глутамат 5-семіальдегід на наступних етапах під дією 1-піролін-5-карбоксилатдегідрогенази (КФ.1.2.1.88) перетворюється у L-1-Піролін-5-карбоксилат. Після чого синтезується амінокислота пролін дією фермента L-проліндегідрогеназа (КФ.1.5.5.2) на речовину, що утворилась на попередньому етапі.

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

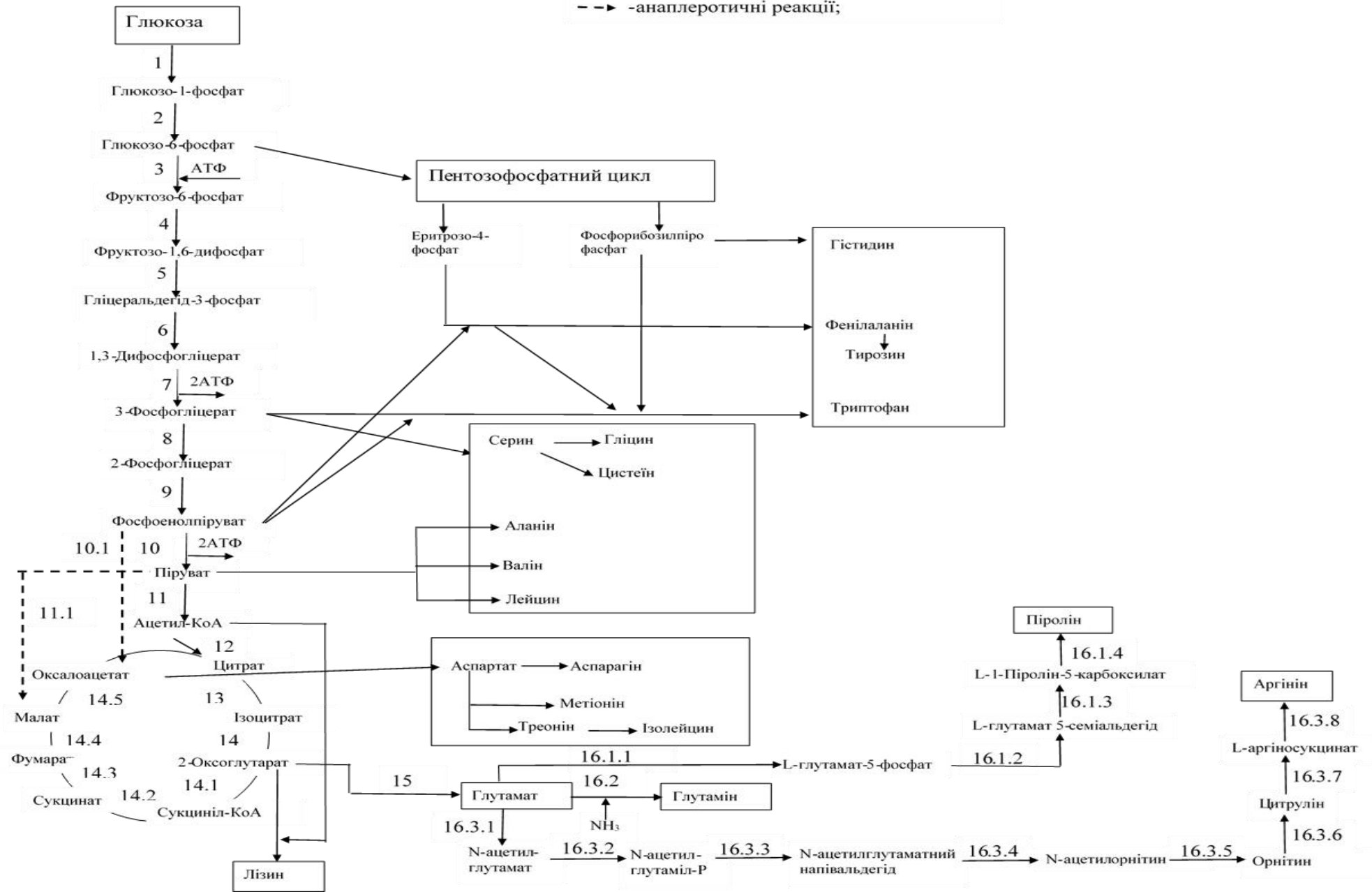


Рис. 4.2. Схема біотрансформації глюкози з утворенням амінокислот.

Ферменти, які беруть участь: 1 - гексокіназа (КФ.2.7.1.1); 2 - фосфоглюкомутаза (КФ.5.4.2.2); 3 - глюкозо-6-фосфат-ізомераза (КФ.5.3.1.9); 4 - 6-фосфофруктокіназа (КФ.2.7.1.11); 5 - дифосфофруктозо-альдолаза (КФ.4.1.2.13); 6 - гліцераальдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ.1.2.1.12); 7 - фосфогліцераткіназа (КФ.2.7.2.3); 8 - фосфогліцератмутаза (КФ.5.4.2.11); 9 - фосфопіруватгідратаза (КФ.4.2.1.11); 10 - піруваткіназа (КФ.2.7.1.40); 10.1 - фосфоенолпіруваткарбоксілаза (КФ.4.1.1.31); 11 - піруват дегідрогеназа (КФ.1.2.4.1); 11.1 - малатдегідрогеназа (КФ.1.1.1.38); 12- цитрат синтаза (КФ.2.3.3.1); 13 - аконітатгідратаза (КФ.4.2.1.3); 14 - ізоцитратдегідрогеназа (КФ.1.1.1.42); 14.1 - 2-оксоглутаратдегідрогеназа (КФ.2.3.1.61); 14.2 - сукциніл-КоА синтетаза (КФ.6.2.1.5); 14.3 - сукцинатдегідрогеназа залізо-сірчана субодиниця (КФ.1.3.5.1); 14.4 - фумаратгідратаза, клас II (КФ.4.2.1.2); 14.5 - малатдегідрогеназа (КФ.1.1.1.37)

15 - аспартатамінотрансфераза (КФ.2.6.1.1); 16.1.1 - АТФ-L-глутамат-5-фосфотрансфераза (КФ.2.7.2.11); 16.1.2 - глутамат-5-семіальдегіддегідрогеназа (КФ.1.2.1.41); 16.1.3 - 1-піролін-5-карбоксілатдегідрогеназа (КФ.1.2.1.88); 16.1.4 - L-проліндегідрогеназа (КФ.1.5.5.2); 16.2. - глутамінсинтетаза (КФ.6.3.1.2); 16.3.1- N-ацетилглутаматсинтетаза (КФ.2.3.1.1); 16.3.2 - ацетилглутаматкіназа (КФ.2.7.2.8); 16.3.3 - N-ацетил-гамма-глутаміл-фосфат-редуктаза (КФ.1.2.1.38); 16.3.4 - ацетилорнітин-амінотрансфераза (КФ.2.6.1.11); 16.3.5 - біфункціональна орнітинацетилтрансфераза (КФ.2.3.1.35); 16.3.6 - орнітинкарбамоїлтрансфераза (КФ.2.1.3.3); 16.3.7 - аргініносукцинатсинтаза (КФ.6.3.4.5); 16.3.8 - аргініносукцинатна ліаза (КФ.4.3.2.1).

РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ КАПРЕОМІЦИНУ

5.1. Вибір способу культивування та типу ферментера для отримання капреоміцину

Досліджуваний мікроорганізм є мікроаерофілом, тому найбільш продуктивним та економічно вигідним способом культивування буде періодичне глибинне культивування. Глибинне культивування забезпечує оптимальні умови для росту *Streptomyces capreolus*, оскільки дозволяє контролювати рівень доступу кисню.

Під час періодичного процесу можна досягти більш повного споживання субстрату мікроорганізмами, внаслідок того, що субстрат вноситься лише один раз і споживається продуцентом протягом усього часу культивування [31].

Цей спосіб було обрано через переваги такі, як оптимізація умов культивування, розуміння фізіології та метаболізму, процес можна автоматизувати. До того ж безперервний спосіб культивування забезпечує постійне знаходження в експоненційній фазі, що не доречно для синтезу антибіотика, адже він утворюється переважно під час стаціонарної фази [31].

Мікроорганізм утворює міцелій ниткоподібної форми, щоб запобігти пошкодженню міцелію під час перемішування середовища, зменшують швидкість або використовують турбідні мішалки. Це особливо важливо, оскільки міцелій відіграє важливу роль у рості та розвитку *Streptomyces capreolus*, а також у біосинтезі біологічно активних сполук.

					НУХТ БТЕК 04.01.30 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми капреоміцину		
Розроб.		Пашико А.О.			Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Сулейко Т.Л.				34	26
Реценз.					Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Затверд.		Стабніков В.П.					

5.2. Обґрунтування підготовки аераційного повітря для отримання капреоміцину

Досліджуваний мікроорганізм є мікроаерофілом, тому слід передбачити підготовку повітря для росту *Streptomyces capreolus*.

Спочатку здійснюють забір атмосферного повітря за допомогою повітрозбірника [32]. Забір проводять на висоті 2-3 м від найвищої точки будівлі для уникнення потрапляння значної кількості мікроорганізмів та пилу – орієнтовно на висоті 10-12 м.

Далі для звільнення повітря від пилу, вологи та інших грубих часток повітря подають на фільтр грубого очищення. На даній стадії повітря очищується на 80%.

Після цього повітря подають на турбокомпресор, де проводять його стиснення до 0,35–0,5 МПа з метою подолання опору фільтрувальних матеріалів на наступних стадіях фільтрування, а також подолання гідравлічного опору під час диспергування у культуральній рідині. Оскільки під час стиснення повітря значно нагрівається, далі необхідно його охолодити. Охолодження повітря з одночасним видаленням вологи проводять у теплообміннику-охолоджувачі.

Далі повітря поступає в ресивер, де відбувається вирівнювання тиску повітря та одночасне вилучення залишкових кількостей вологи. Потім повітря подають на головні фільтри очистки, ступінь очищення на даному етапі досягає 98%. Такі фільтри знаходяться у цеху виробничого біосинтезу [32].

Для подачі стерильного повітря безпосередньо до апаратів його пропускають через індивідуальні фільтри після головного фільтра.

Найбільше поширення у мікробіологічній промисловості одержала стерилізація повітря методом фільтрування через волокнисті або зернисті фільтруючі матеріали. На ефект стерилізації повітря методом фільтрування впливає ступінь засміченості повітря, оскільки самі мікроорганізми мають розміри від 0,01 до 25 мкм, але вони осідають на частки пилу, і ступінь

уловлювання залежить від розмірів цих часток. Для тонкого очищення повітря використовуються індивідуальні фільтри, які повинні забезпечувати очищення повітря на 99,999 %. Фільтруючі матеріали, використовувані на стадії тонкого очищення, поділяються на кілька груп: тонковолокнисті матеріали у вигляді матів, картону й паперу, зернисті тверді фільтруючі перегородки (керамічні, металокерамічні, з полімерних матеріалів) і мембранні фільтри. У промислових фільтрах тонкого очищення повітря найбільш часто використовуються тонковолокнисті фільтруючі матеріали [33].

5.3. Обґрунтування вибору та опис стадій санітарної підготовки виробництва капреоміцину

5.3.1. Мийні та дезінфікуючі засоби для обробки поверхонь та приміщень

1. «КлінДез 401» («Clean& Dez 401»)

Це засіб мийний з дезінфікувальним ефектом. Випускається у формі рідкого концентрату жовтуватого кольору з характерним запахом хлору. Вихідний вміст активного хлору в концентрації засобу 6,0% — 9,0% [34].

Під час зберігання засобу можливе випадання осаду, не впливає на якість дезінфікувальних властивостей засобу. Робочі розчини засобу мають антикорозійні, стабілізуювальні, змочувальні, емульгуювальні та мийні властивості.

Не ушкоджує об'єкти, виготовлені з корозійностійких металів (зокрема з неіржавкої, хромонікового, низьковуглецевої сталі, заліза, алюмінію), склоемалі, матеріалів, покритих нікелем і латунню, скла, силікону, пластмас, гуми на основі силіконового та натурального каучуку, полімерних матеріалів, пофарбованих і нефарбованих дерева, кахлю, керамічної плитки, лінолеуму, бетону, фарфору, фаянсу [34].

Призначення. Для дезінфекції поверхонь, предметів обстановки, медичних приладів і апаратів, промислового обладнання, великогабаритного та санітарно-технічного устаткування, посуду, предметів для миття посуду,

білизни, прибирального інвентарю, предметів догляду за хворими та ін., згідно з інструкцією з застосування; дезінфекції, предстерилізаційного очищення виробів медичного призначення, для дезінфекції, у тому числі суміщеної з предстерилізаційним очищенням та стерилізації виробів медичного призначення; медичного інструментарію; проведення поточної, заключної, профілактичної дезінфекції, генеральних прибирань в закладах охорони здоров'я всіх профілів; на підприємствах харчової промисловості (м'ясо-, молоко-, рибопереробній, масложировій, на підприємствах з виробництва майонезів, соусів, кетчупів тощо, хлібопекарських та кондитерських, плодово-овочевих, консервних, крохмале-патокових виробництв, на хладокомбінатах, при виробництві продуктів дитячого харчування, виробництв безалкогольних, пивних, лікєро-горілочаних, напоїв тощо); в закладах торгівлі, ресторанного та житлово-комунального господарства; в дитячих дошкільних установах, учбових закладах усіх рівнів акредитації та інших підприємствах; для знезараження крові і біологічних виділень, посуду, з-під виділень, медичних відходів [35].

Склад: іпохлорит натрію — до 50%; допоміжні речовини — антикорозійні, стабілізувальні домішки; аніонні та неіоногенні ПАВ. Вихідний вміст активного хлору в концентрації засобу 6,0% — 9,0%.

Метод використання. Протирання, зрошення, занурення, замочування.

Рекомендована концентрація: 0,015-2%, залежно від режиму дезінфекції; стерилізація — 0,25-2%.

Фасування. 5 л, 10 л [34].

2. Санабриз Е

Засіб дезінфікуючий виготовлений у відповідності із (ТУ У 20.2-40220141-001:2017) [36].

Склад засобу на 100 мл; активно-діючі речовини:

- етиловий спирт 70%+ 5,0%,
- алкілдиметилбензиламоній хлорид 0,15%+ 0,05%,
- ундецил амідопропиламонійметосульфат (Tetranyl U) 1,3%+0,2%,

- функціональні добавки, в т.ч. для посилення і пролонгації специфічної дії засобу, вода очищена- до 100,0%.

Засіб дезінфікуючий «Санабриз Е», спиртовий розчин для зовнішнього застосування, однорідна прозора (або із легкою опалесценцією) рідина. рН – 6,0 – 8,0, має спиртовий запах. Не містить окиснювачів. Засіб легкозаймистий. Добре розчиняється у воді у будь яких співвідношеннях.

Призначення засобу. Засіб дезінфікуючий «Санабриз Е» застосовується з метою дезінфекції та очищення стійких до спирту невеликих чи важкодоступних поверхонь, включаючи забруднені і незабруднені біологічними виділеннями поверхні приміщень, медичних виробів, апаратури та обладнання, меблів в ЗОЗ різноманітного профілю (в т.ч. відділеннях неонатології, дитячих, акушерсько-гінекологічних, алергології, геронтології, відділеннях з особливим дотриманням асептичного режиму тощо), оздоровчих закладах, аптечних закладах, лабораторіях різного профілю, закладах соціального захисту, на підприємствах харчопереробної, фармацевтичної, мікробіологічної промисловості, комунально-побутового призначення, на всіх видах транспорту (включаючи пасажирський, авіатранспорт, водний та залізничний тощо), на об'єктах та підрозділах органів внутрішніх справ та оборони, у зонах надзвичайних ситуацій, військових конфліктів (в т.ч. в польових умовах) та прирівнюваних ситуацій тощо), у вогнищах інфекційних захворювань, у побуті; дезінфекції та очищення виробів медичного призначення (термометри, тонометри, датчики УЗД, стоматологічні наконечники, інші медичні, включаючи стоматологічні, вироби тощо), перукарського, манікюрного та косметологічного інструментарію, інструментів для виконання татуажу, перманентного макіяжу, пірсингу, інструментів, що використовуються в подології тощо; дезінфекції медичних рукавичок, одягнених на руки; профілактичної дезінфекції взуття та дезінфекції взуття під час і після лікування грибкових інфекцій [36].

Спосіб використання.

Технологічне обладнання, посуд, тара, обладнання фармацевтичних, харчопереробних інших підприємств, підприємств агро-промислового комплексу тощо обробляють шляхом протирання серветкою, змоченою засобом або зрошення чи занурення в засіб, час експозиції – 30 сек.

Пакування. Скляні та полімерні флакони, пляшки місткістю від 10 мл до 2000 мл, (може комплектуватись розпилювачем, дозатором), полімерні каністри місткістю від 2,0 до 10,0 л., діжках від 20 л до 200 л [36].

3. Квікцид

Склад засобу: активно-діючі речовини - 1-пропанолу – 40%, 2-пропанолу – 35%, алкілдиметилбензиламоній хлорид – 0,15%, необхідні функціональні добавки до 100,0% [37].

Форма випуску і фізико-хімічні властивості. Дезінфекційний (антисептичний) засіб – однорідна прозора (або із легкою опалісценсією) безбарвна рідина, рН – 4,7 – 7,5. Не містить окислювачів, стабільний при температурі, що не перевищує 40°C.

Застосування. Знезараження проводять методом протирання, використовуючи чисту серветку(бажано одноразового застосування) просочену засобом «Квікцид» або методом зрошення засобом із флакона з розпилювачем, витримують час експозиції 30 секунд. Норма витрат засобу 30-50 мл/м³. Дозволяється проводити процедуру дезінфекції в присутності осіб, не причетних до процесу дезінфекції. Після завершення дезінфекції змивати засіб не обов'язково.

Пакування. Скляні та полімерні флакони, пляшки місткістю від 10 мл до 2000 мл (може комплектуватись розпилювачем, дозатором), полімерні каністри місткістю від 2,0 до 10,0 л [37].

5.3.2. Мийні та дезінфікуючі засоби для обробки обладнання та комунікацій

Для обробки обладнання та різноманітних комунікацій пропонується використовувати робочий розчин Біомой 0,3% та Новохлор-екстра.

1. Біомой

Це багатокомпонентний, поліфункціональний, біоактивний миючий засіб з дезінфікуючим ефектом виготовлений за ТУ У 22902465.005-96 зі змінами до них [38].

Склад, вміст діючих та допоміжних речовин, мас. %:
алкілбензолсульфонат натрію (сульфонол) 5,0-8,0; лужна протеаза 1,0-1,1 (діючі речовини); натрію карбонат; диспергатор; наповнювач.

