

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

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

«До захисту в ЕК»  
Декан факультету  
Наталія ГРЕГІРЧАК  
(підпис) (ім'я та прізвище)

«\_\_» \_\_ червня 2025 р.

«До захисту допущено»  
Завідувач кафедри  
Віктор СТАБНІКОВ  
(підпис) (ім'я та прізвище)

«\_\_» \_\_ червня 2025 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА  
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»  
(код та назва спеціальності)

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

на тему: Біосинтез лотилібцину *Lysobacter sp.*

Виконав: здобувачка IV курсу, групи 1

КУЗНЄЦОВА СОФІЯ ВОЛОДИМИРІВНА

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)


Керівник КРАСІНЬКО ВІКТОРІЯ ОЛЕГІВНА  
(прізвище, ім'я та по батькові повністю) (підпис)

Консультанти  
(ім'я та прізвище) (підпис)

(ім'я та прізвище) (підпис)

Рецензент  
(ім'я та прізвище) (підпис)

Я, як здобувач(ка) Національного університету харчових технологій, розумію і підтримую політику університету з академічної доброчесності. Я не надавав(-ла) і не одержував(-ла) незгоєвоєної допомоги під час підготовки цієї роботи. Використання ієї, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

Здобувач   
(підпис)

Київ – 2025 р.

# НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

Освітньо-професійна програма «Біотехнології: фармацевтична, промислова,

харчова, природоохоронна»

(назва)

## ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і

мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ

“ 01 ” березня 2025 року

## З А В Д А Н Н Я

### НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

КУЗНЕЦОВОЇ Софії Володимирівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Біосинтез лотилібцину *Lysobacter sp.*

керівник роботи КРАСІНЬКО Вікторія Олегівна, доц.

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від 27 березня 2025 року № 188-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 07.06.2025

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Lysobacter sp.* WAP-8294, цільовий продукт: циклічний ліпидепсипептидний антибіотик – лотилібцин (WAP-8294A2).

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту. РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента. РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування. РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту. РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми. РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання. РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми. РОЗДІЛ 8. Основні етапи виділення та очищення цільового продукту. РОЗДІЛ 9. Контроль виробництва.

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема виробництва – 1 аркуш формату А1. Апаратурна схема виробництва – 1 аркуш формату А1.

## 6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 01.03.2025 р.

## КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Розділ 1. Характеристика цільового продукту	01.03.25 - 14.03.25	
2	Розділ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	15.03.25 - 20.03.25	
3	Розділ 3. Техніко-економічне обґрунтування	21.03.25 - 30.03.25	
4	Розділ 4. Біосинтез цільового продукту	1.04.25 – 8.04.25	
5	Розділ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми	09.04.25-11.04.25	
6	Розділ 6. Специфікація обладнання	12.04.25 – 20.04.25	
7	Розділ 7. Опис технологічної схеми	21.04.25 – 29.04.25	
8	Розділ 8. Основні етапи виділення та очищення цільового продукту	30.04.25 – 03.05.25	
9	Розділ 9. Контроль виробництва	04.05.25 - 11.05.25	
10	Оформлення пояснювальної записки	12.05.25 - 20.05.25	
11	Виконання графічної частини роботи	21.05.25 - 28.05.25	

**Здобувач** \_\_\_\_\_  
(підпис)

**Софія КУЗНЕЦОВА** \_\_\_\_\_  
(ім'я та прізвище)

**Керівник роботи** \_\_\_\_\_  
(підпис)

**Вікторія КРАСІНЬКО** \_\_\_\_\_  
(ім'я та прізвище)

## **ABSTRACT**

The qualification work is devoted to the biosynthesis of lotilibcin by *Lysobacter* sp. The work consists of an introduction, 9 chapters, and a list of references. The total volume of the project is 73 pages of printed text. This work contains 9 figures and 17 tables. Also, there is a graphic part. This work presents the rationale and provides the technological process of antibiotic biosynthesis by the producer *Lysobacter* sp., which provides for the presence of auxiliary works (preparation and sterilization of nutrient media, solutions to maintain the pH level during cultivation), the stage of obtaining, preparing the seed and accumulation of culture during production fermentation. The choice of the biological agent *Lysobacter* sp. was justified for use. According to the substantive comparison, *Lysobacter* sp. WAP-8294 was chosen as the main biological agent because of the conditional cost of gentamicin and the rate of its synthesis. Taking into account the composition of the nutrient medium, a scheme for its preparation was proposed and sterilization modes were selected. The required number of stages of seed preparation was calculated, which is 4 stages. Production cultivation is carried out in a 1.25 m<sup>3</sup> fermenter.

**Keywords:** *Lysobacter* sp., lotilibcin, biosynthesis, WAP-8294A2, MRSA, antibiotics, aerobic cultivation.

## РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена біосинтезу лотилібцину *Lysobacter sp.* Робота складається зі вступу, 9 розділів, списку використаної літератури. Загальний обсяг проекту 73 сторінок друкованого тексту. Дана робота містить 9 рисунків та 17 таблиць. Також, присутня графічна частина. У даній роботі представлено обґрунтування та надано технологічний процес біосинтезу антибіотику за рахунок продуцента *Lysobacter sp.*, який передбачає наявність допоміжних робіт (підготовка і стерилізація поживних середовищ, розчинів для підтримання рівня рН під час культивування), стадії отримання, підготовки посівного матеріалу та накопичення культури під час виробничої ферментації. Проведено обґрунтування вибору для використання біологічного агента *Lysobacter sp.* За змістовим порівнянням як основний біологічний агент обрано *Lysobacter sp.* WAP-8294 через умовну вартість гентаміцину а також швидкість його синтезу. З урахуванням складу поживного середовища запропоновано схему його підготовки та підібрано режими стерилізації. Розраховано необхідну кількість стадій підготовки посівного матеріалу, яка становить 4 етапи. Виробниче культивування відбувається в ферментері на 1,25 м<sup>3</sup>.