Форма випуску і фізико-хімічні властивості. Сипкий порошок від білого до світло жовтого кольору. Допускається наявність грудочок, які подрібнюються при натисканні, та забарвлених включень ензимів. Має характерний запах використаної сировини. Концентрація водневих іонів (рН) розчину з масовою часткою 1 % 9,0-11,5 од. рН. Добре розчиняється у воді. Водні розчини Біомою прозорі, безбарвні, не кородують вироби медичного призначення із металу, скла, полімерних матеріалів, гуми та комбінованих матеріалів. Засіб не сумісний з катіонними поверхнево-активними речовинами.

Призначення. Достерилізаційне очищення виробів медичного призначення із металу, скла, гуми та полімерних матеріалів (включаючи жорсткі та гнучкі ендоскопи, медичні інструменти до гнучких ендоскопів, стоматологічні та хірургічні інструменти). Миття поверхонь приміщень, підлоги, предметів догляду за хворими, предметів інтер'єру тощо. Миття об'єктів навчально-виховних закладів, об'єктів комунально-побутового призначення, підприємств парфумерно-косметичної, мікробіологічної, харчової, переробної і фармацевтичної промисловості, закладів ресторанного господарства і торгівлі, перукарень, косметологічних салонів, аптек, місць тимчасового проживання, на транспорті [38].

Розрахунки для приготування робочих розчинів Біомою [38]

Концентрація, % (за препаратом)	1 дм ³ розчину (1 л)		10 дм ³ розчину (10 л)	
	Кількість Біомою, г	Об'єм води, см ³	Кількість Біомою, г	Об'єм води, см ³
0,15	1,5	998,5	15,0	9985,0
0,3	3,0	997,0	30,0	9970,0
0,5	5,0	995,0	50,0	9950,0

Застосування. Механізований спосіб очищення робочими розчинами Біомою включає промивання об'єктів проточною водою протягом (0,5±0,1) хв, механізоване очищення робочим 0,3% розчином Біомою, промивання проточною водою протягом 3 хв, промивання дистильованою водою протягом (0,5±0,1) хв, сушіння.

Пакування. Біомой Засіб масою нетто від 5 кг до 20 кг упаковують у мішки паперові трьохшарові ПМ або ВМ з поліетиленовими вкладками, барабани картонні навивні БКН-1-10-50 з поліетиленовими вкладками, барабани фанерні з поліетиленовими вкладками. Засіб масою нетто (0,25-2,0) кг упаковують у полімерну тару; засіб масою нетто (0,01-0,25) кг упаковують у пачки з комбінованих матеріалів, у пакетики, що виготовлені з паперу для пакування харчових продуктів, який ламінований поліетиленом [38].

2. Новохлор-екстра

Це дезінфекційний засіб для використання парфюмерно-косметичної, харчопереробної промисловості (у т.ч. м'ясо-, птахо-, рибо-, молокопереробної, виноробної та пивоварної промисловості, з виробництва консервів, безалкогольних напоїв, соків, кулінарних напівфабрикатів, дитячого харчування, морепродуктів, олійно-жирової, плодоовочевої 0

продукції, в тепличних господарствах (в т.ч. з вирощування овочів, ягід і квітів), вирощування грибів, на холодокомбінатах, в хлібобулочній і кондитерській промисловості), в складах, на об'єктах фірмової оптової і роздрібною торгівлі, ресторанного господарства і в інших галузях [39].

Склад. Активно діючою речовиною є гіпохлорит натрію, початковий вміст активного хлору в засобі - 7,0-9,0%. При зберіганні засобу допускається випадіння осаду, наявність якого не є ознакою погіршення якості засобу.

Призначення. На промислових підприємствах засіб «Новохлор-екстра» призначено:

- для дезінфекції і миття різноманітних видів технологічного обладнання (в т.ч. трубопроводів, резервуарів, фасувального обладнання та ін.), холодильного, торговельного і лабораторного обладнання, виробничого і лабораторного посуду і інвентарю, внутрішньоцехової і зворотної тари, вагів, прилавків, вітрин, санітарно-технічного обладнання, прибирального інвентарю тощо;

- для профілактичної дезінфекції, генеральних прибирань і санітарної обробки (поєднання в одному процесі миття і дезінфекції об'єктів) обладнання і поверхонь виробничих, складських і санітарно-побутових приміщень;

- для дезінфекції транспорту для перевезення харчової сировини і готової продукції (в т.ч. автомобільного і залізничного);

- для дезінфекції санітарного, спеціального одягу, білизни та інших текстильних виробів (у т.ч. платок, касет, санітарного одягу, сирних торбинок), а також для вибілювання і видалення плям;

- для дезінфекції поверхні шкаралупи харчових яєць;

- для дезінфекції водопровідних споруд (свердловин, резервуарів, і напірних баків, відстійників, змішувачів, фільтрів, водопровідних мереж, систем подачі технологічної охолоджуючої води тощо), ємностей для зберігання і перевезення питної води;

- для дезінфекції ємностей та резервуарів для тимчасового зберігання та транспортування питної води;

- для знезараження технологічної води (в тих випадках, коли наявність миючих компонентів у воді не перешкоджає її використанню за призначенням);

- для дезінфекції і миття транспорту (зокрема, автомобільного і залізничного, у т.ч. рефрижераторного) для перевезення харчової сировини, напівфабрикатів і готової продукції;

- для облаштування дезбар'єрів;

- для знезараження стічних вод, дренажних і каналізаційних систем, трапів;

- для дезінфекції і миття інших об'єктів, які за санітарно-гігієнічними і протиепідемічними нормами і правилами, а також технологічною документацією потребують такої обробки [39].

Застосування. Дезінфекцію розчинами засобу «Новохлор-екстра» здійснюють методами протирання, зрошення, аерозольним, заповнення (в т.ч. з циркуляцією розчину в СІР-системах), замочування, занурення. Використовують робочі розчини засобу кімнатної або підвищеної температури (початкова температура 40 ± 5 °С, яка не підтримується в ході дезінфекції) в концентрації від 0,01% до 0,5% (за активним хлором) при експозиції від 10 хвилин до 120 хвилин.

Дезінфекцію технологічного обладнання (в т.ч. трубопроводів, резервуарів, фасувального обладнання та ін.), виробничої тари, інвентарю та інших об'єктів і предметів, які забруднені залишками сировини або готової продукції проводять після попереднього ретельного миття і змивання залишків мийного засобу водою [39].

Вміст активного хлору в засобі, %	Потрібна концентрація робочого розчину, % (за активним хлором)	Кількість засобу (мл), необхідна для приготування	
		1 л робочого розчину	10 л робочого розчину
8,5 ± 0,5	0,01	1,2	12
	0,015	1,8	18
	0,025	3,0	30
	0,03	3,6	36
	0,05	6,0	60
	0,1	12	120
	0,25	29	290
	0,35	41	410
	0,5	59	590
	7,5 ± 0,5	0,01	1,4
0,015		2,0	20
0,025		3,3	33
0,03		4,0	40
0,05		6,5	65
0,1		13	130
0,25		33	330
0,35		47	470
0,5		66	660
6,5 ± 0,5	0,01	1,5	15
	0,015	2,3	23
	0,025	3,9	39
	0,03	4,6	46
	0,05	7,5	75
	0,1	15	150
	0,25	38	380
	0,35	54	540
	0,5	77	770
5,5 ± 0,5	0,01	1,8	18
	0,015	2,7	27
	0,025	4,5	45
	0,03	5,4	54
	0,05	9,0	90
	0,1	18	180
	0,25	45	450
	0,35	64	640
	0,5	91	910

Рис. 5.1. Розрахунки для приготування робочих розчинів засобу «Новохлор-екстра» [39].

Дезінфекція поверхонь приміщень, виробничих столів, технологічного (в т.ч. котлів, баків, чанів, транспортерів), холодильного та торговельного обладнання, внутрішньоцехового транспорту тощо здійснюється методом протирання серветками або щітками, змоченими в робочому розчині, або методом зрошення розчином з використанням дезінфекційного обладнання. Рекомендована норма витрати розчину при обробці методом протирання - 100 мл/м².

Пакування. Засіб постачається у полімерних місткостях ємністю 0,5, 1,0, 3,0, 5,0, 10,0, 20,0, 60,0 та 200,0 л [39].

Для визначення поверхонь, які мають підлягати миттю та дезінфекції слід використати специфікацію обладнання з його габаритними розмірами. У ферментаційному відділенні встановлені інокулятори та виробничий ферментер обсягом 3 м³. Висота такого ферментера складає орієнтовно 3,5 м, при цьому приймаємо висоту поверху 6 м.

Приймаємо, що загальна площа приміщення з ферментаційним обладнанням буде 6 м × 4 м = 24 м². Оскільки поверхня стін цього приміщення також підлягатиме миттю та дезінфекції з висотою 2,5 м, розрахуємо загальну площу обробки:

$$\sum F = (6 \text{ м} \times 4 \text{ м}) + (6 \text{ м} + 6 \text{ м} + 4 \text{ м} + 4 \text{ м}) \times 2,5 \text{ м} = 24 \text{ м}^2 + 50 \text{ м}^2 = 74 \text{ м}^2$$

Також слід врахувати те, що миття обладнання буде здійснюватись з використанням СІР-мийки, в цьому випадку витрата миючого засобу складає орієнтовно 20 мл/м².

Дані щодо вибору миючих та дезінфікуючих засобів представлено у таблиці 5.2.

Таблиця 5.2

Вибір мийних та дезінфікуючих засобів для забезпечення виробництва капреоміцину

Назва засобу	Об'єкт миття та/або дезінфекції	Концентрація робочого розчину, %	Вартість 1 л (кг) мийного або дез. засобу, грн/л(кг)	Вартість 1 л робочого розчину мийного або дез.засобу, грн/л	Витрати робочого розчину, л/м ²	Ефективність використання дез. розчину, Е _{дз} , грн/м ²
КлінДез 401	Поверхні, стіни, вікна, двері, підлога	0,5	70	0,35	0,1	0,005
Санабриз Е	Поверхні, стіни, вікна, двері, підлога	100	320	320	0,1	4,3
Квікцид	Поверхні, стіни, вікна, двері, підлога	35	330	115,5	0,05	1,83
Біомой	Обладнання, комунікації	0,3	294	0,8	0,02	0,01
Новохлор-екстра	Обладнання, комунікації	0,1	148	0,15	0,02	0,002

Отже, з метою оброблення технологічних поверхонь слід обрати КлінДез 401 та Санабриз Е. Для передстерилізаційної обробки обладнання та комунікацій будемо використовувати Біомой та Новохлор-екстра. Наявність різних діючих речовин дозволяє використовувати ці засоби по чергово для уникнення розвитку стійких форм мікроорганізмів.

5.4. Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища для біосинтезу капреоміцину

Поживне середовище для одержання посівного матеріалу обрано *Streptomyces capreolus* A250 і виробничого біосинтезу складається з таких компонентів [7]:

Глюкоза - 28 г/л;

Бакто-пептон – 15 г/л;

N-Z Амін А - 4 г/л;

Меляса – 10 г/л;

Крохмаль (картопляний) - 10 г/л;

CaCO₃ - 2 г/л;

MgSO₄·7H₂O – 5 г/л.

Перш за все поділимо середовище на композиції – композиція А: меляса, глюкоза, крохмаль; композиція Б: N-Z Амін А та Бакто-пептон; композиція В: MgSO₄·7H₂O; Композиція Г: CaCO₃.

Найпоширеніший метод стерилізації поживних середовищ – термічна стерилізація при 120...150°C. Її здійснюють у періодичному або безперервному режимах [40].

5.4.1. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках

В першу чергу стерилізують середовище. Проаналізувавши склад поживного середовища розділили на композиції:

Композиція А: глюкоза, меляса, крохмаль (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв.)

Композиція Б: N-Z Амін А, Бакто-пептон (режим стерилізації: 120 °С, 30 хв.)

Композиція В: MgSO₄·7H₂O (режим стерилізації: 131 °С, 60 хв.)

Композиція Г: CaCO₃ (режим стерилізації: 131 °С, 60 хв.)

Встановлення композиції А відбулось враховуючи вміст в них вуглеводів та їх термолабільність. Стерилізація застосовується для ефективного знищення мікроорганізмів шляхом піддання компонентів високій температурі та витримці при цій температурі. У даному випадку, режим стерилізації включає температуру 112°С протягом 20-30 хвилин під тиском 0,15 МПа. Це дозволяє забезпечити надійне знищення бактерій, дріжджів та плісняви, які можуть бути присутні в мелясі та глюкозі [41]. Перед тим як додати мелясу у композицію з глюкозою її потрібно освітлити. Перш за все мелясу розбавляють водою, паралельно готуючи розчин сірчаної кислоти. Після чого розчин сірчаної кислоти додають до розчину меляси. Це супроводжується утворення осаду. Осад, що утворився видаляють за допомогою центрифугування [41]. Крохмаль попередньо розварюють у колбі та додають до композиції А перед стерилізацією.

Кальцію карбонат з композиції Г стерилізується окремо від інших компонентів. Після суспендування карбонату кальцію шляхом перемішування у колбі або за допомогою мішалки в реакторі, суспензію переносять до ферментаційного обладнання. При цьому, для передачі суспензії з реактора використовується самоплив, оскільки вона не може бути перекачана за допомогою насоса. Умови стерилізації при 131 °С (0,05 МПа) впродовж 40-60 хв [41].

Склад композицій для приготування середовища об'ємом 1,8 л для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента в 1,8 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Глюкоза	28	50,4	А	1,2
Меляса	10	18		
Картопляний крохмаль	10	≈36 мл		
Вода		1,2 л		
N-Z Амін А	4	7,2	Б	0,25
Бакто – пептон	15	27		
Вода		0,25 л		
MgSO ₄ ·7H ₂ O	5	9	В	0,25
Вода		0,25 л		
CaCO ₃	2	3,6	Г	0,1
Вода		0,5		
Разом:		1,8		1,8

5.4.2. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в посівних апаратах

Композиція А: глюкоза, меляса, крохмаль (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв.)

Композиція Б: N-Z Амін А, Бакто-пептон (режим стерилізації: 120 °С, 30 хв.)

Композиція В: MgSO₄·7H₂O (режим стерилізації: 131 °С, 60 хв.)

Композиція Г: CaCO₃ (режим стерилізації: 131 °С, 60 хв.)

**Склад композицій для приготування середовища об'ємом 18 л для
вирощування посівного матеріалу в інокуляторі 30 л**

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента в 18 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Глюкоза	28	504	А	5
Меляса	10	180		
Картопляний крохмаль	10	≈360 мл		
Вода		4,8 л		
N-Z Амін А	4	72	Б	0,25
Бакто – пептон	15	270		
Вода		0,25 л		
MgSO ₄ ·7H ₂ O	5	90	В	10,85
Вода		10,85 л		
CaCO ₃	2	36	Г	0,1
Вода		0,1 л		
Конденсат		1,8		1,8
Разом:		18		18

Встановлення композиції А відбулось враховуючи вміст в них вуглеводів та їх термолабільність. Перед тим як додати мелясу у композицію з глюкозою її потрібно освітлити. Перш за все мелясу розбавляють водою, паралельно готуючи розчин сірчаної кислоти. Після чого розчин сірчаної кислоти додають до розчину меляси. Це супроводжується утворення осаду. Осад, що утворився видаляють за допомогою центрифугування [41]. Крохмаль попередньо розварюють у колбі та додають до композиції А перед стерилізацією.

Кальцію карбонат з композиції Г стерилізується окремо від інших компонентів. Після суспендування карбонату кальцію шляхом перемішування у колбі суспензію переносять до ферментаційного обладнання. Умови стерилізації при 131 °С (0,05 МПа) впродовж 40-60 хв [41].

Для приготування та стерилізації композиції А використовують реактор 10 л. Композицію Б готують та стерилізують у колбі 500 мл, композицію В готують та стерилізують безпосередньо в інокуляторі 30 л, композицію Г готують та стерилізують у колбі 250 мл.

Таблиця 5.5

Склад композицій для приготування середовища об'ємом 180 л для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі 300 л

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента в 180 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Глюкоза	28	5 040	А	50
Меляса	10	1 800		
Картопляний крохмаль	10	≈3600 мл		
Вода		42 л		
N-Z Амін А	4	720	Б	2,5
Бакто – пептон	15	2 700		
Вода		2,5 л		
MgSO ₄ ·7H ₂ O	5	900	В	109
Вода		109 л		
CaCO ₃	2	360	Г	0,5
Вода		0,5 л		
Конденсат		18		18
Разом:		180		180

Встановлення композиції А відбулось враховуючи вміст в них вуглеводів та їх термолабільність. Перед тим як додати мелясу у композицію з глюкозою її потрібно освітлити. Перш за все мелясу розбавляють водою, паралельно готуючи розчин сірчаної кислоти. Після чого розчин сірчаної кислоти додають до розчину меляси. Це супроводжується утворення осаду. Осад, що утворився видаляють за допомогою центрифугування [41]. Крохмаль попередньо розварюють у колбі та додають до композиції А перед стерилізацією.

Кальцію карбонат з композиції Г стерилізується окремо від інших компонентів. Після суспендування карбонату кальцію шляхом перемішування у колбі суспензію переносять до ферментаційного обладнання. Умови стерилізації при 131 °С (0,05 МПа) впродовж 40-60 хв [41].

Для приготування та стерилізації композиції А використовують реактор 100 л. Композицію Б готують та стерилізують у реакторі 5 л, композицію В готують та стерилізують безпосередньо в інокуляторі 300 л, композицію Г готують та стерилізують у колбі 1 л.

5.4.3. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу

Таблиця 5.6

Склад композицій для приготування середовища об'ємом 1800 л для вирощування посівного матеріалу у ферментері 3 м³

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента в 1800 л середовища, кг	Композиція	Об'єм композиції, л
Глюкоза	28	50,4	А	500
Меяса	10	18		
Картопляний крохмаль	10	≈36 л		
Вода		400 л		
N-Z Амін А	4	7,2	Б	25
Бакто – пептон	15	27		
Вода		25 л		
MgSO ₄ ·7H ₂ O	5	9	В	1092
Вода		1092 л		
CaCO ₃	2	3,6	Г	3
Вода		2 л		
Конденсат		180		180
Разом:		1800		1800

Встановлення композиції А відбулось враховуючи вміст в них вуглеводів та їх термолабільність. Перед тим як додати меясу у

композицію з глюкозою її потрібно освітлити. Перш за все мелясу розбавляють водою, паралельно готуючи розчин сірчаної кислоти. Після чого розчин сірчаної кислоти додають до розчину меляси. Це супроводжується утворення осаду. Осад, що утворився видаляють за допомогою центрифугування [41]. Крохмаль попередньо розварюють у колбі та додають до композиції А перед стерилізацією.

Кальцію карбонат з композиції Г стерилізується окремо від інших компонентів. Після суспендування карбонату кальцію шляхом перемішування у колбі суспензію переносять до ферментаційного обладнання. Умови стерилізації при 131 °С (0,05 МПа) впродовж 40-60 хв [41].

Для приготування та стерилізації композиції А використовують реактор 1 м³. Композицію Б готують та стерилізують у реакторі 50 л, композицію В готують та стерилізують безпосередньо у ферментері 3 м³, композицію Г готують та стерилізують у колбі 5 л.

Узагальнена інформація щодо необхідного обладнання наведена в табл. 5.7.

Таблиця 5.7

Обладнання для приготування та стерилізації композицій

Композиція	Колби	Інокулятор 30 л	Інокулятор 300 л	Ферментер 3 м ³
А	Колба 2 л	Реактор 10 л	Реактор 100 л	Реактор 1 м ³
Б	Колба 500 мл	Колба 500 мл	Реактор 5 л	Реактор 50 л
В	Колба 500 мл	Інокулятор 30 л	Інокулятор 300 л	Ферментер 3 м ³
Г	Колба 250 мл	Колба 250 мл	Колба 1 л	Колба 5 л

5.5. Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН

Продуцент капреоміцину *Streptomyces capreolus* A250 синтезує необхідну кількість цільового антибіотика при рН 6,5. Тому для доведення

pH середовища до зазначеного показника необхідно передбачити приготування титрувальних агентів – кислоти та лугу. Як розчин кислоти обираємо 6% розчин HCl, як розчину лугу – 6% розчин NaOH. Розчин кислоти готують з концентрованого, не стерилізуючи. Стерилізацію розчину лугу здійснюють при температурі 131°C протягом 40 хвилин.

Титрувальні агенти додають в поживне середовище з розрахунку 2 мл розчину на 1 л середовища.

Таблиця 5.8

Розрахунок додавання титрувальних агентів

Об'єм поживного середовища, л	6% розчин HCl		6% розчин NaOH	
	Об'єм, мл	Особливості приготування	Об'єм, мл	Особливості приготування
18	36	Реактор 10 л	36	Реактор 10 л
180	360		360	
1800	3,6 л		3,6 л	

Отже, процес біосинтезу капреоміцину здійснюють з проведенням таких допоміжних робіт:

- Приготування та стерилізація композицій поживного середовища;
- Приготування 6%-го розчину HCl;
- Приготування та стерилізація 6%-го розчину NaOH;

Для цього необхідним є таке обладнання:

- Реактори об'ємом 10, 100 та 1000 л для приготування та стерилізації композиції А;
- Реактори об'ємом 5 та 50 л для приготування та стерилізації композиції Б;
- Реактори об'ємом 10 л для приготування та стерилізації титрувальних агентів.

РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА КАПРЕОМІЦИНУ

У табл. 6.1 наведено специфікацію технологічного обладнання, зображеного на апаратурній схемі у графічній частині курсового проекту.

Таблиця 6.1

Специфікація ділянки культивування капреоміцину

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
1	2	3	4
ПЗ-1	Пристрій для забору повітря	1	Вентилятор даховий ВКР(ВДР) №5. Температура середовища, що переміщується, до +50°C. Частота обертання 1000 об/хв. Робочий тиск 265 Па. Тип каналу круглий. Компанія: «Харківський вентиляторний завод» (Україна) [42]
Ф-2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтрувальний матеріал очищення повітря G4, 20 мм. Рулонні повітряні фільтроматеріали G4 виробляються з висококласного фільтра, який є неказовим полотном (синтетичні волокна 100% поліестера), виконаним термальним скріпленням при температурі понад 100°C. Компанія: «AFF» (Україна) [43]
К-3	Компресор	1	Компресор масляний повітряний Tesla Weld AIR 500. Продуктивність компресора 500 л/хв. Тиск компресора 8 бар. Кількість оборотів 1150 об/хв. Компанія: «Tesla Weld» (Україна) [44]
Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Водяний охолоджувач SWC 90-50/3. Корпус охолоджувача виготовляється з оцинкованого листа. Колектори зварюються з сталевих трубок з поверхневою обробкою синтетичної фарбою. Поверхня теплообміну створюють алюмінієві пластини товщиною 0,1 мм, натягнуті на мідні трубки. Компанія: «ТЕКО Україна» (Україна) [45]

					НУХТ БТЕК 04.01.30 КР ПЗ							
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання для виробництва капреоміцину			Літ.	Арк.	Аркушів		
Розроб.	Паіко А.О.									55	4	
Перевір.	Сулейко Т.Л.							Кафедра БТМ				
Реценз.												
Н. Контр.												
Затверд.	Стабніков В.П.											

Продовження таблиці 6.1

Р-5	Ресивер	1	Ресивер під тиском стиснутого повітря вертикальний КР-200-15. Матеріал – сталь вуглецева. Робоча температура - 10/50 °С. Об'єм 200 л. Максимальний робочий тиск 15 бар. Компанія: «ПНЕВМАТ» (Україна) [46]
Т-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Водяний нагрівач Aerostar SWH 50-30/3R. Корпус нагрівача виготовлений з оцинкованого листа. Максимальний робочий тиск 1,6 МПа (16 бар), максимальна робоча температура води +100 °С. Поверхня теплообміну виготовлена з алюмінієвих пластин товщиною 0,1 мм, натягнутих на мідні трубки. Компанія: «МоуСтрой» (Україна) [47]
Ф-7	Головний фільтр очистки	1	Панельний фільтр тонкої очистки Jablotron F7. Клас фільтрації F7. Фільтр призначений для утримання часток розміром 1-3 мкм. Ступінь очищення до 95%. Компанія: «Jablotron» (Чехія) [48]
Д-8	Дозатор рідини	1	Розливний дозатор для рідини. Дозування від 2 мл до 5 л. Потужність 30 Вт. Похибка менше 0,5%. Продуктивність 3,5 л/хв. Компанія: «ФОП Філоненко І.М.» (Україна) [49]
Р-9 Р-11 Р-16	Реактор 10 л	3	Скляний реактор із сорочкою S212. Об'єм 10 літрів. Виготовлений із високоякісного боросилікатного скла 3.3. Діапазон температур від -120 °С до 300 °С. Швидкість обертання 0-680 об/хв. Компанія: «Титан Технікс» (Україна) [50]
Д-10 Д-12 Д-15 Д-18 Д-21 Д-24 Д-26	Ваги технічні	7	Ваги електронні технічні CAS AD-10. Найбільша границя зважування 10 кг, дискретність відліку і ціна повірочної поділки 2 г. Клас точності середній ГОСТ 29329-92. Компанія: «CAS» (Південна Корея) [51]
Н-14 Н-17	Насос перистальтичний	2	Перистальтичний насос SEKO KRONOS KRFM0210M6000. Максимальна продуктивність 10 л/год. Максимальний тиск 2 бар. Компанія: «ENGINEERING SYSTEMS» (Україна) [52]

Продовження таблиці 6.1

Ф-19 Ф-27 Ф-36	Фільтр індивідуальний	3	Фільтр тонкої очистки повітря. Матеріал для даного типу фільтрів являє собою гофрований фільтрувальний папір на основі ультра та мікротонкого скловолокна. У фільтруючому матеріалі використовуються скляні волокна діаметром 0,25... 1,0 мкм, що дозволяє, варіюючи співвідношення вмісту волокон різної товщини, отримувати матеріали необхідної ефективності (аж до 99,9995%). Стартовий опір 250 Па. Робоча температура до 280 °С. Компанія: «ВЕНТ-ФІЛЬТР» (Україна) [53]
ІН-20	Інокулятор 30 л	1	Мобільний реактор РСГ-30. Сорочки корпусу – теплообмінна та теплоізолююча. Турбінна мішалка (фреза з плавно регульованою швидкістю) від 0 до 800 об/хв. Матеріал у контакті з продуктом сталь AISI 316 L (03X17H9M2). Довжина 1700, ширина 1000, висота із закритою кришкою 1450 мм. Компанія: «Промвіт» (Україна) [54].
Р-13 Р-22	Реактор 100 л	2	Хімічний реактор 100 л. герметичний з мішалкою (0-150 об/хв). Всі деталі, що контактують із продуктом, виготовлені із нержавіючої сталі AISI 316L. Діапазон регулювання температури ємності до +200 °С. Компанія: «STS Group» (Україна) [55]
Н-23 Н-31 Н-34 Н-38	Насос відцентровий	4	Насос відцентровий JET100 1.1 квт. Максимальний напір 45 м. Швидкодія 50 л/хв. Швидкість 2850 об/хв. Компанія: «Jet!» (Словенія) [56]
Р-25	Реактор 5 л	1	Лабораторний реактор РП-5, обладнаний теплообмінною та теплоізолюючою сорочками. Режим роботи якірної мішалки з плаваючими скребками від 0 до 60 об/хв. Довжина 620 мм, ширина 410 мм, висота 840 мм з опущеною кришкою. Компанія: «Промвіт» (Україна) [57]

Закінчення таблиці 6.1

ІН-28	Інокулятор 300 л	1	Реактор для сироваріння 300 л AISI 304, циліндрична ємність з сорочкою нагріву. Робоча температура 90 °С, матеріал нержавіюча харчова сталь AISI 304. Оберти мішалки 98 об/хв. Компанія: «ВАЙС-МАСТЕР» (Україна) [58]
Д-29 Д-32 Д-35	Дозатор ваговий	3	Ваговий дозатор ФС-125+. Діапазон зважування, 0,15-50 кг. Похибка дози (припустима) 1%. Компанія: «ТехноМашСтрой» (Україна) [59]
Р-30	Реактор 1 м ³	1	Реактор 1000 л СС-1000. Матеріал: сталь AISI 316L, 316 Ti; фторопласт Ф-4, (тефлон); сталь AISI 304, ASTM США. L ≤ 1650; B ≤ 1250; H = 2550. Швидкість обертання мішалки від 0 до 40 об/хв. Компанія: «Промвіт» (Україна) [60]
Р-33	Реактор 50 л	1	Реактор КФТ 50-3 з гомогенізатором (4000 об/хв), якірною та турбінною (50-1350 об/хв) мішалками. Обладнаний теплообмінною сорочкою, розрахованою на температуру T=+130 °С. Можливість встановлення СІР-мийки. Компанія: «КАБЕЛЬФАРМТЕХНІКА» (Україна) [61]
ФР-37	Ферментер 3 м ³	1	Промисловий ферментер 3000 л з нержавіючої сталі SS316 та SS304. Тиск ємності 0,3 МПа, співвідношення діаметра до висоти 1: 2,2-2,5. Швидкість перемішування 50-1000 об/хв. Наявні системи очищення та стерилізації на місці, контроль температури, рН, тиску, рівня заповненості. Компанія: «BaiLun Biotechnology Co., Ltd» (Китай) [62]

РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ КАПРЕОМІЦИНУ

Креслення технологічної схеми біосинтезу антибіотика капреоміцину *Streptomyces capreolus* A250 продемонстровано в графічній частині даного курсового проєкту.

ДР 1. Підготовка аераційного повітря

ДР 1.1 Забір атмосферного повітря

Атмосферне повітря забирають через повітрязабірник ПЗ-1 на висоті 10-12 м. Забір проводять на такій висоті від найвищої точки будівлі для уникнення потрапляння значної кількості мікроорганізмів та пилу.

ДР 1.2. Груба очистка повітря

Для звільнення повітря від пилу, вологи та інших грубих часток повітря подають на фільтр грубого очищення Ф-2 класу G4 із синтетичних волокон 100% поліестера.

ДР 1.3. Компресування повітря

Після цього повітря подають на компресор К-3, де проводять його стиснення до 0,35–0,5 МПа з метою подолання опору фільтрувальних матеріалів на наступних стадіях фільтрування, а також подолання гідравлічного опору під час диспергування у культуральній рідині.

ДР 1.4. Охолодження повітря та зменшення надлишкової вологості

Охолодження повітря проводять у теплообміннику-охолоджувачі Т-4 до 20°C. Далі видаляють вологу з повітря у ресивері Р-5, де вологість зріджується і виходить у вигляді конденсату. Кінцева вологість становить близько 60 %.

					НУХТ БТЕК 04.01.30 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми біосинтезу капреоміцину	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Пацко А.О.					59	14
Перевір.		Сулейко Т.Л.						
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.			Кафедра БТМ			

ДР 1.5. Нагрівання повітря

Через можливість утворення конденсаційної пари на наступних стадіях необхідно підігріти повітря. Підігрів здійснюють в теплообміннику-нагрівачі Т-6. Температура має підвищитись до 30-32°C з врахуванням втрати тепла повітря при наступному його очищенні.

ДР 1.6. Очищення повітря в головному фільтрі

Повітря подають до головного фільтру тонкої очистки Ф-7 класу фільтрації F7. Ступінь очищення має становити до $E = 95\%$ (утримання часток розміром 1-3 мкм).

ДР 1.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

Повітря надходить на фільтри тонкої очистки повітря з гофрованого фільтрувального паперу на основі ультра та мікротонкого скловолокна. Ефективність очищення до 99,9995%. Фільтри Ф-19, Ф-27, Ф-36 встановлюються безпосередньо перед ферментаційним обладнанням. Стерильне повітря подають на стадії ТП 4.5, ТП 4.6, ТП 5.1.

ДР 2. Приготування та стерилізація титрувальних агентів

ДР 2.1. Приготування 6% розчину HCl

До реактора Р-9 за допомогою дозатора рідин Д-8 надходить 0,65 л 6% розчину соляної кислоти, подають 3,34 л води питної, перемішують. Розчин кислоти не піддають стерилізації. Розчин надходить самопливом до ІН-20, ІН-28, ФР-37.

ДР 2.2. Приготування та стерилізація 6% розчину NaOH

На технічних вагах Д-10 зважують 0,24 г NaOH та поміщають до реактора Р-11. В реактор подають 3,9 л води питної, перемішують. При цьому подають глуху пару в сорочку апарата. Стерилізацію проводять при 131°C, 0,15 МПа протягом 40 хв. Розчин надходить самопливом до ІН-20, ІН-28, ФР-37.

ДР 3. Приготування та стерилізація поживних середовищ

ДР 3.1. Освітлення розчину меляси

Розчин меляси освітлюють. Мелясу розбавляють водою, паралельно готуючи розчин сірчаної кислоти. Після чого розчин сірчаної кислоти добавляють до розчину меляси та перемішують за режиму 50-100 об/хв. Це супроводжується утворенням осаду. Осад, що утворився видаляють за допомогою центрифугування.

При розведенні меляси зменшується її в'язкість, в результаті чого збільшується швидкість осадження механічних домішок. При додаванні в розведену мелясу сірчаної кислоти, руйнується гідратна оболонка колоїдних частинок, що призводить до їх коагуляції (злипання, укрупнення) з подальшою седиментацією (осадженням). Після цього меляса надходить на стадії ДР 3.3.1, 3.4.1, 3.5.1., 3.6.1.

ДР 3.2. Попереднє розварювання картопляного крохмалю

Попереднє розварювання картопляного крохмалю здійснюється в реакторі Р-13 на 100 л.

Загальна кількість крохмалю для всіх стадій отримання інокуляту та для біосинтезу становить: $18+180+1800+18000=19,9$ кг. Отже, на технічних вагах Д-12 відважують 19,9 кг крохмалю, подають до реактора Р-13. Подають 19 л холодної питної води за допомогою лічильника. Наважку крохмалю спочатку суспендують у холодній воді, а потім поступово нагрівають вміст до температури 70-90 °С і витримуючи при такій температурі упродовж 20-30 хв, проводять розварювання. Після даного етапу, попередньо заварений крохмаль подається на подальші стадії стерилізації до композицій А. Для стадії стерилізації середовища для вирощування культури в колбах (ДР 3.3.1) та інокуляторі 30 л (ДР 3.4.1) крохмаль дозують мірним циліндром на 100 та 500 мл відповідно, до стадій 3.5.1., 3.6.1. заварений крохмаль надходить на стерилізацію насосом Н-14.

ДР 3.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках

ДР 3.3.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 50,4 г глюкози, 18 г меляси від ДР 3.1 та за допомогою мірного циліндра на 100 мл вносять близько 36 мл картопляного крохмалю від ДР 3.2. Наважку поміщають у бутль об'ємом 2 л і додають 1,2 л води питної, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві 30 хв при температурі 112°C, тиску 0,05 МПа.

ДР 3.3.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 7,2 г N-Z Амін А та 27 г Бакто – пептону. Наважки поміщають у колбу об'ємом 500 мл і додають 250 мл води дистильованої, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві 30 хв при температурі 120°C, тиску 0,075 МПа.

ДР 3.3.3. Приготування та стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 9 г $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. Наважку поміщають у колбу об'ємом 500 мл і додають 250 мл води питної, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві 60 хв при температурі 131°C, тиску 0,15 МПа.

ДР 3.3.4. Приготування та стерилізація композиції Г

На технічних вагах зважують 3,6 г $CaCO_3$. Наважку поміщають у колбу об'ємом 250 мл і додають 100 мл води питної, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві 60 хв при температурі 131°C, тиску 0,15 МПа..

ДР 3.4. Приготування та стерилізація поживного середовища для інокулятора 30 л

ДР 3.4.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах Д-15 зважують 504 г глюкози, 180 г меляси від ДР 3.1 та за допомогою мірного циліндра на 500 мл вносять близько 360 мл картопляного крохмалю від ДР 3.2. Наважки поміщають до реактора Р-16 об'ємом 10 л і додають 4,8 л води питної, перемішують. Стерилізують при температурі 112°C, тиску 0,05 МПа упродовж 30 хв подачею пари через

нижній спуск і у сорочку апарату. Після стерилізації розчин за допомогою насоса Н-17 подають до інокулятора ІН-20.

ДР 3.4.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 72 г N-Z Амін А та 270 г Бакто – пептону. Наважку поміщають у колбу об'ємом 500 мл, і додають 250 мл води питної, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві 30 хв при температурі 120°C, тиску 0,075 МПа.

ДР 3.4.3. Приготування та стерилізація композиції В

На технічних вагах Д-18 зважують 90 г $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. Наважку поміщають в інокулятор ІН-20 об'ємом 30 л і додають 10,85 л води питної, перемішують. Стерилізують при температурі в 131 °С з тиском 0,15 МПа протягом 60 хв подачею пари через нижній спуск і у сорочку апарату.

ДР 3.4.4. Приготування та стерилізація композиції Г

На технічних вагах зважують 36 г $CaCO_3$. Наважку поміщають у колбу об'ємом 250 мл, і додають 100 мл води питної, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві 60 хв при температурі 131°C, тиску 0,15 МПа.