**Ключові слова:** *Lysobacter sp.*, лотилібцин, біосинтез, WAP-8294A2, MRSA, антибіотики, аеробне культивування.

## ЗМІСТ

ABSTRACT.....	4
РЕФЕРАТ.....	5
ВСТУП.....	8
РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту.....	10
РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента.....	11
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування.....	11
2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента.....	14
2.3. Таксономічний статус біологічного агента.....	16
РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування.....	17
3.1. Потреба у цільовому продукті .....	17
3.2. Розрахунок потужності виробництва.....	20
3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів.....	21
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.....	22
РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту.....	25
4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента.....	25
4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт.....	26
РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми.....	29
5.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера.....	29
5.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря.....	30
5.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів.....	32
5.3.1. Обґрунтування вибору мийних та дезінфікуючих засобів.....	32
5.3.2. Розрахунок витрат мийних та дезінфікуючих засобів.....	39
5.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища.....	45
РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання.....	52
РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми.....	58
РОЗДІЛ 8. Основні етапи виділення та очищення цільового продукту.....	67
РОЗДІЛ 9. Контроль виробництва.....	69
9.1. Мікробіологічний контроль .....	69

9.2. Показники росту і синтезу цільового продукту.....	70
9.2.1. Концентрація біомаси.....	70
9.2.2. Концентрація цільового продукту.....	71
9.2.3. Концентрація джерела вуглецю і азоту.....	72
ЛІТЕРАТУРА.....	74

## ВСТУП

У сучасній медицині антибіотики відіграють ключову роль у боротьбі з інфекційними захворюваннями та хірургічними ускладненнями, значно покращуючи тривалість життя людей. Проте, зростає проблема стійкості бактерій до антибіотиків, особливо у випадку внутрішньолікарняних інфекцій, спричинених метицилін-резистентним золотистим стафілококом (MRSA). Це робить розробку нових антибіотиків з унікальними механізмами дії нагальною потребою.

Ванкоміцин слугує ключовим препаратом для лікування цих резистентних до лікарських засобів грампозитивних інфекцій протягом останніх кількох десятиліть і вважається крайнім засобом для лікування інфекцій, спричинених MRSA [1]. На жаль, існує значне занепокоєння через зниження чутливості *S. aureus* до цього препарату. Згідно з інформацією Інституту вимірювання показників і оцінки стану здоров'я (IHME), у 2019 році інфекція, викликана метицилін-резистентним стафілококом золотистим (MRSA), стала причиною 121 000 випадків смерті у світі внаслідок стійкості до антимікробних препаратів. Як показують результати дослідження, опублікованого в січні 2022 року в журналі *\*The Lancet\**, найбільша кількість летальних випадків, пов'язаних із MRSA, була зафіксована в регіонах Південно-Східної Азії, Східної Азії та Океанії, тоді як найменші показники смертності спостерігались у країнах Центральної та Східної Європи, а також у Центральній Азії [2]. Одним із серйозних, хоча й рідкісних ускладнень MRSA є стафілококова пневмонія, яка характеризується високою летальністю. У деяких випадках вона може ускладнюватися бактеріємією або сепсисом, що особливо часто спостерігається у наркозалежних пацієнтів з правобічним бактеріальним ендокардитом [3].

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.30 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розробив</i>		<i>Кузнецова С.В.</i>			<i>ВСТУП</i>	<i>Літера</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Перевірів</i>		<i>Красінько В.О.</i>					8	82
<i>Реценз.</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Зав. каф.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						

Лотилібцин є депсипептидним антибіотиком, що складається з дванадцяти амінокислотних залишків. Він продемонстрував високу ефективність у боротьбі з інфекціями, спричиненими грампозитивними коками, зокрема метицилін-резистентним стафілококом золотистим (MRSA). Цей антибіотик був ідентифікований серед низки біологічно активних сполук, синтезованих штамом *Lysobacter* sp. WAP-8294, як це вказано в патенті США № 5648455 [4], а також у дослідженнях Nagad та співавторів (2001) [3].

Експериментальні дослідження на мишах з системною інфекцією MRSA показали, що лотилібцин в 10 разів ефективніший за ванкоміцин, який використовується як препарат останньої лінії при лікуванні MRSA (середня ефективна доза [ED50] лотилібцину = 0,38 мг/кг; ED50 ванкоміцину = 5,3 мг/кг). Отже, дослідження також показали, що антибіотик має потужну антибактеріальну властивість, хоча й антибактеріальний спектр має короткий діапазон дії [5].

Актуальність дослідження процесу отримання лотилібцину в сучасних умовах зумовлена рядом ключових чинників, серед яких особливу вагу має зростаюча загроза антибіотикорезистентності, а також потреба у розробці нових класів антибактеріальних препаратів, здатних ефективно діяти проти мультирезистентних штамів бактерій. Протистояння резистентності до антибіотиків нині є однією з найважливіших глобальних проблем, що ставить під загрозу подальший розвиток сучасної медицини, адже дедалі частіше традиційні схеми лікування бактеріальних інфекцій виявляються неефективними для багатьох пацієнтів. Зважаючи на вищезазначене розроблення біотехнології одержання лотилібцину як реальної альтернативи ванкоміцину є актуальним. **Новизною роботи** є біосинтез данного антибіотику з використанням мікроорганізму *Lysobacter* sp. WAP-8294, як біологічного агента, який за 72 годин культивування здатний накопичувати 0,68 г/л лотилібцину [6].

## РОЗДІЛ 1

### ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

Цільовим продуктом є циклічний ліпидепсипептид, що був виділений зі штаму *Lysobacter sp.* WAP-8294.

Сімейство ліпопептидів WAP-8294A було вперше виділено зі штаму *Lysobacter sp.* WAP-8294, а його аналоги пізніше (A1, A2, A4, Ax8, Ax9, Ax13 та ін.) було виділено з декількох видів *Lysobacter sp.* Загалом, родина ліпопептидів включає щонайменше 19 структурно споріднених циклічних ліпидепсипептидів, серед них WAP-8294A2 (рис. 1.1) був ідентифікований як основна утворювана сполука [7]. Механізм дії лотилібцину полягає у здатності викликати лізис мембран метицилін-резистентних грампозитивних бактерій [1].

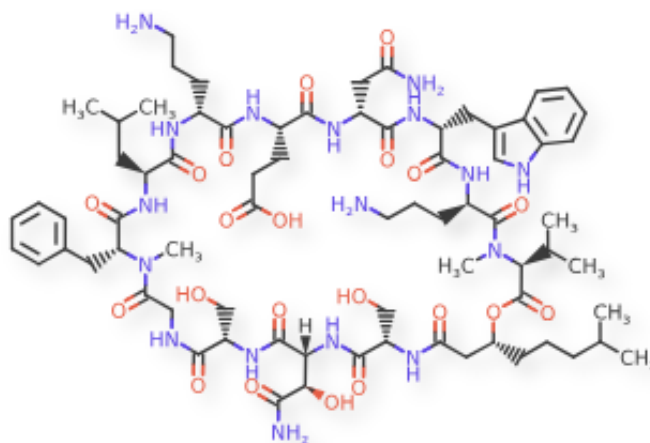


Рис 1.1. Структурна формула лотилібцину [8].

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.30 КР ПЗ</i>		
Змн.	Арк.	№ документа	Підпис	Дата			
Розробив		Кузнецова С.В.			Літера	Аркуш	Аркушів
Перевірів		Красінько В.О.				10	82
Реценз.					<i>Кафедра БТМ</i>		
Н. Контр.							
Зав. каф.		Стабніков В.П.					
					<i>РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту</i>		

## РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента

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

Попри те, що WAP-8294A2 вважається надзвичайно перспективним новим антибіотиком, процес його розробки просувається повільно. Однією з головних причин цього є вкрай низький вихід сполук WAP-8294A, які продукуються бактеріями роду *Lysobacter* лише за специфічних умов культивування. Наразі відомо про хімічний синтез WAP-8294A2, який включав понад 30 синтетичних стадій із загальним виходом 4% [9].