ДР 3.5. Приготування та стерилізація поживного середовища для інокулятора 300 л

ДР 3.5.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах Д-21 зважують 5 040 г глюкози, 1800 г меляси від ДР 3.1 та насосом Н-14 по трубопроводу, оснащеним лічильником, подають близько 3600 мл картопляного крохмалю від ДР 3.2. Наважки поміщають до реактора Р-22 об'ємом 100 л і додають 42 л води питної, перемішують. Стерилізують при температурі 112 °С, тиску 0,05 МПа упродовж 30 хв подачею пари через нижній спуск і у сорочку апарату. Після стерилізації розчин за допомогою насоса Н-23 подають до інокулятора ІН-28.

ДР 3.5.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах Д-24 зважують 720 г N-Z Амін А та 2700 г Бакто – пептону. Наважки поміщають у реактор Р-25 об'ємом 5 л, і додають 2,5 л

води питної, перемішують. Стерилізують при температурі 120 °С, тиску 0,075 МПа упродовж 30 хв подачею пари через нижній спуск і у сорочку апарату. Після стерилізації розчин самопливом подають до інокулятора ІН-28.

ДР 3.5.3. Приготування та стерилізація композиції В

На технічних вагах Д-26 зважують 900 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Наважку поміщають в інокулятор ІН-28 об'ємом 300 л і додають 109 л води питної, перемішують. Стерилізують при температурі в 131 °С з тиском 0,15 МПа протягом 60 хв подачею пари через нижній спуск і у сорочку апарату.

ДР 3.5.4. Приготування та стерилізація композиції Г

На технічних вагах зважують 360 г CaCO_3 . Наважку поміщають у колбу об'ємом 1 л, і додають 500 мл води питної, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві 60 хв при температурі 131°С, тиску 0,15 МПа.

ДР 3.6. Приготування та стерилізація поживного середовища для ферментера 3 м³

ДР 3.6.1. Приготування та стерилізація композиції А

За допомогою вагового дозатора Д-29 зважують 50,4 кг глюкози, 18 кг меляси від ДР 3.1 та насосом Н-14 по трубопроводу, оснащеним лічильником, подають близько 36 л картопляного крохмалю від ДР 3.2. Наважки поміщають до реактора Р-30 об'ємом 1000 л і додають 400 л води питної, перемішують. Стерилізують при температурі 112 °С, тиску 0,05 МПа упродовж 30 хв подачею пари через нижній спуск і у сорочку апарату. Після стерилізації розчин за допомогою насоса Н-31 подають до ферментера ФР-37.

ДР 3.6.2. Приготування та стерилізація композиції Б

За допомогою вагового дозатора Д-32 зважують 7,2 кг N-Z Амін А та 27 кг Бакто – пептону. Наважки поміщають у реактор Р-33 об'ємом 50 л, і додають 25 л води питної, перемішують. Стерилізують при температурі 120°С, тиску 0,075 МПа упродовж 30 хв подачею пари через нижній спуск і у сорочку апарату. Після стерилізації розчин за допомогою насоса Н-34 подають до ферментера ФР-37.

ДР 3.6.3. Приготування та стерилізація композиції В

За допомогою вагового дозатора Д-35 зважують 9 кг $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. Наважку поміщають у ферментер ФР-36 об'ємом 3 м³ і додають 1092 л води питної, перемішують. Стерилізують при температурі в 131 °С з тиском 0,15 МПа протягом 60 хв подачею пари через нижній спуск і у сорочку апарату.

ДР 3.5.4. Приготування та стерилізація композиції Г

На технічних вагах зважують 3,6 кг $CaCO_3$. Наважку поміщають у колбу об'ємом 5 л, і додають 2 л води питної, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві 60 хв при температурі 131°С, тиску 0,15 МПа.

ТП 4. Підготовка посівного матеріалу

ТП 4.1. Підтримання колекційної культури

Колекційну культуру *Streptomyces capreolus* зберігають у пробірках зі скошеним м'ясо-пептонним агаром (МПА) при температурі $4 \pm 1^\circ C$. Пересіви здійснюють кожні 3-4 місяці. Всі роботи з колекційною культурою проводять строго в асептичних умовах.

ТП 4.2. Одержання робочої культури на агаризованому середовищі

Колекційну культуру, що зберігається в пробірках зі скошеним МПА, розсівають петлею із ізолюваних колоній на чашки Петрі, які також містять МПА і вирощують при температурі $30 \pm 1^\circ C$ упродовж 76 год.

ТП 4.3. Вирощування культури на агаризованому середовищі

Отримані ізолювані колонії (від ТП 4.2) пересівають в пробірки зі скошеним МПА (одна ізолювана колонія використовується для засіву однієї пробірки). У пробірки пересівають ізолювані колонії, що знаходяться на відстані не менше 1 см. Тривалість вирощування – 76 год.

ТП 4.4. Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках

В асептичних умовах у бутль об'ємом 2 л зі стерильною композицією А (від ДР 3.3.1) вносять простерилізовану композицію В (від ДР 3.3.2), композицію В (від ДР 3.3.3) та композицію Г (від ДР 3.3.4) перемішують і розливають по 150 мл у 12 стерильних качалочних колб об'ємом 750 мл.

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

Вирощування *S. capreolus* ведуть у колбах на круговій качалці (150 об/хв) при температурі $30\pm 1^\circ\text{C}$ впродовж 76 год. Після чого посівний матеріал з колб переносять у стерильну засівну колбу об'ємом 2 л. З колби відбирають пробу для мікробіологічного та технологічного контролю.

ТП 4.5. Вирощування в інокуляторі 30 л

У попередньо простерилізований інокулятор ІН-20 з композицією В (від ДР 3.4.3) насосом Н-17 вносять композицію А (від ДР 3.4.1), а також композицію Б (від ДР 3.4.2) та композицію Г (від ДР 3.4.4). Після цього вносять посівний матеріал через засівну колбу (від ТП 4.4.). Всі операції проводять в асептичних умовах. Вмикають мішалку (150 об/хв), температуру $30\pm 1^\circ\text{C}$ підтримують подачею гарячої або холодної води в сорочку, подають стерильне повітря через фільтр Ф-19 від ДР 1.7. Тривалість культивування 76 год; рН на рівні 6,5 підтримують титрувальними розчинами кислоти та лугу від ДР 2.1 та ДР 2.2.

ТП 4.6. Вирощування в інокуляторі 300 л

У попередньо простерилізований інокулятор ІН-28 з композицією В (від ДР 3.5.3) за допомогою насоса Н-23 вносять композицію А (від ДР 3.5.1), самопливом подають композицію Б (від ДР 3.5.2) з реактора Р-25 та вносять композицію Г (від ДР 3.5.4). Після цього через трубу перетискування подають посівний матеріал (від ТП 4.5.). Всі операції проводять в асептичних умовах. Вмикають мішалку (150 об/хв), температуру $30\pm 1^\circ\text{C}$ підтримують подачею гарячої або холодної води в сорочку, подають стерильне повітря через фільтр Ф-27 від ДР 1.7. Тривалість культивування 76 год; рН на рівні 6,5 підтримують титрувальними розчинами кислоти та лугу від ДР 2.1 та ДР 2.2.

ТП 5. Біосинтез

ТП 5.1. Виробниче культивування

У попередньо простерилізований ферментер ФР-37 з композицією В (від ДР 3.6.3) за допомогою насоса Н-31 вносять композицію А (від ДР 3.6.1), насосом Н-34 подають композицію Б (від ДР 3.6.2) з реактора Р-33 та вносять композицію Г (від ДР 3.6.4). Після цього через трубу перетискування подають посівний матеріал (від ТП 4.6.). Всі операції проводять в асептичних умовах. Вмикають мішалку (150 об/хв), температуру $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ підтримують подачею гарячої або холодної води в сорочку, подають стерильне повітря через фільтр Ф-36 від ДР 1.7. Тривалість культивування 144 год; рН на рівні 6,5 підтримують титрувальними розчинами кислоти та лугу від ДР 2.1 та ДР 2.2.

Культивування припиняють за досягнення в культуральній рідині концентрації антибіотику 3 г/л.

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

РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА КАПРЕОМІЦИНУ

8.1. Мікробіологічний контроль

Маючи дані поживного середовища *Streptomyces capreolus* можна зробити план мікробіологічного контролю виробництва.

8.1.1. Мікробіологічний контроль стерильності поживних середовищ

Для контролю стерильності поживного середовища розплавлене поживне середовище, розливають в стерильні чашки Петрі, котрі стерилізувалися сухим жаром. В середині шафи розташовані металеві полиці з отворами, на які поміщають матеріал, що стерилізується. Стерилізація проводиться при температурі 160-170 °С протягом 1–2 год. сухожаровій шафі [63].

Посів. Після чого відбирають пробу з вже простерилізованого середовища. Відібрану пробу вносять на поверхню відповідного агаризованого середовища, в нашому випадку це МПА. За допомогою стерильного інструменту, такого як петля або шпатель, розсіюють пробу по поверхні агару шляхом проведення кількох рухів. Чашки з посівом поміщають у термостат. Умови інкубації 30-35°С приблизно 24-48 годин.

На стерильному поживному середовищі не повинно бути жодних видимих колоній мікроорганізмів. Після інкубації протягом відповідного часу, якщо немає жодної ознаки росту мікроорганізмів, можна припускати, що середовище є стерильним.

8.1.2. Мікробіологічний контроль чистоти культури

За допомогою стерильних інструментів, наприклад петлі, здійснюється прямий висів культуральної рідини на чашки Петрі на поверхню стерильного поживного середовища (МПА), для одержання ізольованих колоній *Streptomyces capreolus*.

					НУХТ БТЕК 04.01.30 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва капреоміцину	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Пашко А.О.					68	13
Перевір.		Сулейко Т.Л.						
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.				Кафедра БТМ ^с		

Щоб контролювати інокулянт потрібно зробити роздавлену краплю. На чисте предметне скло наносять краплю дистильованої води. У краплю вносять культуру *Streptomyces capreolus*, змішують з водою і накривають покривним склом. Протилежним кінцем мікробіологічної петлі або голки злегка притискають покривне скло до предметного. Надлишок води видаляють фільтрувальним папером, підносячи його до граней покривного скла. Після чого проводять мікроскопіювання проби і перевіряють наявність чужорідних мікроорганізмів. При перегляді приготовленого препарату під мікроскопом з імерсійною системою зверху на покривне скло наносять краплю імерсійної олії [64].

За відсутності контамінації можна спостерігати грампозитивні бактерії *Streptomyces capreolus* ниткоподібної форми. Утворює відносно довгі, прямі повітряні міцелії з розгалужених субстратних міцеліїв. Утворення спіралей або петель не спостерігається [65].

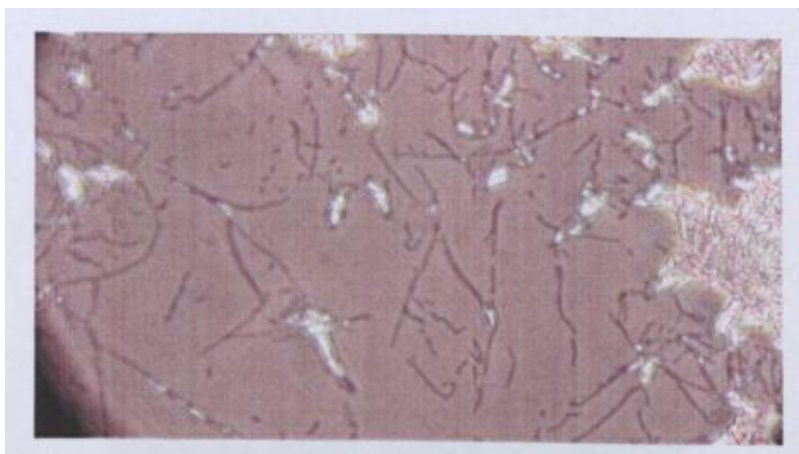


Рис. 8.1 Міцелій *Streptomyces capreolus* під мікроскопом x40 [8].

8.2. Контроль концентрації джерел вуглецевого і азотного живлення

8.2.1. Визначення вмісту редуруючих цукрів

Визначення вмісту глюкози

Оскільки в середовищі культивування продуцента капреоміцину присутня глюкоза як джерело вуглецю, для визначення її вмісту можна використати систему GlucCell™.

Система моніторингу рівня глюкози в культурі клітин GlucCell™ призначена для кількісного вимірювання концентрації глюкози при культивуванні клітин. Система GlucCell™ використовує новітню технологію моніторингу рівня глюкози в клітинних культурах, щоб забезпечити легке та надійне тестування. Системі потрібно всього 1,5 мкл зразка культурального середовища, щоб здійснити тестування лише за 15 секунд. Вимірний результат з'являється на дисплеї приладу.

Система GlucCell™ складається з глюкометра GlucCel, тест-смужок для визначення рівня глюкози, кодового ключа і програмного ключа. Ці продукти призначені для спільного використання для отримання точних результатів визначення концентрації глюкози в культуральному середовищі. Визначення можна проводити у температурному діапазоні від 10°C до 40°C, відхилення у температурі за межі даного діапазону можуть вплинути на результати тесту.

Дана система портативна, попередньо відкалібрована, на 99,5% корелює з біохімічними аналізаторами NOVA та YSI. Презиційність >95%, точність >90%, лінійність = 0,9997 [66].

Визначення вуглеводів у м'ясі

Для визначення кількості вуглеводів (сахарози, глюкози і фруктози), які містяться у м'ясі, використовують метод високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) [67].

Цей метод дозволяє розділити компоненти м'яса на основі їх хімічних властивостей і провести кількісний аналіз окремих вуглеводів. У процесі рідинної хроматографії зразок м'яса вводять у систему, де він проходить через розділювальний стовпчик, заповнений матеріалом зі спеціальними властивостями. Після розділення компонентів вони реєструються за допомогою детектора, який генерує сигнал, пропорційний концентрації окремих вуглеводів у зразку [67].

Етапи підготовки:

- 1) зразки фільтрують через мембранний фільтр з розміром пор 0,22 мкм;

- 2) профільтровані зразки пропускають через картриджі Sep-Pak C18;
- 3) зразки пропускають через іонообмінні екстракційні колонки Bond-Elut;
- 4) зразки направляють на картриджі зі змішаною іонообмінною смолою.

Після проведення підготовки зразків їх направляють на хроматографування з використанням чотирьох різних колонок ВЕРХ відповідно. Стоки колонок контролюються за допомогою детектора показника заломлення.

Кількісний аналіз проводять з використанням зовнішнього стандарту.

Хроматографічні умови є наступними:

- 1) Розділення Вуглевод- Na^+ : елюент - вода, швидкість потоку 0,4 мл/хв, температура 85°C;
- 2) Розділення Вуглевод- Ca^{2+} : елюент - вода, швидкість потоку 0,8 мл/хв, температура 35°C;
- 3) Розділення озоноруйнівних речовин (ODS 5): елюент - вода, швидкість потоку 0,5 мл/хв, при кімнатній температурі;
- 4) Розділення NH_2 : елюент – суміш ацетонітрилу та 0,01 М розчину KH_2PO_4 , рН 7 (у пропорції 74:26), швидкість потоку 2,0 мл/хв, при кімнатній температурі.

Отримують хроматограми, на яких визначають піки, що відповідають кількості вуглеводів (сахарози, глюкози і фруктози), які містяться у мелясі [67].

8.2.2. Визначення амінного азоту

Оскільки джерелом азоту є пептоний гідролізат, з метою визначення амінного азоту використаємо метод формольного титрування.

У колбу місткістю 25 мл вносять 3 мл досліджуваного розчину. Після цього додають 1 краплину 0,1%-го спиртового розчину фенолфталеїну та доливають краплинами 0,1 н розчин гідроксиду натрію до досягнення червоного забарвлення рідини. У нейтралізований таким чином розчин додають 2 мл формольної суміші. При цьому червоне забарвлення розчину

має зникнути. Далі проводять титрування 0,1 н розчином NaOH до появи червоного кольору одержаного розчину [68].

Обчислення вмісту азоту амінних груп у досліджуваному зразку проводять наступним чином. Для прикладу, на титрування дослідного розчину витратили 0,98 мл 0,1 н розчину гідроксиду натрію. Знаючи, що 1 мл 0,1 н. розчину гідроксиду натрію відповідає 1,4 мг азоту, обчислюємо кількість амінного азоту в досліджуваному зразку [68].

Та кількість гідроксиду натрію, витрачена на титрування розчинів, помножена на 1,4, відповідає кількості азоту в міліграмах, яка міститься в 3 мл досліджуваної рідини [68].

8.3. Контроль показників росту і біосинтезу

Показники росту та біосинтезу включають вимірювання сухої речовини біомаси, концентрації цільового продукту, вмісту вуглецю та нітрату [69].

Використовуючи рідкий зразок, вимірюють концентрацію цільового продукту, наприклад, капреоміцину, за допомогою відповідних методів аналізу [69].

8.3.1. Визначення концентрації біомаси

У 2 центрифужні пробірки відбирають по 5 мл культуральної рідини та центрифугують за 3000 об/хв протягом 5 хв. По закінченню центрифугування фугат зливають в окремі пробірки, до одержаного осаду додають по 5 мл дистильованої води відповідно та повторно проводять процес центрифугування в режимі(3000 об/хв впродовж 5 хв. Такі операції повторюють двічі [70].

Після відмивання біомасу у вигляді осаду кількісно переносять у сухий та зважений бюкс. Далі бюкси висушують до постійної маси у сушильній шафі при температурі 105 °С. Висушені бюкси поміщають в ексікатор з метою охолодження до кімнатної температури та зважують на аналітичних вагах. Різниця у значеннях ваги бюксів з біомасою бактеріальних клітин двох послідовних зважувань має становити не більше, ніж декілька одиниць у четвертому знаку після коми. Зважаючи на одержані дані, розраховують

загальну кількість біомаси в перерахунку на 1 мл культуральної рідини за формулою:

$$X = \frac{(A - B)1000}{V}$$

де X – кількість сухої біомаси в г/л;

A – маса бюксу з осадом, виражена в грамах;

B – маса бюксу без осад, виражена в грамах;

V – об'єм культуральної рідини для центрифугування в мл [70].

8.3.2. Визначення концентрації капреоміцину

Кількісне визначення капреоміцину здійснюють за допомогою високоефективної рідинної хроматографії. Вона зазвичай базується на принципі аналізу розділення компонентів за допомогою хроматографічної системи та їх виявлення за допомогою спеціального детектора. Розподіл між двома фазами, що не змішуються, одна з яких нерухома, а інша рухома [71].

Культуральний розчин, що містить капреоміцин, збирають, бактеріальні клітини відокремлюють центрифугуванням. Отриману рідину відфільтровують або пропускають через мембрану для видалення залишкових частинок.

Умови проведення високоефективної рідинної хроматографії включають використання колонки Hypersil base C₁₈ (250 мм × 4,6 мм, 5 мкм), що підтримується при 25°C, рухомої фази, що містить ацетонітрил, фосфатний буфер рН 2,3 і 0,025 М, гексансульфат при швидкості потоку 1,0 мл/хв та УФ-детектування, виконане при 268 нм [72].

На сьогоднішній день, одним із кращих приладів для проведення рідинної хроматографії є система високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) LC 300. Її переваги полягають в тому, що прилад має високу продуктивність, а також можливо налаштувати індивідуальні умови рідинної хроматографії. Також машина має автоматичний режим, що дає змогу не витратити багато часу на аналіз [73].

8.3.3. Визначення активності антибіотику канпреоміцину

Тестування чутливості проводять методом дискової дифузії на агарі Міддлбрука 7H10 (Difco, США) з додаванням 10% олеїнової кислоти-альбумін-декстрозо-каталази (OADC) з єдиною концентрацією препарату. Капреоміцин визначають методом розведення в агарі згідно з рекомендаціями CLSI (Клінічні та лабораторні стандарти інститута) на агарі Міддлбрука 7H10 з додаванням 10% OADC та різних концентрацій препарату (0, 2, 4, 8, 16, 32 та 64 мкг/мл) [74].

Розливають розчини антибіотику (зразки та стандарти) у порожні циліндри на поверхню агару, засіяну тестовими організмами. Мінімальну інгібуючу концентрацію визначають як найнижчу концентрацію препарату, яка пригнічує ріст (>99%) після 4 тижнів інкубації при 37°C. *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 використовують як чутливий контрольний штам. Активність визначають одночасно порівнююючи розміри зон затримки росту зразка та стандарту при однакових розведеннях. Кількісно активність антибіотиків виражається в одиницях дії (ОД) або "мкг" [74].

8.4. Карта постадійного контролю виробництва капреоміцину

Таблиця 8.1

Карта постадійного контролю одержання антибіотику капреоміцину

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
Кт 1.1 Забір атмосферного повітря	Висота забору повітря	Висота труби забору	Протягом всього циклу виробництва	H=10-12 м
Кт 1.2 Груба очистка повітря	Очищене повітря, ступінь очищення повітря на виході з фільтра, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеню очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки у фільтрі грубого очищення	E=80%, тиск згідно паспорту
Кт 1.3 Компресування повітря	Стиснене повітря, тиск	Манометр технічний	Повітря після компресування	P=0,35-0,5 МПа
Кт 1.4 Охолодження повітря та зменшення надлишкової вологості	Охоложене повітря, температура, вологість	Термометр технічний, психрометричний метод	Після охолодження повітря і видалення вологи	t=20°C, W=60%
Кт 1.5 Нагрівання повітря	Підігріте повітря, температура	Термометр технічний	Після нагріву повітря	t=30-32°C
Кт 1.6 Очищення повітря в головному фільтрі	Очищене повітря, перепади тисків, ступінь очищення повітря на виході з фільтра	Манометр, перевірка ступеню очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки у фільтрі головного очищення	E=95%, тиск згідно паспорту
Кт 1.7 Очищення повітря на індивідуальному фільтрі	Очищене повітря, ступінь очищення повітря	Перевірка ступеню очищення повітря згідно паспорту фільтра	Під час очищення повітря на індивідуальних фільтрах	E=99,9995 %

Продовження таблиці 8.1

Кх 2.1 Приготування 6% розчину HCl	Концентрація HCl	Хімічний метод	Після приготування розчину	C=6%
Кх 2.2 Приготування та стерилізація 6% розчину NaOH	Концентрація NaOH, температура, тиск, час, стерильність	Хімічний метод, манометр технічний, термометр, таймер, мікробіологічний контроль	Концентрацію визначають після приготування розчину. Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний метод контролю	C=6%, P=0,15 МПа, t=131°C, τ=40 хв, відсутність мікробіоти
Кт 3.1. Освітлення розчину м'яса	М'яса, розчин сірчаної кислоти, швидкість обертів	Тахометр	Швидкість перемішування визначається безперервно	w= 50-100 об/хв
Кт 3.2. Попереднє розварювання картопляного крохмалю	Крохмаль картопляний, температура, час	Термометр, таймер, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час розварювання	t=70-90°C, τ=20-30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.3.1 Приготування та стерилізація композиції А для вирощування інокуляту в колбах на качалках	Композиція А, температура, тиск, час, стерильність	Термометр, таймер, манометр технічний мікробіологічний контроль	Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний метод контролю	t=112°C, P=0,05 МПа, τ=30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.3.2 Приготування та стерилізація композиції Б для вирощування інокуляту в колбах на качалках	Композиція Б, температура, тиск, час, стерильність	Термометр, таймер, манометр технічний мікробіологічний контроль	Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний метод контролю	t=120°C, P=0,075 МПа, τ=30 хв, відсутність мікробіоти

Продовження таблиці 8.1

Кт, Км 3.3.3 Приготування та стерилізація композиції В для вирощування інокуляту в колбах на качалках	Композиція В, температура, тиск, час, стерильність	Термометр, таймер, манометр технічний мікробіологічний контроль	Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний метод контролю	t=131°C, P=0,15 МПа, τ=60 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.3.4 Приготування та стерилізація композиції Г для вирощування інокуляту в колбах на качалках	Композиція Г, температура, тиск, час, стерильність	Термометр, таймер, манометр технічний мікробіологічний контроль	Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний метод контролю	t=131°C, P=0,15 МПа, τ=60 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.4.1 Приготування та стерилізація композиції А для інокулятора 30 л	Композиція А, температура, тиск, час, стерильність	Термометр, таймер, манометр технічний мікробіологічний контроль	Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний метод контролю	t=112°C, P=0,05 МПа, τ=30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.4.2 Приготування та стерилізація композиції Б для інокулятора 30 л	Композиція Б, температура, тиск, час, стерильність	Термометр, таймер, манометр технічний мікробіологічний контроль	Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний метод контролю	t=120°C, P=0,075 МПа, τ=30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.4.3 Приготування та стерилізація композиції В для інокулятора 30 л	Композиція В, температура, тиск, час, стерильність	Термометр, таймер, манометр технічний мікробіологічний контроль	Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний метод контролю	t=131°C, P=0,15 МПа, τ=60 хв, відсутність мікробіоти

Продовження таблиці 8.1

Кт, Км 3.4.4 Приготування та стерилізація композиції Г для інокулятора 30 л	Композиція Г, температура, тиск, час, стерильність	Термометр, таймер, манометр технічний мікробіологічний контроль	Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний метод контролю	t=131°C, P=0,15 МПа, τ=60 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.5.1 Приготування та стерилізація композиції А для інокулятора 300 л	Композиція А, температура, тиск, час, стерильність	Термометр, таймер, манометр технічний мікробіологічний контроль	Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний метод контролю	t=112°C, P=0,05 МПа, τ=30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.5.2 Приготування та стерилізація композиції Б для інокулятора 300 л	Композиція Б, температура, тиск, час, стерильність	Термометр, таймер, манометр технічний мікробіологічний контроль	Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний метод контролю	t=120°C, P=0,075 МПа, τ=30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.5.3 Приготування та стерилізація композиції В для інокулятора 300 л	Композиція В, температура, тиск, час, стерильність	Термометр, таймер, манометр технічний мікробіологічний контроль	Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний метод контролю	t=131°C, P=0,15 МПа, τ=60 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.5.4 Приготування та стерилізація композиції Г для інокулятора 300 л	Композиція Г, температура, тиск, час, стерильність	Термометр, таймер, манометр технічний мікробіологічний контроль	Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний метод контролю	t=131°C, P=0,15 МПа, τ=60 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.6.1 Приготування та стерилізація композиції А для ферментера 3 м ³	Композиція А, температура, тиск, час, стерильність	Термометр, таймер, манометр технічний мікробіологічний контроль	Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний метод контролю	t=112°C, P=0,05 МПа, τ=30 хв, відсутність мікробіоти

Продовження таблиці 8.1

Кт, Км 3.6.2 Приготування та стерилізація композиції Б для ферментера 3 м ³	Композиція Б, температура, тиск, час, стерильність	Термометр, таймер, манометр технічний мікробіологічний контроль	Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний метод контролю	t=120°C, P=0,075 МПа, τ=30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.6.3 Приготування та стерилізація композиції В для ферментера 3 м ³	Композиція В, температура, тиск, час, стерильність	Термометр, таймер, манометр технічний мікробіологічний контроль	Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний метод контролю	t=131°C, P=0,15 МПа, τ=60 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.6.4 Приготування та стерилізація композиції Г для ферментера 3 м ³	Композиція Г, температура, тиск, час, стерильність	Термометр, таймер, манометр технічний мікробіологічний контроль	Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний метод контролю	t=131°C, P=0,15 МПа, τ=60 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1 Підтримання колекційної культури	Колекційна культура, температура, мікробіологічна чистота культури	Холодильник	Мікробіологічний контроль	t=4±1°C, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 4.2 Одержання робочої культури на агаризованому середовищі	Пересіяна культура, чашки Петрі з МПА, температура, тривалість вирощування, мікробіологічна чистота культури	Термостат, мікроскоп, мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль після вирощування культури	t=30±1°C, τ=76 год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 4.3 Вирощування культури на агаризованому середовищі	Пересіяна культура, пробірки з МПА, температура, тривалість вирощування, мікробіологічна чистота культури	Термостат, мікроскоп, мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль після вирощування культури	t=30±1°C, τ=76 год, відсутність сторонньої мікробіоти

Закінчення таблиці 8.1

Кт, Км 4.4 Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, таймер, тахометр, мікробіологічний контроль	Після вирощування інокуляту в колбах на качалках	$t=30\pm 1^{\circ}\text{C}$, $\tau=76$ год, $\omega=150$ об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Кх, Км 4.5 Вирощування в інокуляторі 30 л	Посівний матеріал, тривалість культивування, температура, рН, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, таймер, рН-датчик, тахометр, мікробіологічний контроль	Під час вирощування інокуляту і в кінці культивування	$t=30\pm 1^{\circ}\text{C}$, $\tau=76$ год, $\omega=150$ об/хв, рН=6,5, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Кх, Км 4.6 Вирощування в інокуляторі 300 л	Посівний матеріал, тривалість культивування, температура, рН, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, таймер, рН-датчик, тахометр, мікробіологічний контроль	Під час вирощування інокуляту і в кінці культивування	$t=30\pm 1^{\circ}\text{C}$, $\tau=76$ год, $\omega=150$ об/хв, рН=6,5, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Кх, Км 5.1 Виробниче культивування	Культуральна рідина, температура, рН, тривалість культивування, концентрація капреоміцину, мікробіологічна чистота	Термометр технічний, годинник, рН-датчик, тахометр, хроматограф, мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль проводять кожні 8 годин, концентрація капреоміцину визначається після закінчення процесу культивування	$t=30\pm 1^{\circ}\text{C}$, $\tau=144$ год, $\omega=150$ об/хв, рН=6,5, $C_k = 6$ г/л, відсутність сторонньої мікробіоти

8.5. Ідентифікація капреоміцину

Аналітичне визначення капреоміцину можна провести за допомогою спектрофотометричного методу [75].

Спектрофотометричне вимірювання проводять за допомогою спектрофотометра V-520 (Jasco, Токіо, Японія), встановленого на довжині хвилі 268 нм.

Калібрувальну криву для УФ-аналізів будують з використанням семи стандартних розчинів в діапазоні концентрацій 5–35 г/мл. Отримані дані приймають як середнє значення трьох вимірювань ($n = 3$), довірчий інтервал – 0,05.

Вміст капреоміцину виражають як різницю між початковою кількістю пептиду та вільним капреоміцином у досліджуваному зразку [75].

8.6. Показники якості капреоміцину

1. Опис

Білий або майже білий порошок [76].

Визначають візуально

2. Значення рН

Готують розчин концентрацією 30 мг на 1 мл води очищеної.

Значення рН досліджуваного розчину має бути в діапазоні від 4,5 до 7,5.

3. Втрата в масі при висушуванні

Відбирають пробу близько 100 мг досліджуваної субстанції капреоміцину.

Висушують пробу 100 мг у вакуумі під тиском, що не перевищує 5 мм ртутного стовпчика при температурі 100 °С протягом 4 годин.

Втрата в масі досліджуваної субстанції антибіотику не має перевищувати 10,0% [77].

4. Сульфатна зола

Підхожий тигель (наприклад, кремнієвий, платиновий, фарфоровий або кварцовий) прожарюють при температурі (600+50) °С протягом 30 хв,

залишають до охолодження в ексикаторі над силікагелем або іншою підходящою висушуючою речовиною і зважують [78].

1-2 г капреоміцину поміщають у тигель і зважують. Речовину змочують невеликою кількістю *кислоти сірчаної P* (звичайно 1 мл) і обережно нагрівають при можливо більш низькій температурі до повного обвуглювання зразка. Після охолодження залишок змочують невеликою кількістю *кислоти сірчаної P* (звичайно 1 мл), обережно нагрівають до появи білої пари і після її нетривалого виділення залишок прожарюють при температурі $(600 \pm 50)^\circ\text{C}$ до його повного обвуглювання. Стежать за тим, щоб під час прожарювання не виникало полум'я.

Тигель залишають охолоджуватися в ексикаторі над силікагелем або іншою підходящою висушуючою речовиною, знову його зважують і розраховують процентний вміст залишку [78].

Обгорілий залишок змочують 2 мл азотної кислоти і 5 краплями сірчаної кислоти [77].

Значення має становити не більше 3,0%.

4. Вміст важких металів

До 12 мл водного розчину додають 2 мл *буферного розчину рН 3,5 P* і перемішують. Одержану суміш додають до 1,2 мл *реактиву тіоацетаміду P* і негайно перемішують [78].

Паралельно за тих самих умов готують еталон, використовуючи замість 12 мл випробовуваного розчину суміш 10 мл *еталонного розчину свинцю (1 ppm або 2 ppm Pb) P* і 2 мл випробовуваного розчину.

Готують холостий розчин, використовуючи суміш 10 мл *води P* і 2 мл випробовуваного розчину. Порівняно з холостим розчином еталон повинен мати світло-коричневе забарвлення. Через 2 хв коричневе забарвлення випробовуваного розчину має бути не інтенсивнішим за забарвлення еталона [78].

Вміст важких металів має становити не більше 0,003%.

5. Кількісне визначення капреоміцину

Рухома фаза. Розчиняють 0,5 г бісульфату амонію в 1000 мл води та відфільтровують через фільтр з розміром пор 0,5 мкм або менше. Готують суміш цього розчину та метанолу (550:450) і дегазують. За необхідності вносять коригування [78].

Еталонний розчин. Готують розчин еталонного зрак у воді, що містить приблизно 0,25 мг на мл.

Підготовка випробуваного розчину. Готують розчин капреоміцину у воді концентрацією приблизно 0,25 мг на мл.

Хроматографічна система. Рідинний хроматограф оснащений 268 нм детектором і колонкою розміром 4,6 мм × 15 см, яка містить насадку L10 із вмістом вуглецю 3,5%. Швидкість потоку становить приблизно 1,5 мл на хвилину.

Хроматографують еталонний розчин та записують відповіді піків відповідно до вказівок для процедури: коефіцієнт симетрії піка для основних піків (капреоміцин ІА та капреоміцин ІВ) не перевищують 2,5; роздільна здатність між піком капреоміцину ІА та піком капреоміцину ІВ становить не менше 1,5.

Процедура. Вводять близько 20 мкл досліджуваного препарату в хроматограф, записують хроматограму та вимірюють відповіді для всіх піків. Обчислюють відсотковий вміст капреоміцину І у капреоміцині за формулою:

$$100(r_{IA} + r_{IB}) / r_t$$

де r_{IA} та r_{IB} є відповідями піку капреоміцину ІА та піку капреоміцину ІВ відповідно; r_t – це загальна кількість відповідей для всіх піків на хроматограмі.

Вміст капреоміцину І має становити не менше 90,0% [79].

6. Кількісне визначення компонентів капреоміцину та споріднених речовин

Визначають методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) [79].

Метод ВЕРХ розділяє різні споріднені сполуки в субстанції капреоміцину відповідно до їхньої спорідненості до ліпофільної нерухокої фази. На отриманій хроматограмі вміст кожної сполуки пропорційний площі відповідного піку.

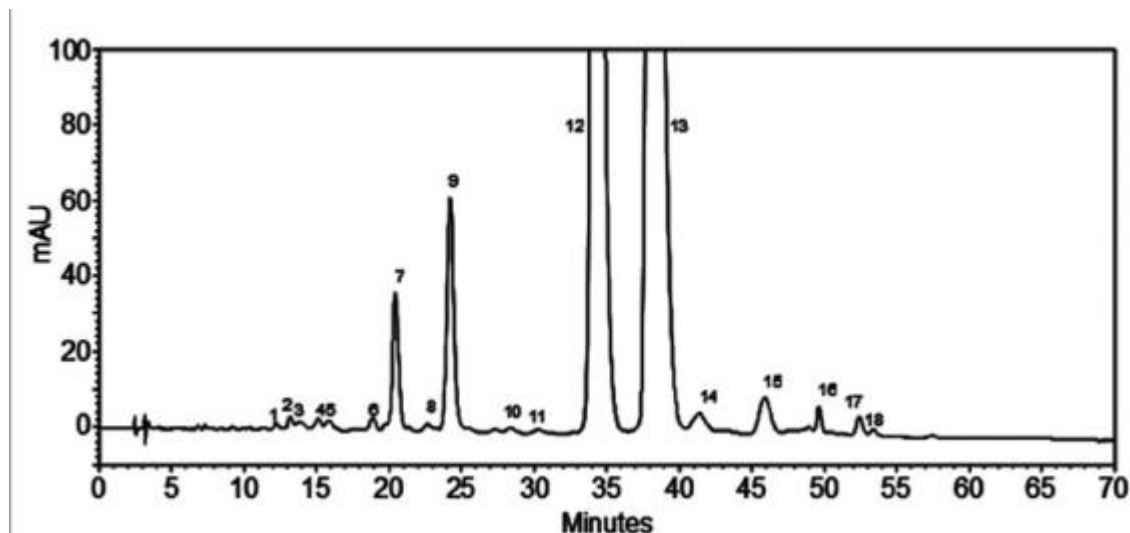


Рис. 8.2. Типова хроматограма, що демонструє поділ чотирьох основних компонентів субстанції капреоміцину (7, 9, 12 і 13) та споріднених речовин [79].