Основним штамом, що синтезує даний антибіотик є *Lysobacter enzymogenes* OH11, що використовується у більшості випадків, хоча є й інші менш поширеним. Як видно з даних, наведених у таблиці 1.1, приблизно однакову кількість лотилібцину здатні синтезувати штами *L. enzymogenes* OH11, *Lysobacter capsici* AZ78 та *Lysobacter* sp. WAP-8294. Проте між ними існують істотні відмінності у тривалості культивування та складі поживних середовищ.

Згідно з таблицею 1.2, поживне середовище, необхідне для культивування *L. enzymogenes* OH11, є значно дорожчим у порівнянні з середовищем для *Lysobacter* sp. WAP-8294. Крім того, тривалість процесу культивування у випадку OH11 є довшою. З огляду на це, для остаточного визначення найефективнішого штаму-продуцента було проведено розрахунок умовної вартості отримання 1 грама цільового продукту (див. таблицю 2.3). Результати розрахунків свідчать, що умовна вартість одного грама лотилібцину, синтезованого за допомогою штаму *Lysobacter* sp. WAP-8294, є найнижчою і становить 5,614 грн/г. До того ж, цей штам забезпечує найвищу швидкість утворення продукту — 0,0094 г/год, що робить його найбільш економічно доцільним варіантом для подальшого використання.

					<b>НУХТ БТЕК 04.01.30 КР ПЗ</b>			
<b>Змн.</b>	<b>Арк.</b>	<b>№ документа</b>	<b>Підпис</b>	<b>Дата</b>	<i>РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента</i>	<b>Літера</b>	<b>Аркуш</b>	<b>Аркушів</b>
Розробив		Кузнецова С.В.						
Перевірів		Красінько В.О.					11	82
Реценз.						<i>Кафедра БТМ</i>		
Н. Контр.								
Зав. каф.		Стабніков В.П.						

## Особливості одержання антибіотику лотилібцину

Біологічний агент	Склад поживного середовища:		Тривалість культивування, год	Концентрація антибіотику, г/л	Особливості процесу біосинтезу	Використана література
	компонент	концентрація, г/л				
1	2	3	4	5	6	7
<i>Lysobacter enzymogenes</i> OH11	Глюкоза Пептон Дріжджовий екстракт NaCl м'ясний екстракт соєва олія CaCO <sub>3</sub>	20 1 0,5 0,5 5 16 1	96	0,8	Температура 30°C; стандартні колби на 250 мл (на 50мл середовища); pH підтримувався на рівні близько 7,0 до 36 год, а потім знизився до 4,7; 200 об/хв.	Chen, Xusheng, et al. "Systematic optimization for production of the anti-MRSA antibiotics WAP-8294A in an engineered strain of <i>Lysobacter enzymogenes</i> ." <i>Microbial Biotechnology</i> 12.6 (2019): 1430-1440.
<i>Lysobacter capsici</i> AZ78	Триптон Дріжджовий екстракт NaCl Бактеріологічний агар (агар № 1, оксид)	10 5 10 16	36	(0,4)	Чашки Петрі діаметром 90мм, температура 25°C	Brescia, Francesca, et al. "Characterisation of the antibiotic profile of <i>Lysobacter capsici</i> AZ78, an effective biological control agent of plant pathogenic microorganisms." <i>Microorganisms</i> 9.6 (2021): 1320.
<i>Lysobacter sp.</i> WAP-8294	Глюкоза Знежирене соєве борошно соєва олія NaCl CaCO <sub>3</sub>	(об'ємна частка на 0,1 л) 2,5% 2% 0,4% 0,25% 0,5%	72	0,68	колба Ерленмейера 500 мл, (на 100 мл поживного середовища), pH 7,2, температура 30°C, інкубування на ротаційному шейкері (180 об/хв.)	Kato, Azusa, et al. "A new anti-MRSA antibiotic complex, WAP-8294A I. Taxonomy, isolation and biological activities." <i>The Journal of antibiotics</i> 51.10 (1998): 929-935.

## Вартість поживних середовищ для синтезу лотилібіцину

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	4	5	6
<i>Lysobacter enzymogenes</i> ОН11	Глюкоза	20	49	0,98	1
	Пептон	1	1120	1,12	2
	Дріжджовий екстракт	0,5	900	0,45	2
	NaCl	0,5	235	0,1175	3
	м'ясний екстракт	5	7296	36,48	4
	соєва олія	16	35	0,56	5
	CaCO <sub>3</sub>	1	113	0,113	4
		<b>Вартість 1 л середовища –39,8205 грн</b>			
<i>Lysobacter sp.</i> WAP-8294	Глюкоза	25	49	1,225	1
	Знежирене соєве борошно	20	65	1,3	2
	соєва олія	4	35	0,14	5
	NaCl	2,5	235	0,5875	3
	CaCO <sub>3</sub>	5	113	0,565	4
		<b>Вартість 1 л середовища –3,8175 грн</b>			

Примітка. \* – Ціни наведено станом на січень 2020 р. 1 - <https://primehim.com>, 2 - <https://prom.ua/ua>, 3 - <https://rozetka.com.ua>, 4 - <http://lab-mir.com>, 5 - <https://flagma.ua>

## Умовна вартість 1 г лотилібцину

Біологічний агент	Концентрація продукту, г/л	Тривалість культивування, год	Кількість утвореного антибіотику за годину, г/год	Вартість 1 л середовища, грн/л	Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г
1	2	3	4	5	6
<i>Lysobacter enzymogenes</i> OH11	0,8	96	0,0083	39,8205	49,776
<i>Lysobacter sp.</i> WAP-8294	0,68	72	0,0094	3,8175	5,614

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

## Морфолого-культуральні ознаки

*Lysobacter sp.* є бактерією, що здатна виділяти білки та бактеріолітичні ферменти (L1-L5) у культуральне середовище. Зазвичай клітини мають розмір 0,4-0,6 × 2-5 мкм, але в популяції часто зустрічаються також довгі та дуже довгі (до 70 мкм) клітини та нитки [10,11]. У міжклітинному просторі мають сферичні, мембранні, двохарові структури - везикули, діаметром 80-160 нм. (рис. 5.1) Забарвлюються за Грамом негативно, пересуваються ковзанням [10].