Споріднені речовини: площі піків відповіді для домішок порівнюються з площами основних піків для капреоміцину ІА, ІВ, ІІА та ІІВ;

Допустимі межі:

- Всі домішки $\leq 2\%$
- Окрема домішка 1 - 2 %
- Сума всіх домішок: $\leq 7\%$ [79].

7. Токсичність

Токсичність антибіотика перевіряють на експериментальних тваринах, яким у певний період внутрішньовенно, внутрішньом'язово або внутрішньоочеревинно вводять різні дози антибіотика. За тваринами ведуть ретельне спостереження. При відсутності зовнішніх змін у поведінці тварин протягом 12-15 діб вважають, що антибіотик не має помітної токсичної дії. Для більш глибокого дослідження цієї властивості з'ясовують вплив препарату на окремі тканини і органи тварин [80].

8.7. Біологічна дія капреоміцину

Мінімальна інгібуюча концентрація

Випробування на антимікробну дію капреоміцину можна провести методом мінімальної інгібуючої концентрації [81].

Клінічні ізоляти збудників туберкульозу перевіряють на чутливість до антимікробних засобів. Бактерії на культуральному середовищі переносять в бульйон Мюллера-Хінтона (САМНВ) з додаванням 0,02% Твін 80 з регулюванням вмісту катіонів.

Суспензію енергійно перемішують мішалкою протягом 1 хвилини для досягнення однорідного диспергування бактерій.

Потім суспензію розбавляють до щільності 0,5 стандарту МакФарланда. Готують остаточний інокулят (з щільністю мікроорганізмів приблизно $5 \cdot 10^5$ КУО/мл) з використанням середовища САМНВ з додаванням 5% ростової добавки OADC. Суспензію бактерій додають до 96-лункових планшетів, що містять відповідні 2-кратні розведення антимікробних агентів.

Планшети інкубують за температури 37°C, яка є оптимальною для досліджуваного збудника, протягом 24 год. Після інкубування проводять візуальний огляд лунок планшету.

Значення мінімальної інгібуючої концентрації капреоміцину становить ≥ 16 мкг/мл [81].

Метод дифузії в агар

Чутливість мікроорганізмів до антибіотиків зручно визначати за допомогою готових паперових дисків, просочених певними антибіотиками. Концентрація антибіотиків у дисках підібрана з таким розрахунком, щоб діаметри зон затримки росту стандартних тест-організмів становили 28 - 32 мм [82].

1. Досліджувані мікроорганізми вирощують на відповідному щільному живильному середовищі.

2. Готують однорідну суспензію клітин у стерильній водопровідній воді. В 1 мл суспензії повинно міститися близько 2 млрд. клітин (визначають за стандартом мутності).

3. Вносять 1 мл суспензії в пробірку з 20 мл стерильного розплавленого і остудженого до 50°C агаризованого середовища, наприклад МПА. Якщо мікроорганізми вирощували в рідкому живильному середовищі, то в агар вносять відповідний обсяг культури.

4. Вміст пробірки швидко і ретельно перемішують і виливають у стерильну чашку Петрі. Коли середовище застигне, на його поверхню поміщають паперові диски на рівній відстані один від одного і на 1,5 - 2,0 см від краю чашки.

5. Чашки витримують 2 год. при кімнатній температурі для кращої дифузії антибіотиків у товщу агаризованого середовища, а потім 24 год. при 28 – 30°C.

6. Якщо досліджувані мікроорганізми чутливі до даних антибіотиків, то навколо дисків утворюються зони відсутності росту. Діаметр зони вимірюють міліметровою лінійкою. Зона більше 30 мм свідчить про високу чутливість мікроорганізму до антибіотика, а менше 12 мм - про слабку чутливість [82].

РОЗДІЛ 9. ПЕРСПЕКТИВИ ВПРОВАДЖЕННЯ СИСТЕМИ ЕКОЛОГІЗАЦІЇ ВИРОБНИЦТВА КАПРЕОМІЦИНУ

Під час біотехнологічного виробництва утворюються відходи, які не використовуються далі. Ці відходи можуть бути рідкими, газоподібними або твердими. Важливо правильно їх знешкоджувати та утилізувати, адже вони можуть бути небезпечними для людей, тварин та навколишнього середовища.

9.1. Система знешкодження рідких відходів

Рідкі відходи під час виробництва капреоміцину за допомогою *Streptomyces capreolus*:

- відпрацьованих залишків мийних і дезінфікуючих засобів;
- відпрацьованої води для ополіскування обладнання.

9.1.1. Розрахунки об'ємів стічних вод

Залишки мийно-дезінфікуючих засобів

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

$$V_{\text{ємностей}} = V_{\text{реактор}} + V_{\text{інокулятор}} + V_{\text{реактор}} + V_{\text{інокулятор}} + V_{\text{реактор}} + V_{\text{ферментер}} = \\ = 18,2 + 30 + 182 + 300 + 1820 + 3000 = 5350,2 \text{ л}$$

$$V_{\text{засобів}} = 5350,2 \times 0,2 = 1070,04 \text{ (1070) л}$$

$$V_{\text{засобів}} = 5350,2 \times 0,3 = 1605,06 \text{ (1605) л}$$

Припускаємо, що об'єм відпрацьованих залишків засобів дорівнює об'єму цих засобів, тобто 1070 – 1605 л.

					НУХТ БТЕК 04.01.30 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Пашко А.О.			РОЗДІЛ 9. Перспективи впровадження системи екологізації виробництва капреоміцину	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Сулейко Т.Л.					87	7
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Відпрацьована вода після ополіскування обладнання. Об'єм води для ополіскування, так само як і мийно-дезінфікуючого розчину, становить 20-30% від об'єму ємнісного обладнання.

Як і розраховано вище, цей параметр дорівнює 1070 – 1605 л. Таким чином, у сумі орієнтовна кількість стічних вод за один цикл виробництва становитиме: $1605 + 1605 = 3210$ л.

Відповідно до розрахунків за один цикл отримуємо 1800 л культуральної рідини, з концентрацією кінцевого продукту 3 г/л (0,003 кг/л):

$$\text{Тобто } 1800 \times 0,003 = 5,4 \text{ кг}$$

Оскільки основна частина культуральної рідини є вода, то $1800 - 5,4 = 1794,6$ л

Таким чином, за один виробничий цикл отримуємо 5,4 кг кінцевого продукту та 1794,6 л води.

Отже, на 1 тону готової продукції, утворюється така кількість стічних вод:

$$(1000 \times 1794,6) / 5,4 = 332\,333,33 \text{ л}$$

9.1.2. Середні витрати стічних вод від виробництва

Для розрахунку виробничих стічних вод візьмемо до уваги дані техніко-економічного обґрунтування.

Потужність виробництва становить 144,3 кг капреоміцину за 200 робочих днів.

Кількість трудоднів прийнято за 200, тоді об'єм культуральної рідини за добу становить:

$$V_d = V_{кр} / T_{рд} = 53\,444 / 200 = 267,2 \text{ л}$$

Тоді,

$$Q_e = q_e \times n;$$

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

$$Q_e = 50 \times 267,2 \approx 13360 \text{ л/доба.}$$

Середні за зміну витрати побутових стічних вод становлять:

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

де q_n – норма відведення побутових стічних вод в л/зм на одного робітника (приймаємо для виробничого цеху 0,025 м³/зм люд); N – кількість робітників, що працюють у зміну, приймаємо 5:

- Особа, яка відповідає за процес культивування, збирання та очищення біомаси з ферментера, має посаду технолога цеху (біотехнолога).
- Особа, що відповідає за контроль якості на різних етапах виробництва та забезпечує виконання стандартів GMP і вимог регулюючих органів, має посаду мікробіолога ВКЯ (відповідального за контроль якості).
- За обслуговування та ремонт обладнання в разі необхідності відповідає технік з обслуговування та ремонту обладнання.
- Особа, яка керує роботою всіх працівників на зміні та вирішує питання, пов'язані з виробництвом біомаси бактерій, має посаду керівника зміни.
- Забезпечення дотримання правил санітарної гігієни та чистоти в цеху, включаючи підготовку приміщень, дезінфекцію обладнання та контроль за особистою гігієною працівників, відповідає санітарному робітнику.

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

Середні за добу витрати побутових стічних вод становлять:

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

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

Загальна за добу витрата атмосферних стічних вод становлять:

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

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

$$Q = Q_e + Q_n + Q_a = 13360 + 375 + 25 = 13760 \text{ л/добу.}$$

9.1.3. Система очищення стічних вод

Згідно літературних даних, перспективним напрямком очищення стічних вод є використання активного мулу. Даний метод є економічно та екологічно вигідним.

Так, винахід [83] стосується біологічного очищення стічних вод і може бути використаний для очистки побутових та промислових стічних вод, які надходять від житлових, суспільних або інших споруд, не під'єднаних до централізованої системи каналізації. Локальна установка біологічної очистки стічних вод містить корпус із каналами підведення та відведення рідини та послідовно розміщеними у вигляді переливного каскаду блоками анаеробного біореактора, аеробного біореактора, біореактора доочищення. При цьому блок анаеробного біореактора та блок біореактора доочищення забезпечені носіями прикріпленої мікрофлори, крім того, установка містить пристрої рециркуляції активного мулу між блоками. Блок анаеробного біореактора виконаний у вигляді двох гідравлічно з'єднаних камер, забезпечених можливістю циркуляції між ними рідини, одна з камер містить великобульбашковий аератор, а інша - носій прикріпленої мікрофлори, блок аеробного біореактора складається із послідовно розміщених принаймні двох камер із аераторами, остання з яких виконана із зоною попереднього відстоювання, обмеженою щонайменше одним похилим ребром. Крім того установка додатково містить примусові засоби послідовної подачі рідини від камери до камери блока аеробного біореактора, та від останньої камери блока аеробного біореактора до блока біореактора доочищення [83].

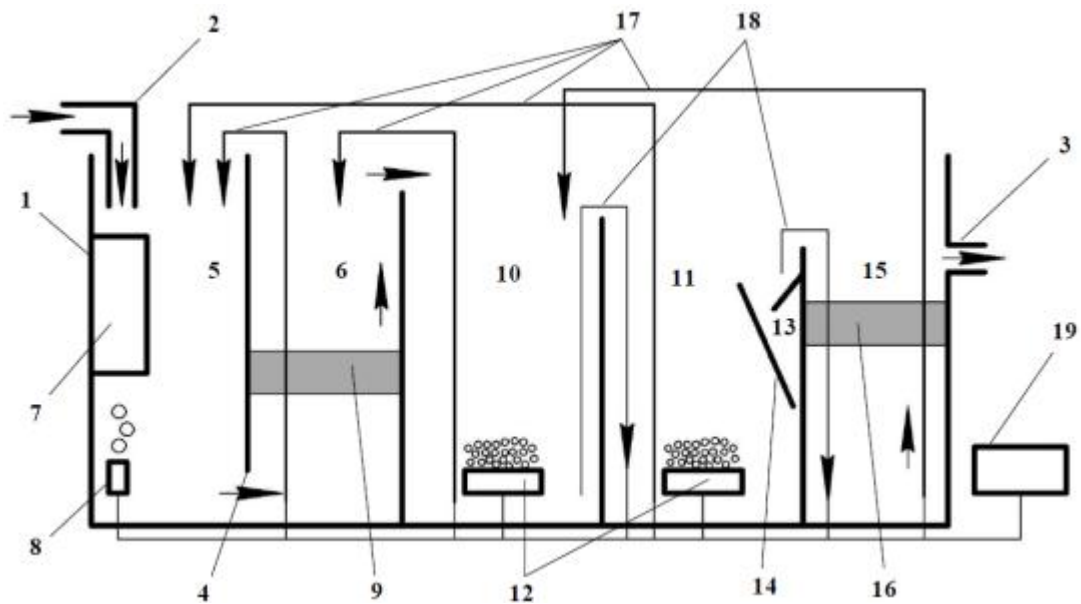


Рис. 9.1. Установа очищення стічних вод [83].

В основу локальної установки для ефективної глибокої біологічної очистки стічних вод поставлена її робота в умовах критичної нерівномірності потрапляння вод на установку та забезпечення безперервного функціонування установи в автономному режимі та в умовах нестабільного електропостачання [83].

Локальна установка для біологічної очистки стічних вод, що містить корпус 1 із каналом підведення 2 стічних вод, каналом відведення 3 очищеної рідини та послідовно розміщеними у вигляді переливного каскаду блоками анаеробного біореактора, аеробного біореактора, біореактора доочищення.

Блок анаеробного біореактора виконаний у вигляді двох гідравлічно з'єднаних, наприклад, за допомогою придонного каналу 4, камер 5, 6. В одній із камер 5 встановлено корзинууловлювач 7 для відокремлення нерозчинних відходів та великобульбашковий аератор 8 для подрібнення крупних розчинних відходів. Інша камера 6 виконана із носієм прикріпленої мікрофлори 9, наприклад, у вигляді сітчастого біологічного завантаження. Блок аеробного біореактора виконаний із послідовно розміщених принаймні двох камер 10, 11 із аераторами 12. При цьому в оптимальному виконанні установи, в камерах 10,11 блока аеробного біореактора використані SBR-реактори. На рис. 5.1 представлена установка із мінімальною кількістю камер

блока аеробного біореактора. В цьому випадку останньою, при послідовному розміщенні камер є камера 11. Тому ця камера 11 виконана із зоною попереднього відстоювання 13, обмеженою щонайменше одним похилим ребром 14. Блок біореактора доочищення 15 забезпечений носіями 16 прикріпленої мікрофлори та каналом відведення з очищеної рідини.

Установка забезпечена пристроями 17 рециркуляції активного мулу між камерами блоків анаеробного біореактора, аеробного біореактора та біореактора доочищення 15. Крім того, установка додатково містить примусові засоби 18 послідовної подачі рідини від камери до камери блока аеробного біореактора, та від останньої камери 13 блока аеробного біореактора до блока біореактора доочищення 15. Як пристрій рециркуляції активного мулу та примусовий засіб подачі води використаний ерліфт.

Установка забезпечена програмно-апаратним модулем 19, який за часовим циклом керує усіма режимами та процесами роботи шляхом вмикання або вимикання компресора, аераторів 8, 12, пристроїв перекачування рідини 17, 18, і не вимагає додаткового втручання з боку обслуговуючого персоналу або споживача [83].

9.2. Система знешкодження газоподібних відходів

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

- отримання посівного матеріалу в інокуляторах 30 та 300 л та ферментері 3 м³.

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

1. В інокуляторі 30 та 300 л, робочий об'єм $18,2+182=200,2$ л, отже аераційного повітря потрібно 21 л/хв, тобто $21 \times 200,2=4204,2$ л/год.

Процес отримання посівного матеріалу займає 76 год, для цього необхідно $76 \times 4204,2=319519,2$ л аераційного повітря на виробничий цикл.

2. В ферментері 3000 л, робочий об'єм 1820 л, отже аераційного повітря потрібно 1138 л/хв, тобто $1138 \times 1820 = 2071160$ л/год. Процес отримання посівного матеріалу займає 144 год, для цього необхідно $144 \times 2071160 = 298\,247\,040$ л аераційного повітря на виробничий цикл. У сумі $319519,2 + 298\,247\,040 = 298\,566\,559,2$ л відпрацьованого повітря на цикл.

В сучасній літературі представлено патент, присвячений розробці пристрою для очищення повітря [84].

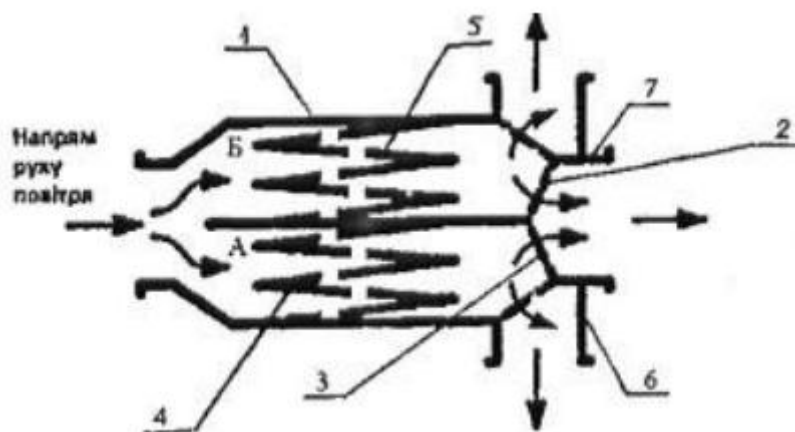


Рис. 9.2. Пристрій для очищення повітря, містить корпус та фільтрувальний елемент [84].

В основу даної корисної моделі поставлено задачу створити такий пристрій для очистки повітря, в якому введенням нових елементів, нового виконання відомих елементів та зв'язків між ними, забезпечувалось би підвищення ступеня очистки повітря та безперервність роботи пристрою при двох фільтруючих елементах.

Поставлена задача вирішується тим, що пристрій для очищення повітря, що містить корпус та фільтрувальний елемент, згідно з корисною моделлю, містить додатковий фільтрувальний елемент, корпус включає дві секції, а кожна секція має клапан, закріплений на її вигляді.

Значними перевагами є те, що введення клапанів та додаткового фільтрувального елемента забезпечує безперервність роботи пристрою та підвищує ступінь очистки повітря і техніко-економічні показники [84].

Пристрій для очищення повітря містить корпус 1 з секціями А і Б, клапан 2 секції Б, клапан 3 секції А, фільтрувальний елемент 4 розміщений всередині секції А, фільтрувальний елемент 5 розміщений всередині секції Б, повітропровід чистого повітря 6 та повітропровід забрудненого повітря 7. Фільтрувальні елементи виконані у вигляді прямокутних рамок 8, які прилягають один до одної боковими ребрами і покриті фільтрувальним матеріалом 9.

Пристрій для очищення повітря працює таким чином. Забруднене повітря парами вуглеводів з вентиляційними викидами поступає в пристрій для очистки повітря. За допомогою клапанів 2 і 3 кожна секція поперемінно підключається або до повітропроводу чистого повітря 6, або до повітропроводу забрудненого повітря 7. Коли клапан 2 закритий, а клапан 3 відкритий, основна маса (90 %) вентиляційного повітря проходить крізь фільтрувальний елемент 4 секції А.

Речовини, що забруднюють повітря, надходять в повітропровід забрудненого повітря 7, а після насичення фільтрувального елемента 4 секції А клапани 2 і 3 переключаються таким чином, що секція А підключається до повітропроводу забрудненого повітря 7, а секція Б до повітропроводу чистого повітря 6. На очищення працює секція Б, а секція А регенерується. При регенерації крізь фільтрувальний матеріал 9 пропускається електричний струм, за рахунок чого процес десорбції зрівнюється з тривалістю процесу адсорбції [84].

9.3. Система знешкодження твердих відходів

Деякі тверді відходи представлені брудом, який накопичується на фільтрах під час процесів виробництва.

Оскільки на фільтрах можуть залишатися клітини продуценту та інші забруднення, використані фільтри піддаються спеціальній обробці в автоклаві.

Цей процес сприяє ефективній утилізації відходів шляхом знезаражування від біологічно небезпечних відходів, що забезпечує дотримання стандартів безпеки і гігієни [85].

Непридатні хімічні реактиви вимагають особливих заходів зберігання та утилізації. Рекомендується їх зберігати в окремо виділеній шафі, а потім передавати для утилізації спеціалізованим організаціям, що відповідають за відновлення та поводження з небезпечними хімічними речовинами згідно з вимогами технологічних стандартів.

Інші тверді відходи, такі як пакувальні матеріали та скло, слід збирати в окремі контейнери з кришками для подальшої передачі на переробку до пунктів вторинної сировини. Цей процес забезпечує ефективне використання ресурсів та допомагає знизити негативний вплив на довкілля [85].

ЛІТЕРАТУРА

1. Голка Г. Г. Сучасний підхід до лікування туберкульозного спондиліту (огляд літератури) / Г. Г. Голка, В. В. Веснін, В. В. Бурлака, А. О. Олійник, О. Г. Фадєєв, О. В. Гопцій // Травма. - 2023. - Т. 24, № 1. - С. 72-78.
2. Maus, C. E., Plikaytis, V. B., & Shinnick, T. M. (2005). Mutation of tlyA confers capreomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(2), 571–577. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.2.571-577.2005>.
3. Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury [Internet]. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; 2012-. Capreomycin. [Updated 2021 Sep 20]. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548641> .
4. PubChem. Capreomycin [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Capreomycin> .
5. Ali, W., Jamal, S., Grover, A., & Grover, S. (2022). Insights into the mutations leading to capreomycin resistance in S-adenosyl-L-methionine binding motif in TlyA from *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of biomolecular structure & dynamics*, 40(22), 12239–12247. <https://doi.org/10.1080/07391102.2021.1969284>.
6. КАПРЕОМІЦИН Інструкція для застосування [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://mozdocs.kiev.ua/likiview.php?id=3236> .
7. Mu Wang for the degree of Master of Science in Chemistry “Studies on the Biosynthesis of Capreomycin” - 1993. 15, 45-46 p.
8. Lea, M.L., Wigley, L. & Hobbs, G. (2006) Development of a quantifiable method for the determination of culture viability of *Streptomyces capreolus*. *Genetics of Industrial Microorganisms*, 10th International Symposium, Prague, Czech Republic. (49, 77, 85 p.). [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://researchonline.ljmu.ac.uk/id/eprint/5869/1/446359.pdf>
9. Глюкоза (декстро́за) харчова [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://prom.ua/ua/p183020259-glyukoza-dekstroza-pishevaya.html>

10. Пептон ферментативний [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://prom.ua/ua/p2078708599-pepton-fermentativnij.html?&primelead=Mi4x> .

11. Пептон ферментативний [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://flagma.ua/uk/pepton-fermentativniy-o13623154.html>

12. Патока тростинна меляса [Електронний ресурс.] Режим доступу: <https://www.olx.ua/d/uk/obyavlenie/patoka-trostonkovaya-melassa-melyasa-1kg-1-ya-stepen-peregonki-IDMaEsq.html> .

13. Крохмаль картопляний вищий гатунок [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://prom.ua/ua/p1121911147-krahmal-kartofelnyj.html>

14. CaCO₃, Карбонат Кальція 99.99% [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://flagma.ua/uk/caco3-karbonat-kalciya-99-99-o8778043.html>

15. Сульфат магнію фарм. Klebrig 1кг Сіль Епсوما для ванн [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://klebrig.com.ua/ua/p1323818049-sulfat-magniya-klebrig.html>

16. Кальцій хлористий ТМ Клебріг 1 кг Харчова добавка Е 509 [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://klebrig.com.ua/ua/p1179966495-kaltsij-hloristyj-klebrig.html?source=merchant_center&utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=Perf_Max-Turboweb&gad_source=1&gclid=CjwKCAiAq4KuBhA6EiwArMAw1MFHitEYTZ3my2IsXBTPHBuzCwWk6egei19CN928sqVQt7LGMk46ZxoC6h8QAvD_BwE

17. ГИДРОЛИЗИРОВАННЫЙ КОЛЛАГЕН GELITA ГЕРМАНИЯ (300 ГРАММ) [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://sporthavka.com.ua/ru/pitanie-dlya-sustavov/1299-svinnoj-kollagen-gelita-germaniya-300-gramm?gad_source=1&gclid=CjwKCAiAq4KuBhA6EiwArMAw1BSy5rifpkXdfSKnKfrMC3k3rJhgH9Q6LBmSSFMi-ur3MAFSnUX8xRoCpQsQAvD_BwE .

18. Глюкозный сироп ИГ-42 и свекловичная меласса, недорого, оптом Киев [Електронний ресурс]. Режим доступу:

<https://www.olx.ua/d/uk/obyavlenie/glyukoznyy-sirop-ig-42-i-sveklovichnaya-melassa-nedorogo-optom-kiev-IDRzKwc.html> .

19. Sodium edetate [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.chemicalbook.com/Price/Sodium-edetate.htm>

20. Glycolic Acid Powder Cosmetic Raw Materials 99% Glycolic Acid [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.alibaba.com/product-detail/Glycolic-Acid-High-Molecular-Polyglycolic-Acid_1600796035562.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal_offer.d_title.4f0d5548hFfBSt

21. Пирог, Т.П. Загальна мікробіологія: підручник, 2-е вид., доп. і перероб. / Т.П. Пирог. – К. :НУХТ, 2010. – 632 с.

22. Любінець О. В. Правове регулювання протитуберкульозних заходів в Україні. Медичне право України: проблеми становлення та розвитку: матеріали 1-ї Всеукраїнської наук.-практ. конф. 2007. С. 190.

23. Жавріченко К. В. Туберкульоз легень як глобальна проблема усього світу / К. В. Жавріченко // Медсестринство. – 2019. – № 3. – С. 17-21.

24. ЗАГАЛЬНІ ПІДХОДИ ДО ПРОФІЛАКТИКИ ТУБЕРКУЛЬОЗУ канд.мед.наук Л.М. Циганкова [Електронний ресурс]. Режим доступу: [http://www.ifp.kiev.ua/doc/people/tubprof.htm#:~:text=%D0%9D%D0%B0%D0%B9%D0%B4%D1%96%D1%94%D0%B2%D1%96%D1%88%D0%B8%D0%BC%20%D0%BC%D0%B5%D1%82%D0%BE%D0%B4%D0%BE%D0%BC%20%D1%81%D0%BF%D0%B5%D1%86%D0%B8%D1%84%D1%96%D1%87%D0%BD%D0%BE%D1%97%20%D0%BF%D1%80%D0%BE%D1%84%D1%96%D0%BB%D0%B0%D0%BA%D1%82%D0%B8%D0%BA%D0%B8%20%D1%82%D1%83%D0%B1%D0%B5%D1%80%D0%BA%D1%83%D0%BB%D1%8C%D0%BE%D0%B7%D1%83,%D0%91%D0%A6%D0%96\)%%20%D1%81%D1%83%D1%85%D1%83%20%D0%B4%D0%BB%D1%8F%20%D0%B2%D0%BD%D1%83%D1%82%D1%80%D1%96%D1%88%D0%BD%D1%8C%D0%BE%D1%88%D0%BA%D1%96%D1%80%D0%BD%D0%BE%D0%B3%D0%BE%20%D0%B2%D0%B2%D0%B5%D0%B4%D0%B5%D0%BD%D0%BD%D1%8F](http://www.ifp.kiev.ua/doc/people/tubprof.htm#:~:text=%D0%9D%D0%B0%D0%B9%D0%B4%D1%96%D1%94%D0%B2%D1%96%D1%88%D0%B8%D0%BC%20%D0%BC%D0%B5%D1%82%D0%BE%D0%B4%D0%BE%D0%BC%20%D1%81%D0%BF%D0%B5%D1%86%D0%B8%D1%84%D1%96%D1%87%D0%BD%D0%BE%D1%97%20%D0%BF%D1%80%D0%BE%D1%84%D1%96%D0%BB%D0%B0%D0%BA%D1%82%D0%B8%D0%BA%D0%B8%20%D1%82%D1%83%D0%B1%D0%B5%D1%80%D0%BA%D1%83%D0%BB%D1%8C%D0%BE%D0%B7%D1%83,%D0%91%D0%A6%D0%96)%%20%D1%81%D1%83%D1%85%D1%83%20%D0%B4%D0%BB%D1%8F%20%D0%B2%D0%BD%D1%83%D1%82%D1%80%D1%96%D1%88%D0%BD%D1%8C%D0%BE%D1%88%D0%BA%D1%96%D1%80%D0%BD%D0%BE%D0%B3%D0%BE%20%D0%B2%D0%B2%D0%B5%D0%B4%D0%B5%D0%BD%D0%BD%D1%8F)

25. Lin, Y., Li, Y., Zhu, N., Han, Y., Jiang, W., Wang, Y., Si, S., & Jiang, J. (2014). The antituberculosis antibiotic capreomycin inhibits protein synthesis by disrupting interaction between ribosomal proteins L12 and L10. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 58(4), 2038–2044. <https://doi.org/10.1128/AAC.02394-13>
26. ЦЕНТР ГРОМАДСЬКОГО ЗДОРОВ'Я МОЗ УКРАЇНИ СТАТИСТИКА З ТУБЕРКУЛЬОЗУ [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://phc.org.ua/kontrol-zakhvoryuvan/tuberkuloz/statistika-z-tb>
27. Протитуберкульозні засоби [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://doctorthinking.org/2021/10/antituberculosis/>
28. КАПРЕОМІЦИН (CAPREOMYCINUM) [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://compendium.com.ua/uk/akt/67/714/capreomycinum/>
29. Grund, E., and Kroppenstedt, R.M. (1989) Transfer of five Nocardiosis species to the genus Saccharothrix Labeda et al. *Syst. Appl. Microbiol.* 12, 267-274.
30. KEGG Glycolysis / Gluconeogenesis - Streptomyces coelicolor [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.kegg.jp/pathway/map=sco00010&keyword=>
31. Красінько В.О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобув. освіт. ступ. «бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» освіт.-проф. програми «Біотехнологія» ден. і заоч. форм навч. / В.О. Красінько. – К.: НУХТ, 2019. – 252 с. (124-126, 144 с.)
32. Основи проектування біотехнологічних виробництв [Електронний ресурс]: метод. рекомендації до викон. курс. проекту для здобувачів вищої освіти освіт. ступ. «бакалавр» спец.162 ««Біотехнології та біоінженерія» осв.-проф. прогр. «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна» ден. форми навч./ уклад. Т.П. Пирог, Ю.В. Карлаш, В.О. Красінько. – К.: НУХТ, 2022. – 79 с.
33. Конспект лекцій з дисципліни «Асептика біотехнологічних виробництв» освітньо-професійної програми другого (магістерського) рівня

вищої освіти зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» усіх форм навчання / Укл.: Головей О.П. , Гуляєв В.М. – Кам'янське, ДДТУ, 2017 р., 140 с.

34. «Квікцид» - дезінфекційний засіб для рук та поверхонь+дозатор. . [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://pestco.com.ua/ua/products/kviktsid-dezinfektsiyniy-zasib-dlya-ruk-ta-poverhon.html>

35. Додаток 1 до наказу МОЗ України від 08 квітня 2021 року № 660 «Про державну реєстрацію (перереєстрацію) дезінфекційних засобів» [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.apteka.ua/article/596107>

36. ІНСТРУКЦІЯ щодо застосування засобу «Санабриз Е» з метою дезінфекції [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://www.xn--80aaolbmrsqie.com.ua/upl/admin_upload/dana/sanabriz.pdf

37. Інструкція щодо застосування засобу "КВІКЦИД" з метою антисептичної обробки шкіри рук та шкірних покривів, екстреної дезінфекції (термінового знезараження) інструментів, виробів, невеликих поверхонь [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://www.xn--80aaolbmrsqie.com.ua/upl/admin_upload/dana/kvikcid.pdf

38. БІОМОЙ МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ (ІНСТРУКЦІЯ ПО ЗАСТОСУВАННЮ) [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://dezmed.com.ua/instruktsiia/item/biomoj-metodicheskie-rekomendatsii-instruktsiya-po-primeneniyu/>

39. ІНСТРУКЦІЯ із застосування засобу «Новохлор-екстра» на промислових підприємствах з метою дезінфекції і миття [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://interdez.com.ua/wp-content/uploads/2020/06/Instructions-Novohlor-Extra-Food-2019-uk.pdf>

40. Красінько В.О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобув. освіт. ступ. «бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та

біоінженерія» освіт.-проф. програми «Біотехнологія» ден. і заоч. форм навч. / В.О. Красінько. – К.: НУХТ, 2019. – 252 с.

41. Нормативне забезпечення біотехнологічних виробництв [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобув. освіт. ступ. «бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» освіт.-проф. програми «Біотехнологія» ден. і заоч. форм навч. / Т. П. Пирог, В.О. Красінько, С. О. Старовойтова – К.: НУХТ, 2022. – 56 с.

42. Вентилятор даховий ВКР(ВДР) №5 2,2 кВт 1000 об/хв [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://khvent.com.ua/ua/p1472031809-ventilyator-kryshnyj-vkr.html?source=merchant_center&gclid=EAIaIQobChMI6oWKz5avggMVI5aDVx0qMQLMEAQYCCABEgI_2PD_BwE

43. Фільтрувальний матеріал очищення повітря G4, 20 мм [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://aff.in.ua/ua/p1178996009-filtruyuschij-material-ochistki.html>

44. Компресор масляний повітряний Tesla Weld AIR 500 [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://ua.teslaweld.com/kompressor-tesla-weld-air-500?did=504287397&gclid=EAIaIQobChMIm7Km3pivggMVcpKDBx1ciAGBEAQYAiABEgK1JvD_BwE&_ga=2.29640375.908367123.1699267507-1310908738.1698847746&_gac=1.217910818.1699267507.EAIaIQobChMIm7Km3pivggMVcpKDBx1ciAGBEAQYAiABEgK1JvD_BwE

45. ВОДЯНИЙ ОХОЛОДЖУВАЧ SWC 90-50/3 [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://teko-ua.com/ua/vodyanoj-oxladitel-swc-90-503.html?gclid=EAIaIQobChMIobzk35mvggMVp4CDBx1yzAYPEAQYAiABEgIjsfD_BwE

46. РЕСИВЕР ПІД ТИСКОМ СТИСНУТОГО ПОВІТРЯ 200 L, ВЕРТИКАЛЬНИЙ, 15 БАР, СТАЛЕВИЙ, КР-200-15 [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://pneumatyka.com.ua/products/zbiornik-sprezonego-powietrza-200l-15bar/>

47. Водяний нагрівач Aerostar SWH 50-30/3R [Електронний ресурс].
Режим доступу: [https://www.moystroy.com.ua/product/vodyanyj-nagrivach-aerostar-swh-50-30-3r/?gclid=EAIaIQobChMIja-](https://www.moystroy.com.ua/product/vodyanyj-nagrivach-aerostar-swh-50-30-3r/?gclid=EAIaIQobChMIja-A2savggMVGK13Ch2y9ABjEAQYBiABEgJGwPD_BwE)

[A2savggMVGK13Ch2y9ABjEAQYBiABEgJGwPD_BwE](https://www.moystroy.com.ua/product/vodyanyj-nagrivach-aerostar-swh-50-30-3r/?gclid=EAIaIQobChMIja-A2savggMVGK13Ch2y9ABjEAQYBiABEgJGwPD_BwE)

48. Панельний фільтр тонкої очистки Jablotron F7 [Електронний ресурс].
Режим доступу: <https://shop.alterair.ua/product/jablotron-f7-filter/>

49. Розливний дозатор для рідини від 2 мл. до 5 л. [Електронний ресурс].
Режим доступу: https://fimaks-ltd.com.ua/p26465530-rozlivnij-dozator-dlya.html?source=merchant_center

50. Скляний реактор із сорочкою S212 об'єм 10 літрів, реакційний котел [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://prom.ua/ua/p1445439783-steklyannyj-reaktor-rubashkoj.html?utm_source=google_product&utm_medium=cpc&utm_content=pl_a&utm_campaign=KT_cpc_1&gclid=EAIaIQobChMI3cmfw8qvggMVVZjVCh2xAg6VEAQYBiABEgJib_D_BwE

51. Ваги електронні технічні CAS AD-10 (НГЗ: 10 кг, d=2г) [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://unipro.com.ua/ua/vagy-elektronni-tehnichni-cas-ad-10--ngz--10-kg--d-2g/>

52. Перистальтичний насос SEKO KRONOS KRFM0210M6000, 10 л/год, 2 бар, SEKOMED tube [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://dosingtech.com.ua/uk/product/peristaltichnij-nasos-seko-kronos-krfm0210m6000-10-1-god-2-bar-sekomed-tube/>

53. Фільтри тонкої очистки повітря (ФТОП, НЕРА, ХЕПА) [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://ventfilter.kiev.ua/goods/filtr-tonkoy-ochistki-vozdruha-ftov-hepa-hepa/>

54. Мобільний реактор РСГ-30 для м'яких лікарських форм [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://promvit.com.ua/mobilnyj-mazevoj-reaktor-30-1-rsg-30/>

55. Хімічний Реактор 100 л. герметичний з мішалкою та масляною сорочкою з температурою плавлення до 200 град. С [Електронний ресурс].