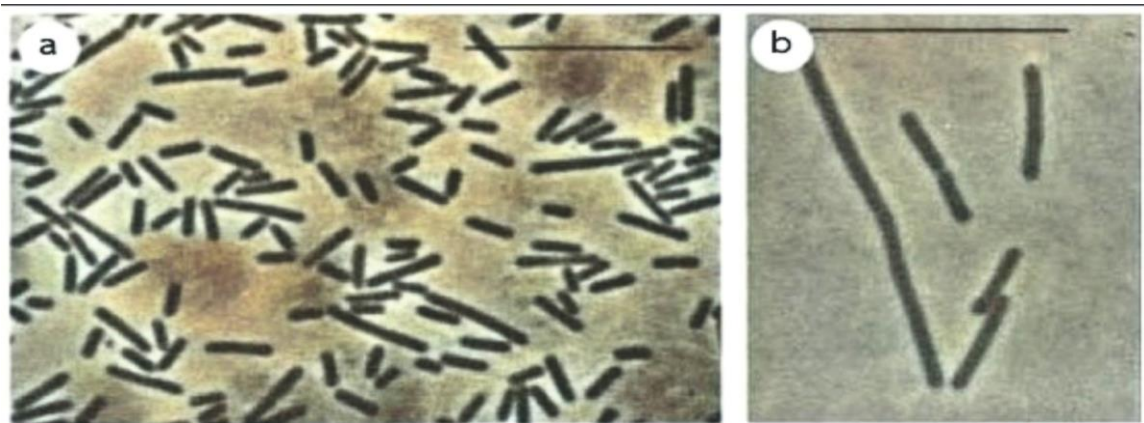


Рис. 2.4. Електронна мікроскопія клітин *Lysobacter sp.* [11]

На агарі з дріжджовим екстрактом *Lysobacter sp.* утворює гладкі, блискучі, жовтувато-білі, коричневі чи жовті плями. Можуть бути круглими чи овальними, неправильної форми, при рості утворюють суцільну масу. (рис. 5.2) [13].

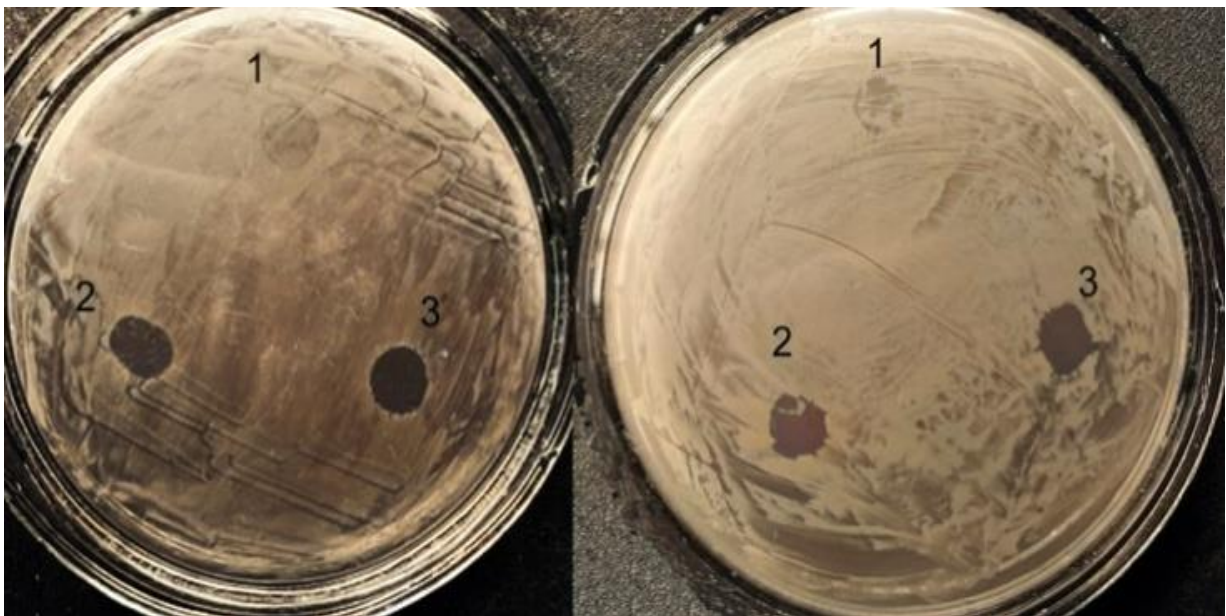


Рис. 2.5. Колонії *Lysobacter sp.* на агарі [13]

### Фізіолого-біохімічні ознаки

*Lysobacter sp.* є облігатними аеробами. За типом живлення – хемоорганогетеротроф. Не потребує факторів росту, тест за каталазою позитивний, не відновлює нітрати до нітритів [11, 9]. Оптимальна температура росту складає 28-40°C, значення рН 6-10. Отже, по відношенню за температурою *Lysobacter sp.* є мезофілом, за рН - 8 – алкалофілом [9].

### **2.3. Таксономічний статус біологічного агента**

Філогенетичну класифікацію для *Lysobacter sp.* наведено відповідно до другого видання Керівництва Бергі з систематики бактерій [14].

Домен – *Bacteria*

Тип – *Pseudomonadota*

Клас – *Gammaproteobacteria*

Порядок – *Xanthomonadales*

Родина – *Xanthomonadaceae*

Рід – *Lysobacter*

### РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування

#### 3.1. Потреба у цільовому продукті

Згідно з даними ІНМЕ (Інститут вимірювання показників та оцінки стану здоров'я), у 2019 році MRSA став причиною 121 000 смертей у світі через стійкість до протимікробних препаратів. Відповідно до досліджень, опублікованих у журналі The Lancet у січні 2022 року, найвища кількість смертей від MRSA зафіксована в Південно-Східній Азії, Східної Азії та Океанії, тоді як найнижчий показник спостерігається в Центральній Європі, Східної Європі та Центральній Азії [15].

Згідно з результатами досліджень, приблизно третина населення (близько 33%) є носіями бактерій *Staphylococcus aureus*, основною зоною колонізації яких виступає носова порожнина. При цьому близько 2% людей є носіями метицилін-резистентного штаму *Staphylococcus aureus* (MRSA), хоча в окремих популяціях чи групах ризику цей показник може бути значно вищим. Незважаючи на це, більшість таких людей не стикаються із серйозними клінічними проявами або тяжкими інфекціями. Загалом, постійними носіями *Staphylococcus aureus* є приблизно 25–40% людей, тоді як MRSA може колонізувати як шкірні покриви, так і слизові оболонки верхніх дихальних шляхів. Серед усіх зареєстрованих випадків захворювання приблизно 18% припадає на дітей, решта — на дорослих пацієнтів [6,7].

Одним із можливих ускладнень, викликаних MRSA, є стафілококова пневмонія — тяжке, але рідкісне захворювання, що відзначається високим рівнем летальності. У деяких випадках воно може супроводжуватися розвитком бактеріємії або сепсису, що є особливо небезпечним у пацієнтів, які зловживають наркотиками, та у яких виникає правобічний бактеріальний ендокардит [16].