Режим доступу: <https://stprom.com.ua/ua/p1720299542-himicheskij-reaktor-100.html>

56. Насос відцентровий JET100 1.1 квт [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://santexcentr.com.ua/ua/p1409898394-nasos-tsentrobezhnyj-jet100.html?source=merchant_center&gclid=EAIAIQobChMIwIat64GyggMVJT0GAB2D0gvhEAQYGCABEgLEwPD_BwE

57. Лабораторний реактор РП-5 для МЛФ (креми, мазі, гелі) 5 л [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://promvit.com.ua/laboratoryj-reaktor-rp-5-dlya-mlf-kremy-mazi-geli-5-l/>

58. Реактор для сироваріння 300 л AISI 304 [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://agrovektor.com/ua/physical_product/1277754-reaktor-dlya-syrovareniya-300-l-aisi-304.html

59. Ваговий дозатор ФС-125+ [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://tmsukraine.com.ua/ua/p1345448684-vesovoj-dozator-125.html>

60. Реактор 1000 л для приготування шампуню з двома мішалками СС-1000. Виробництво рідких миючих засобів [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://promvit.com.ua/reaktor-1000-l-dlya-prigotovleniya-shampunya-s-2-myа-meshalkami/>

61. Реактор KFT 50-3 для мазей, кремів и гелей V=50 с гомогенизатором, якорной и турбинной мешалками. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://www.kft2.com.ua/reav50.html>

62. Multi-Stage Stainless Steel 3000L Industrial Fermenter [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://fermentorchina.com/en/product/multi-stage-stainless-steel-3000l-industrial-fermenter/>

63. Rutala, W. A., & Weber, D. J. (2016). Disinfection and Sterilization in Health Care Facilities: An Overview and Current Issues. *Infectious disease clinics of North America*, 30(3), 609–637. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2016.04.002>.

64. DrAnabel LEGUME INOCULANT TECHNOLOGY AND QUALITY CONTROL PROCEDURES. Murdoch University.2013. – p.7

65. Shirling, E. B., & Gottlieb, D. (1968). Cooperative Description of Type Cultures of STREPTOMYCES III. Additional Species Descriptions from First and Second Studies. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 18(4), 279–392. doi:10.1099/00207713-18-4-279.

66. GlucCell™ SYSTEM USER'S GUIDE ver 2.3 [Електронний ресурс]
Режим доступу:
<https://www.cescobio.com.tw/upload/userfiles/14593235631322967195.pdf>

67. Rajakylä, E., & Paloposki, M. (1983). Determination of sugars (and betaine) in molasses by high-performance liquid chromatography. Comparison of the results with those obtained by the classical Lane-Eynon method. *Journal of chromatography*, 282, 595–602. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(00\)91636-4](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(00)91636-4).

68. Копильчук Г.П., Николайчук І.М. Лабораторний практикум із біохімії: навч.-метод. посібник. Чернівці : Чернівець. нац. ун-т ім. Ю. Федьковича, 2019. 144 с.

69. БІОТЕХНОЛОГІЯ ТА БІОІНЖЕНЕРІЯ. ЧАСТИНА 1. ОСНОВИ БІОТЕХНОЛОГІЇ РЕКОМЕНДАЦІЇ ДО ВИКОНАННЯ ПРАКТИЧНИХ РОБІТ - Навчальний посібник - Укладачі: В. В. Мотроненко, Т. М. Луценко, Л. М. Дронько -К: КПІ, 2022. - 96 с.

70. Біотехнології та біоінженерія. Частина 1. Основи біотехнології. Рекомендації до виконання практичних робіт [Електронний ресурс] : навчальний посібник для здобувачів ступеня бакалавра, які навчаються за освітньо-професійною програмою «Регенеративна та біофармацевтична інженерія» спеціальності 163 Біомедична інженерія / КПІ ім. Ігоря Сікорського ; уклад.: В. В. Мотроненко, Т. М. Луценко, Л. М. Дронько. – Електронні текстові дані (1 файл: 1,13 Мбайт). – Київ : КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2022. – 96 с.

71. LibreTextChemistry - 2020. Liquid Chromatography [Електронний ресурс]
Режим доступу:
[https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_\(Analytical_Chemistry\)/Instrumentation_and_Analysis/Chromatography/Liqu](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_(Analytical_Chemistry)/Instrumentation_and_Analysis/Chromatography/Liqu)

[id_Chromatography#:~:text=Liquid%20chromatography%20is%20a%20technique,the%20mobile%20and%20stationary%20phases](#)

72. Mallampati, S., Huang, S., Ashenafi, D., Van Hemelrijck, E., Hoogmartens, J., & Adams, E. (2009). Development and validation of a liquid chromatographic method for the analysis of capreomycin sulfate and its related substances. *Journal of chromatography. A*, 1216(12), 2449–2455. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.01.031>.

73. Інтернет-магазин Soctrade. [Електронний ресурс] Режим доступу: https://soctrade.ua/obladnannya/perkinelmer-ukr/chromatography/ridinni-chromatography/hplc_300/

74. Sowajassatakul, A., Prammananan, T., Chairasert, A., & Phunpruch, S. (2014). Molecular characterization of amikacin, kanamycin and capreomycin resistance in M/XDR-TB strains isolated in Thailand. *BMC microbiology*, 14, 165. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-165>.

75. Rossi, C., Fardella, G., Chiappini, I., Perioli, L., Vescovi, C., Ricci, M., ... Scuota, S. (2004). UV spectroscopy and reverse-phase HPLC as novel methods to determine Capreomycin of liposomal fomulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 36(2), 249–255. doi:10.1016/j.jpba.2004.06.015.

76. Capreomycin Sulfate [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://toku-e.com/capreomycin-sulfate/>

77. *United States Pharmacopeia and National Formulary* (USP 41-NF 36). United States Pharmacopeial Convention; 2016. [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_m12358.html

78. Державна Фармакопея України : в 3 т. / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». — 2-е вид. — Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015. — Т. 1. — 1128 с.

79. Global specifications: the example of capreomycin. (2014, Fall). *WHO Drug Information*, 28(4), 431+.

80. Конспект лекцій з дисципліни „Технології біофармацевтичних препаратів” для здобувачів вищої освіти за освітньо-професійною програмою «Біотехнології та біоінженерія» першого (бакалаврського) рівня спеціальності: 162 «Біотехнології та біоінженерія» / Укл.: професор, д.т.н. Гуляєв В.М., старший викладач Філімоненко О.Ю. – Кам'янське, ДДТУ, 2019. – 156 с.

81. Zhao, X., Wang, Y., & Pang, Y. (2014). Antimicrobial susceptibility and molecular characterization of *Mycobacterium intracellulare* in China. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 27, 332–338. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.07.032>.

82. Мельничук М.Д. Загальна (промислова) біотехнологія: навчальний посібник/ М.Д. Мельничук, О.Л.Кляченко, В.В.Бородай, Ю.В.Коломієць. – Київ: ФОП Корзун Д.Ю., 2014. - 252 с.

83. Локальна установка біологічної очистки стічних вод: пат. 125355 Україна: С02F3/30 С02F11/02 С02F9/00 С02F103/00; заявл. 04.05.2020; опубл. 10.11.2021, Бюл. № 45. 6 с.

84. Пристрій для очищення повітря: пат. 101143 Україна: В01D 46/10. u 2015 02683; заявл. 24.03.2015; опубл. 25.08.2015, Бюл. № 16. 4 с.

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

ДОДАТКИ

Production of Capreomycins

A portion of a spore suspension of *S. capreolus*¹⁸ (0.25 mL) was used to inoculate a seed medium (60 mL) containing tryptone (Difco, 0.30 g), yeast extract (0.15 g), glucose (0.90 g), MgSO₄·7H₂O (0.18 g), FeSO₄·7H₂O (0.06 mg), CaCl₂·2H₂O (0.015 g) and deionized water. The pH was adjusted to 7.5 with 2% KOH before sterilization.

The flask (250 mL) was incubated at 30 °C, 250 rpm for 42 h, and a portion of the seed culture (5% v/v) was used to inoculate production medium (200 mL in 1 L

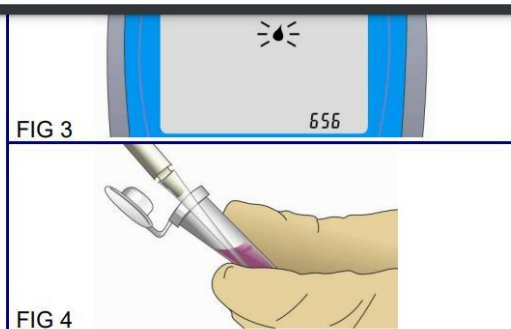
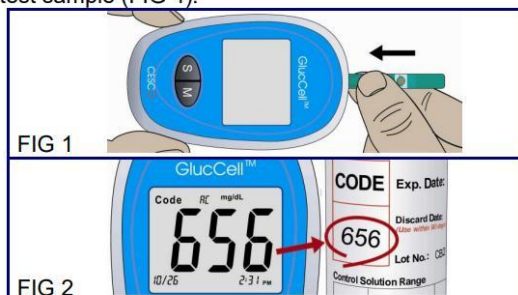
46

Erlenmeyer flask) containing glucose (5.60 g), Bactopeptone (Difco, 3.00 g), N-Z amine A (0.80 g), blackstrap molasses (purchased from local food co-op, 2.00 g), potato starch (Sigma, 2.00 g), MgSO₄·7H₂O (1.00 g), CaCO₃ (0.40 g), and hot tap water. The pH (6.5) was unadjusted. The fermentation (200 mL) was incubated at 30 °C, 250 rpm for 6 days.

Remove new test strip from vial. Be sure to tightly replace vial cap after removing test strips. Insert test strip immediately into strip slot as illustrated (FIG 1). The meter turns on automatically.

Check that the code number in the meter matches the code on the vial (FIG 2). If the two numbers match you may begin testing. Otherwise refer to above section to code your meter first.

When the drop symbol flashes (FIG 3), you are ready to perform a test. To perform the test, you need only 1.5 uL of test sample. Use a pipette tip to withdraw around 1.5 ul test sample (FIG 4).



Carefully depress to form a 1.5uL droplet on the pipette tip. Bring the droplet underneath the right or left aperture of the testing strip and touch gently to the strip, allowing the entire droplet to be wicked into the strip. (FIG 5). Please allow the sample to be absorbed naturally to fill up the confirmation window. Make sure that the sample has saturated the test confirmation window. Never push test sample over the aperture and cause overloading of the sample. When sample is applied to the strip, a line moves on the screen until measurement is completed (FIG 6). Test result will show up in 15 seconds (FIG 7). After test complete, remove the strip from meter (FIG 8), and discard the used strip safely.

The measuring range of the meter is from 20 to 600

EXPERIMENTAL

Apparatus

A Varian 5000 liquid chromatograph (Varian Aerograph, Walnut Creek, CA, U.S.A.) was used, equipped with a Rheodyne 7125 injector, 20- μ l loop, a refractive index detector (Knauer RI, type 98.00, Dr. Herbert Knauer Wissenschaftliche Geräte KG, Bad Homburg, F.R.G.), a variable-wavelength UV detector (LC 75; Perkin-Elmer, Norwalk, CT, U.S.A.) and Goerz Servogor 321 recorder (Goerz Electro, Vienna, Austria). The following columns were used: a Resolution Carbohydrate Na⁺, 150 \times 6.4 mm I.D., packed with Toyo Soda strong cation-exchange resin, 6–11 μ m; a Resolution Carbohydrate Na⁺, 300 \times 7.8 mm I.D., packed with Interaction strong cation-exchange resin, 6% cross-linked, 7–11 μ m; a Resolution Carbohydrate Ca²⁺, 250 \times 6.4 mm I.D., packed with Interaction strong-cation exchange resin, 8% cross-linked, 7–11 μ m; a Resolution ODS 5, 150 \times 4.6 mm I.D.; and a Resolution NH₂ 5, 250 \times 4.6 mm I.D.

Eluents and reagents

HPLC-grade water and acetonitrile were used. Sugar standards were purchased from E. Merck (Darmstadt, G.F.R.) and from Fluka (Buchs, Switzerland).

Reagents for total sugar measurements were prepared according to the Lane-Eynon volumetric method².

Sep-Pak C₁₈ cartridges (Waters Assoc., Milford, MA, U.S.A.), Bond-Elut ion-exchange (mixed) extraction columns (Analytichem International, Harbor City, CA, U.S.A.) and Zerolit 225 and Zerolit FF ion exchangers (Zerolit, U.K.) were used for sample pre-treatment procedures.

Sample preparation procedures

The molasses samples were mixed in a homogeniser. The samples were accurately weighed (0.5–2 g) into 100-ml volumetric flasks and diluted to the mark with deionized water. The following procedures were used: (1) the samples were filtered

through 0.22- μ m membranes; (2) the samples were passed through Sep-Pak C₁₈ cartridges; (3) the samples were passed through Bond-Elut ion-exchange (mixed) extraction columns; and (4) the samples were passed through mixed ion-exchange resin cartridges.

Chromatographic conditions and quantitation

After the sample clean-up procedures, the samples were analysed on four different HPLC columns, the column effluents being monitored with a refractive index detector. Quantitation was effected by an external standard method. The chromatographic conditions were as follows: Resolution Carbohydrate Na⁺, eluent water, flow-rate 0.4 ml/min, temperature 85°C; Resolution Carbohydrate Ca²⁺, eluent

through 0.22- μ m membranes; (2) the samples were passed through Sep-Pak C₁₈ cartridges; (3) the samples were passed through Bond-Elut ion-exchange (mixed) extraction columns; and (4) the samples were passed through mixed ion-exchange resin cartridges.

Chromatographic conditions and quantitation

After the sample clean-up procedures, the samples were analysed on four different HPLC columns, the column effluents being monitored with a refractive index detector. Quantitation was effected by an external standard method. The chromatographic conditions were as follows: Resolution Carbohydrate Na⁺, eluent water, flow-rate 0.4 ml/min, temperature 85°C; Resolution Carbohydrate Ca²⁺, eluent water, flow-rate 0.8 ml/min, temperature 85°C; Resolution ODS 5, eluent water, flow-rate 0.5 ml/min, room temperature; Resolution NH₂ 5, eluent acetonitrile-0.01 M KH₂PO₄, pH 7 (74:26), flow-rate 2.0 ml/min, room temperature.

RESULTS AND DISCUSSION

Effect of sample pre-treatment on chromatography

A very effective way of purifying molasses samples has been published^{3,4}. In addition, we have also used Sep-Pak C₁₈ cartridges, Bond-Elut ion-exchange extraction columns and membrane filtration for sample pre-treatment. Fig. 1 shows that only a good ion-exchange procedure removes all the interferences. However, there is also the danger of inverting sucrose to glucose and fructose by this procedure if ion exchange is not performed under controlled conditions (time and temperature).

differ in R₁, which is a hydroxyl in form A and hydrogen in form B.

Capreomycin sulfate is the disulfate salt of capreomycin, suitable for parenteral use [4,5] or aerosol administration (liposome formulations) [6,7]. It is a second-line antituberculosis drug used for the treatment of multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB). Capreomycin sulfate is used in combination with other antituberculosis drugs when resistance to the first-line drugs such as isoniazid, ethambutol and p-aminosalicylic acid, is developed. A sensitive CE method has been reported for the simultaneous determination of capreomycin, ofloxacin and pasiniazide in urine [8]. For the determination of the capreomycin content, a normal-phase liquid chromatographic (NP-LC) method has been described in the British Pharmacopoeia (BP) [4] and the United States Pharmacopoeia (USP) [5]. UV spectrophotometry and reversed-phase liquid chromatog-

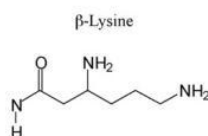
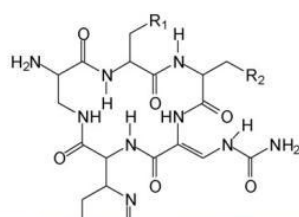
requently used in developing countries with limited capabilities, the method should not be unnecessarily complicated.

2. Experimental

2.1. Reagents and samples

Sodium 1-hexanesulfonate (HSA), phosphoric acid and potassium phosphate were purchased from Acros Organics (Geel, Belgium), sodium hydroxide from J.T. Baker (Deventer, Holland), hydrochloric acid from Chem-Lab (Zedelgem, Belgium) and hydrogen peroxide from Merck (Darmstadt, Germany). LC gradient grade acetonitrile (ACN) was purchased from Fisher Scientific (Leicester, UK). Capreomycin sulfate samples were obtained from Macleods Pharmaceuticals Limited (Daman, India) and the WHO (World Health Organization, Geneva, Switzerland). A concentration of 2 mg/mL was chosen for method development so as to detect small amounts of impurities as much as possible. The sample solution is

* Corresponding author. Tel.: +32 16 323444; fax: +32 16 323448.
E-mail address: Erwin.Adams@pharm.kuleuven.be (E. Adams).



HCl, 0.1 M NaOH and water, respectively. Oxidative stress studies were carried out at room temperature for 2 h in 3% H₂O₂. For thermal stress, the drug was kept in an oven at 100 °C for 24 h. In all conditions, the drug concentration was 2 mg/mL.

2.4. Experimental design

A robustness study was performed by means of an experimental design and multivariate analysis using Modde 5.0 software (Umet-

Abstract

Background: The emergence of multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) and extensively drug-resistant tuberculosis (XDR-TB) makes the treatment and control of tuberculosis difficult. Rapid detection of drug-resistant strains is important for the successful treatment of drug-resistant tuberculosis; however, not all resistance mechanisms to the injectable second-line drugs such as amikacin (AK), kanamycin (KM), and capreomycin (CAP) are well understood. This study aims to validate the mechanisms associated with AK, KM, and CAP resistance in *M. tuberculosis* clinical strains isolated in Thailand.

Results: A total of 15,124 *M. tuberculosis* clinical strains were isolated from 23,693 smear-positive sputum samples sent from 288 hospitals in 46 of 77 provinces of Thailand. Phenotypic analysis identified 1,294 strains as MDR-TB and second-line drugs susceptibility was performed in all MDR-TB strains and revealed 58 XDR-TB strains. Twenty-nine KM-resistant strains (26 XDR-TB and 3 MDR-TB) could be retrieved and their genes associated with AK, KM, and CAP resistance were investigated compared with 27 KM-susceptible strains. Mutation of the *rrs* (A1401G) was found in 21 out of 29 KM-resistant strains whereas mutations of *eis* either at C-14 T or at G-37 T were found in 5 strains. Three remaining KM-resistant strains did not contain any known mutations. Capreomycin resistance was determined in 28 of 29 KM-resistant strains. Analysis of *tlyA* revealed that the A33G mutation was found in all CAP-resistant strains and also in susceptible strains. In contrast, the recently identified *tlyA* mutation T539G and the novel Ins49GC were found in two and one CAP-resistant strains, respectively. In addition, our finding demonstrated the insertion of cytosine at position 581 of the *tap*, a putative drug efflux encoding gene, in both KM-resistant and KM-susceptible strains.

Conclusions: Our finding demonstrated that the majority of KM resistance mechanism in Thai *M. tuberculosis* clinical strains was *rrs* mutation at A1401G. Mutations of the *eis* promoter region either at C-14 T or G-37 T was found in 5 of 29 strains whereas three strains did not contain any known mutations. For CAP resistance, 3 of 28 CAP-resistant strains contained either T539G or Ins49GC mutations at *tlyA* that might be associated with the resistant phenotype.

Keywords: Tuberculosis, Second-line drug, Resistance, Aminoglycoside