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.30 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування</i>	<i>Літера</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розробив</i>		<i>Кузнецова С.В.</i>						
<i>Перевірів</i>		<i>Красінько В.О.</i>					17	82
<i>Реценз.</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Зав. каф.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						

Щорічно у світі реєструється близько 450 мільйонів випадків бактеріальної пневмонії, з яких близько 95% стосується країн, що знаходяться на стадії розвитку — це призводить до приблизно 4 мільйонів смертей щорічно. У Європі захворюваність варіюється від 206 до 470 випадків (середнє - 338) на 100 000 пацієнтів щороку [17].

Ванкоміцин протягом останніх десятиліть залишався основним засобом для лікування резистентних до антибіотиків грампозитивних інфекцій, включаючи MRSA, і вважається препаратом останньої лінії. Однак, зростає занепокоєння щодо зниження чутливості бактерій *S. aureus* до цього препарату.

У контексті малодосліджених антибіотиків-кандидатів циклічні пептиди виділяються як перспективний клас природних сполук з потужними антибактеріальними властивостями. Однією з таких сполук є лотилібцин (WAP-8294A2), відкритий у 1997 році та виділений з культури *Lysobacter sp.*. Дослідження, проведені на мишах з системною інфекцією MRSA, вказали на те, що лотилібцин є в 10 разів ефективнішим за ванкоміцин. Середня ефективна доза лотилібцину = 0,38 мг/кг, тоді як ванкоміцину = 5,3 мг/кг [5].

Отже, розробка нових антибіотичних препаратів на основі лотилібцину може стати можливим рішенням проблеми поширення інфекцій, викликаних MRSA, однак варто зазначити, що цей процес є тривалим і потребує значних фінансових витрат. Слід зазначити, що на сьогоднішній день лотилібцин не є самостійним лікарським засобом і використовується лише в рамках експериментальних досліджень. Препарат пройшов фазу I/II клінічних випробувань компанією aRigen Pharmaceuticals у 2009 році та наразі проводяться клінічні випробування II фази для місцевого застосування для лікування грампозитивних бактеріальних інфекцій [7].

З урахуванням даних щодо ефективності обох лікарських засобів (середня ефективна доза обох препаратів на мишах) [5], а також інформації про дозування ванкоміцину, середня ефективна доза якого є 20 мг [18], ми можемо провести порівняльні розрахунки, щоб знайти теоретичну потрібну ефективну добову дозу лотилібцину:

$$\frac{0,38 \text{ мг}}{5,3 \text{ мг}} = \frac{x}{20 \text{ мг}}$$

$$x = \frac{0,38 * 20}{5,3} = 1,43 \text{ мг на добу}$$

За даними Державної служби статистики України [19], кількість населення України на 2022 рік становило 41, 167 (335) млн. людей. Маючи кількість хворих на 100 тис. населення [17], то загальна кількість хворих буде:

$$N_{\text{хв}} = 41\,167\,335 \times 338 / 100\,000 = 139\,145$$

Частка дітей становить приблизно 18%, відповідно дорослих – 82% [20,21]. Звідси хворих дорослих:  $N_{\text{др}} = 139\,145 \times 82 / 100 = 114\,098$  хворих; дітей:  $N_{\text{дт}} = 139\,145 - 114\,098 = 25\,047$ .

Доза ванкоміцину для дітей до 12 років - 40 мг, дорослим - 500 мг [18]. Отже, доза лотилібцину буде становити:

$$\frac{x}{40} = \frac{1,43}{20}$$

$$x = \frac{1,43 * 40}{20} = 2,86 \text{ мг активної речовини доза для дітей до 12 років.}$$

Аналогічно розраховуємо дозу для дорослих:

$$\frac{x}{500} = \frac{1,43}{20}$$

$$x = \frac{1,43 * 500}{20} = 35,75 \text{ мг активної речовини доза для дітей після 12 років та дорослих.}$$

Тривалість лікування визначається клінічною реакцією пацієнта на терапію, тому візьмемо за основу, що середня тривалість лікування складає 10 днів, 4 дози на добу [18].

Потреба на курс для дітей та дорослих: [к-сть доз × термін × чисельність]

$$G_{\text{дт}} = 4 \text{ дз} \times 0,00286 \text{ г} \times 10 \text{ дн} \times 25\,047 \text{ дт} = 2\,865 \text{ г}$$

$$G_{\text{др}} = 4 \text{ дз} \times 0,03575 \text{ г} \times 10 \text{ дн} \times 114\,098 \text{ др} = 163\,160 \text{ г}$$

Загальна потреба у *Лотилібцині* складе

$$\sum G = G_{\text{др}} + G_{\text{дт}} = 163\,160 + 2\,865 = 166\,025 \text{ г} = 166 \text{ кг}$$

## Вихідні дані для розрахунку річної потреби в лотилібцині

Категорії хворих	Доза препарату, г	Кількість прийомів на добу	Тривалість лікування, діб	Кількість хворих за 2022р, млн.	Загальна необхідні кількість препарату, г
1	2	3	4	5	6
Дорослі та діти старше 12 років	0,03575	4	10	0,114	166 025
Діти до 12 років	0,00286	4	10	0,025	2 865
<b>Всього</b>					166 025 (166 кг)

**Примітка.** Для розрахунку використано як приклад препарат «Ванкоміцин» від ХІКМА ІТАЛІЯ С.П.А.. Препарат представлений у формі порошку для розчину для інфузій по 1000 мг у флаконах, що є найбільш розповсюдженою формою випуску.

### 3.2. Розрахунок потужності виробництва

Згідно «Нормативно-директивних документах МОЗ України», наразі на ринку існує 29 препаратів ванкоміцину (порошок у флаконах), з яких лише 2 випускаються в Україні - ТОВ "Фармекс Груп" [22]. Кажучи про лотилібцин, зараз його поставником є BenchChem (Техас, США) [23], R.R. Scientific (Індія) [24] та THE BioTek (Каліфорнія, США) [25], що виробляють продукт у формі порошку.

Незважаючи на те, що лотилібцин позиціонується як перспективний антибіотик, його шлях до широкого застосування в Україні ще далекий. Згідно з інструкцією, він призначений виключно для досліджень, не для лікування людей або тварин [25]. Це означає, що його ефективність та безпека для пацієнтів ще не доведені. Важливо розуміти, що на українському ринку вже є стабільне постачання перевірених імпортованих препаратів ванкоміцину. Тому, лотилібцин навряд чи зможе повністю витіснити його у найближчому майбутньому.

Однак, виробництво лотилібцину в Україні може стати перспективним напрямком для вітчизняної фармацевтичної промисловості. Зокрема, виробництво на рівні 1% від загальної потреби може стати першим кроком на шляху до широкого застосування цього препарату. Це дозволить не лише забезпечити український ринок вітчизняним аналогом імпортованих препаратів, але й стимулювати розвиток фармацевтичної науки в Україні.

Отже, вироблятимемо лотилібцин в кількості:

$$G_{\text{гп}} = 166 * 1/100 = 1,66 \text{ кг/рік.}$$

Обраний біологічний агент *Lysobacter sp.* WAP-8294 синтезує лотилібцин у концентрації 0,68 г/л (кг/м<sup>3</sup>) [5]. Об'єм культуральної рідини, необхідної для отримання 1,66 кг лотилібцину становить:

$$0,68 \text{ кг} - 1 \text{ м}^3$$

$$1,66 \text{ кг} - X$$

$$X = 2,44 \text{ м}^3$$

З урахуванням втрат цільового продукту при виділенні, які візьмемо як 40%, то отримаємо:

$$V_{\text{кр}} = 2,44 * 1,4 = 3,42 \text{ м}^3 \text{ культуральної рідини.}$$

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

Для забезпечення річної потреби у лотилібцині (згідно п.3.2), ймовірно підприємство може отримати за рік 3,42 м<sup>3</sup> культуральної рідини (з урахуванням втрат). Виробництво лотилібцину передбачає три виробничі цикли. Розрахуємо, скільки культуральної рідини потрібно отримати за цикл ферментації. Прийmemo кількість робочих днів як 30, бо впродовж року в інший робочий час будуть випускатися інші антибіотичні засоби. Тоді об'єм культуральної рідини за добу становить:

$$V_{\text{д}} = V_{\text{гп}} / T_{\text{тр}} = 3,42 \text{ м}^3 / 30 = 0,114 \text{ м}^3$$

Прийmemo коефіцієнт запасу за 1,5, а цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу – 84 годин (72 годин виробничого біосинтезу + 12 годин

підготовки). Кількість цільового продукту за цикл буде становити:

$$V_{\text{цк}} = (K_1 * V_d * T_{\text{цф}}) / 24 = (1,5 * 0,114 * 84) / 24 = 0,6 \text{ м}^3 / \text{цикл}$$

Визначивши об'єм КР за один цикл і знаючи коефіцієнт заповнення (0,65), визначаємо геометричний об'єм ферментера:

$$V_{\Gamma} = V_{\text{цк}} / K_3 = 0,6 / 0,65 = 0,92 \text{ м}^3$$

Згідно з таблицею, найближчим за геометричним об'ємом є ферментер  $V_{\phi} = 1 \text{ м}^3$ .

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_3 = 0,6 / 1 = 0,6 - \text{не перевищує заданого значення у } 0,65.$$

### 3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

Згідно розрахунків (див. п.3.3), за один виробничий цикл отримують  $0,6 \text{ м}^3$  культуральної рідини. Отримуючи культуральну рідину, варто пам'ятати про втрати, які виникають через краплевинос з колектора відпрацьованого повітря ( $E_{\phi}$ ). Ці втрати сягають приблизно 15% від загального об'єму, тому їх потрібно враховувати при розрахунках.

Отже, з урахуванням покриття 15% втрат об'єм поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом буде становити:

$$V_{\text{роб.1}} = V_{\text{кр}} * (1 + E_{\phi}) = 0,6 * 1,15 = 0,7 \text{ м}^3$$

За вибраного коефіцієнта заповнення 0,65 геометричний об'єм ферментера становить:  $V_{\phi} = 0,7 / 0,65 = 1,07 \text{ м}^3$ . Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер  $V_{\text{ст1}} = 1,25 \text{ м}^3$ .

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:  $K_{31} = 0,7 / 1,25 = 0,56$ . Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах (від 0,5 до 0,65), отже геометричний об'єм посівного апарату обрано правильно.

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить 10 % від об'єму поживного середовища, тому для  $3,9 \text{ м}^3$  середовища необхідно приготувати:

$V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб.1}} * X_{\phi} = 0,7 * 0,1 = 0,07 \text{ м}^3$  посівного матеріалу, де  $X_{\phi} = 0,1$  – доза посівного матеріалу для ферментера.

Тоді об'єм поживного середовища в ферментері буде становити:

$$V_{пс1} = V_{роб.1} - V_{пм1} = 0,7 - 0,07 = 0,63 \text{ м}^3$$

$$V_{роб.2} = V_{пм1} * (1+Eф) = 0,07 * 1,15 = 0,081 \text{ м}^3$$

Об'єм інокуляту  $0,45 \text{ м}^3$  за коефіцієнта заповнення  $0,65$  можна отримати в посівному апараті об'ємом:  $V_{па2} = 0,081/0,65 = 0,12 \text{ м}^3$ . Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер  $V_{ст2} = 0,16 \text{ м}^3$ .

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:  $K_{з2} = 0,08/0,16 = 0,51$ .

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах (від  $0,5$  до  $0,65$ ), отже геометричний об'єм посівного апарату обрано правильно.

Кількість посівного матеріалу для посівного апарата становить  $10 \%$  від об'єму поживного середовища. Отже, для засіву  $V_{роб.2} = 0,081 \text{ м}^3$  необхідно приготувати:

$$V_{пм2} = V_{роб.2} * Xф = 0,081 * 0,1 = 0,0081 \text{ м}^3 = 0,008 \text{ м}^3 \text{ посівного матеріалу.}$$

$$V_{пс2} = V_{роб.2} - V_{пм2} = 0,081 - 0,008 = 0,073 \text{ м}^3$$

Під час одержання  $0,008 \text{ м}^3$  ( $8 \text{ л}$ ) посівного матеріалу в інокуляторі  $15 \%$  культуральної рідини буде втрачено через колектор відпрацьованого повітря. Тоді об'єм поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становитиме:

$$V_{роб.3} = V_{пм2} * (1+Eф) = 0,008 * 1,15 = 0,01 \text{ м}^3 = 10 \text{ л}$$

Об'єм інокуляту  $0,01 \text{ м}^3$  за коефіцієнта заповнення  $0,65$  можна отримати в посівному апараті об'ємом:  $V_{па2} = 0,01/0,65 = 0,015 \text{ м}^3$ . Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер  $V_{ст3} = 0,02 \text{ м}^3$ .

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:  $K_{з.3} = 0,01/0,02 = 0,5$ . Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах, отже геометричний об'єм посівного апарату обрано правильно. Для засіву поживного середовища об'ємом  $10 \text{ л}$  необхідно:

$$V_{пм3} = V_{роб.3} * Xф = 10 * 0,1 = 1 \text{ л посівного матеріалу}$$

$$V_{пс3} = V_{роб.3} - V_{пм3} = 10 - 1 = 9 \text{ л}$$

Одержання посівного матеріалу  $V_{пм3} = 1$  л (1000 мл) для засіву інокулятора можна здійснити культивуванням у колбах на качалці. Для цього використовують качалочні колби об'ємом 750 мл з коефіцієнтом заповнення  $K_{зк} = 0,2$ . Тоді кількість колб становить:

$$N_{колб} = V_{пм4} / (V_{колб} * K_{зк}) = 1000 / (750 * 0,2) = 7 \text{ колб}$$

Отже, за результатами розрахунків для біосинтезу лотилібциу штамом *Lysobacter sp.* WAP-8294 необхідно встановити ферментер для біосинтезу об'ємом 1,25 м<sup>3</sup>, інокулятори по 160 л, 20 л та 7 качалочних колб. Отримані дані узагальнені в таблиці 3.2:

**Таблиця 3.2**

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

№ стадії	Об'єм культуральної рідини $V_{кр}$ , м <sup>3</sup> (л)	Уточнений об'єм культуральної рідини $V_{роб}$ , м <sup>3</sup> (л)	Об'єм посівного матеріалу, $V_{пм}$ , м <sup>3</sup> (л)	Об'єм поживного середовища $V_{пс}$ , м <sup>3</sup> (л)	Коефіцієнт заповнення $K_{зап}$ , частка	Геометричний об'єм ферментера, $V_{ст}$ , м <sup>3</sup> (л)
1	2	3	4	5	6	7
IV	0,6 (600)	0,7(700)	0,07 (70)	0,63(630)	0,65	1,25 (1250)
III	0,05 (50)	0,081 (81)	0,008 (6)	0,073 (73)	0,65	0,16 (160)
II	0,008 (8)	0,01 (10)	(1)	(9)	0,65	0,02 (20)
I	(1)	(1)	-	(1)	0,65	7 колб

## РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту

### 4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента

*Lysobacter sp.* WAP-8294A як джерело вуглецю використовує **глюкозу**, отже на даному субстраті у мікроорганізмі функціонує гліколіз [6]. Схему метаболізму глюкози в *Lysobacter sp.* WAP-8294A у базі даних KEGG не наведено, тому для побудови шляху катаболізму глюкози обираємо близькоспоріднений мікроорганізм *Lysobacter sp.* TY2-98 [26].



Рис.4.1. Шлях катаболізму глюкози в *Lysobacter sp.* TY2-98

<b>НУХТ БТЕК 04.01.30 КР ПЗ</b>								
					РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту			
Змн.	Арк.	№ документа	Підпис	Дата		Літера	Аркуш	Аркушів
Розробив		Кузнецова С.В.					25	82
Перевірів		Красінько В.О.				<b>Кафедра БТМ</b>		
Реценз.								
Н. Контр.								
Зав. каф.		Стабніков В.П.						

**Ферменти:** 1 – D-глюкозофосфотрансфераза (КФ 2.7.1.199), 2 – глюкозо-6-фосфат ізомераза (КФ 5.3.1.9), 3 – 6-фосфофруктокіназа (КФ 2.7.1.11), 4 – фруктозо-біфосфат альдолаза (КФ 4.1.2.13), 5 – гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12), 6 – 3-фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3), 7 – фосфогліцератмутаза-1(КФ 5.4.2.11), 8 – енолаза (КФ 4.2.1.11), 9 – піруваткіназа (КФ 2.7.1.40).

Глюкоза під дією D-глюкозофосфотрансферази (КФ 2.7.1.199), перетворюється в глюкозо-6-фосфат, цей проміжковий продукт за допомогою глюкозо-6-фосфат ізомерази (КФ 5.3.1.9) переходить в фруктозо-1,6-дифосфат. Під дією фруктозо-біфосфат альдолази (КФ 4.1.2.13) утворюються гліцеральдегід-3-фосфат. З нього під впливом гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази (КФ 1.2.1.12) синтезується 1,3-Дифосфогліцерат. Потім, за допомогою 3-фосфогліцераткінази (КФ 2.7.2.3) синтезується 3-фосфогліцерат, а потім 2-фосфогліцерат за допомогою фосфогліцератмутази-1 (КФ 5.4.2.11). Енолаза (КФ 4.2.1.11) переводить останню речовину в фосфоенолпіруват з якого, в присутності піруваткінази (КФ 2.7.1.40) синтезується піровиноградна кислота.

#### **4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт**

Під час росту *Lysobacter sp.* ТУ2-98 глюкоза перетворюється на піруват під час гліколізу, що потім під дією піруватдегідрогенази (КФ 1.2.4.1) перетворюється на ацетил-КоА, що далі залучається до циклу трикарбонових кислот. Так як у KEGG [26] відсутня інформація про шляхи біотрансформації ростового субстрату у штаму *Lysobacter sp.* WAP-8294A, для подальшого побудови шляху метаболізму обираємо близькоспоріднені мікроорганізми *Lysobacter sp.* ТУ2-98 та *Lysobacter enzymogenes* С3 [27].

Антибіотик має у складі 12 амінокислот, однією з яких є октанова кислота [6], проте шлях її синтезу для даних нам мікроорганізмів відсутній, кінцевий продукт синтезу відсутній, що залишає нас лише з проміжним продуктом - Октаноїл-(протеїн ацил-переносник) [28] Її отримують шляхом перетворенням Ацетил-Коа у Малоніл-Коа за участі ацетил-КоА карбоксилази карбоксил трансферазної субодиниці (КФ 6.4.1.2) та подальшим біосинтезом жирних кислот. Оксалоацетат перетворюється на аспартат через аспартат аміотрансферазу (КФ 2.6.1.1), що далі перетворюється під дією аспарагін

синтетази в аспаргін та, після проміжного перетворення на аргініносукцинат - на аргінін, використовуючи фермент аргініносукцинат ліазу.

Аспарат під дією діамінопімелатної декарбоксилази (КФ 2.7.2.4) та інших ферментів трансформується у треонін (під дією треонін альдолази (КФ 4.1.2.48), гліцин (під дією серин гідроксиметилтрансферази (КФ 2.1.2.1), серин (під дією субодиниці триптофансинтетази альфа (КФ 4.2.1.20) та триптофан. Треонін, за допомогою ферменту треоніндегідратази (КФ 4.2.1.19) перетворюється на 2-Оксобутаноат, що під дією малої субодиниці ацетолактат синтетази II (КФ 2.2.1.6) та інших ферментів трансформується у валін, лейцин та ізолейцин.

Оксалоглутарат під впливом аспарат амінотрансфераза (КФ 2.6.1.1) та аланінсинтезуюча трансаміназа (КФ 2.6.1.2) перетворюється в глутамат, що після впливу глутамат дегідрогенази та глутамін синтетази перетворюється у глутамін. Згідно з KEGG фосфоенолпіруват за допомогою 3-дезоксидеокси-7-фосфогептулонат синтази (КФ 2.5.1.54) перетворюється у 3-Дезокси-арабіно-гептулонат 7-фосфат, що після перетворюється у 3-Дегідрохінат, 3-Дегідрошикімат, 3,4,5-тригідрокси-1-циклогексанкарбонову кислоту, шікімат 3-фосфат та 5-О-(1-карбо-ксивініл)-3-фосфошикімат з використанням інших ферментів. Під дією хорізмат синтази (КФ 4.2.3.5) проходить трансформація у хорізмат, що потім завдяки префенат дегідратазі (КФ 5.4.99.5) перетворюється у префенат та після у фенілпіруват. Останній під впливом гістидинол-фосфатної трансамінази (КФ 2.6.1.1) перетворюється у фенілаланін.

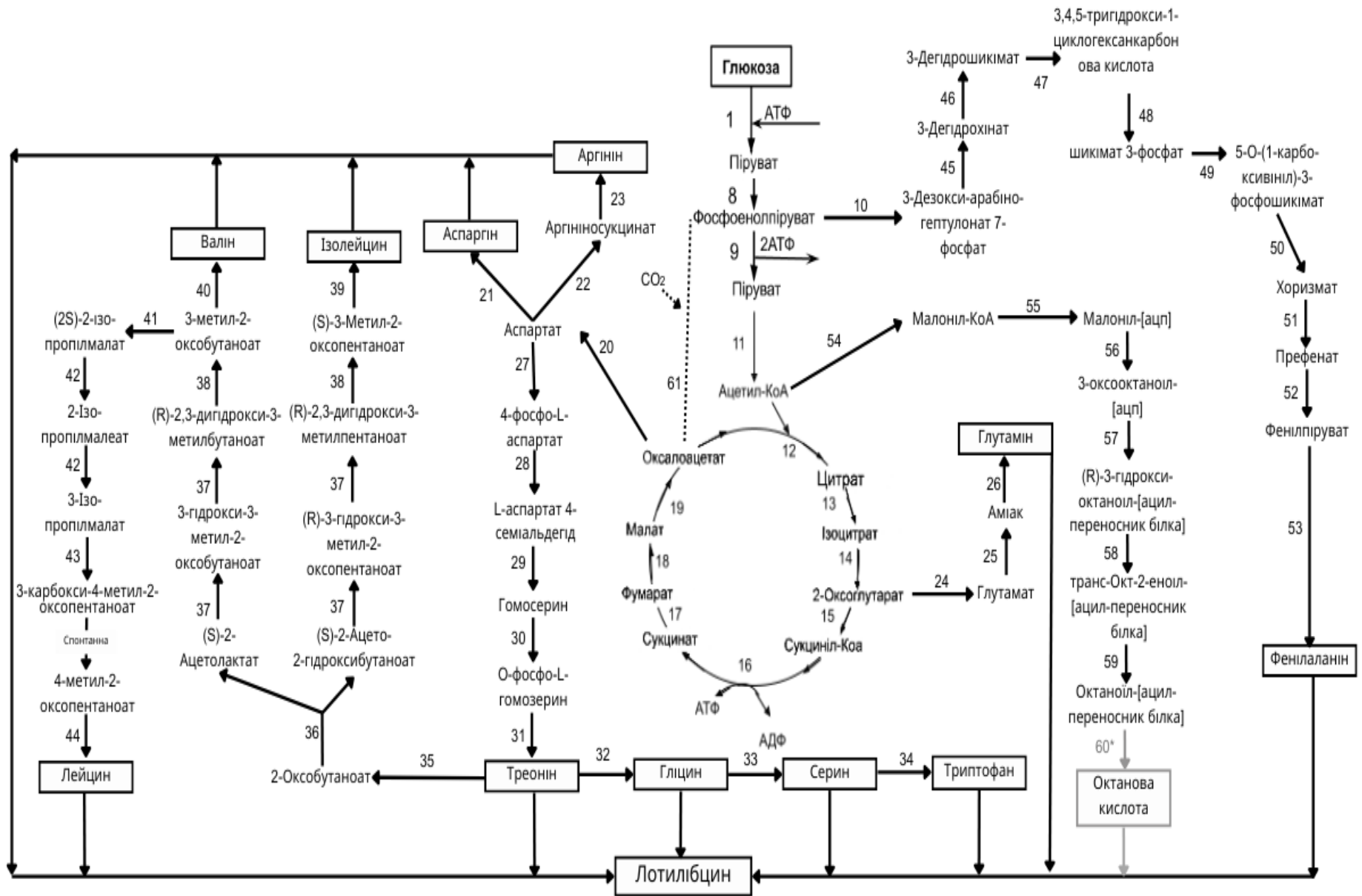


Рис.4.2. Схема біотрансформації глюкози в лотилібцин

## РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми

### 5.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

*Lysobacter sp.* WAP-8294 - це грамнегативні бактерії, облигатні аероби. За типом живлення – хемоорганогетеротрофи. Не потребують факторів росту, оптимальна температура росту складає 28-40°C, значення рН 6-8. Отже, по відношенню за температурою *Lysobacter sp.* є мезофілом, за рН – нейтрофілом [11, 29].

Нейтральне значення рН у середовищі для культивування цільового мікроорганізму створює підвищений ризик контамінації мезофільною та нейтрофільною мікрофлорою ззовні. У зв'язку з цим необхідно суворо дотримуватись асептичних умов протягом усього процесу біосинтезу. Це дозволяє забезпечити безпечність, високу ефективність і чистоту кінцевого продукту, зводячи до мінімуму ймовірність забруднення. Досягнення асептичних умов можливе завдяки ретельній стерилізації всіх складових системи, зокрема обладнання, поживного середовища, повітря для аерації та піногасників. Подача стерильного повітря під надлишковим тиском дозволяє ефективно запобігти проникненню сторонніх мікроорганізмів у ферментер [29]. Отже, найкращим у даному випадку буде культивування антибіотику WAP-8294A2 періодичним глибинним способом з підтриманням асептики. Оскільки культивування WAP-8294A2 аеробне, аерація середовища є обов'язковою умовою. Це означає, що ферментер повинен бути оснащеним барботером та турбінною мішалкою для досягнення максимальної швидкості розчинення кисню повітря у процесі вирощування культури [29]. Оснащення для культивування WAP-8294A2 - ферментер, що повинен мати сорочку (для охолодження та нагрівання), датчик рН та турбінну мішалку, яка забезпечить інтенсивний масообмін та кращу гомогенізацію культуральної рідини.

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.30 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми</i>	<i>Літера</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розробив</i>		<i>Кузнецова С.В.</i>					29	82
<i>Перевірів</i>		<i>Красінько В.О.</i>						
<i>Реценз.</i>								
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Зав. каф.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>			<i>Кафедра БТМ</i>			

У відповідності до вимог технологічного процесу і певних бізнес-цілей, компанія «SYSBIOTECH» (Австрія) виробляє на замовлення ферментери з заданими нами параметрами (об'єм 1,25 м<sup>3</sup>). Робочий об'єм ферментерів даного виробника коливається від 500 л до 150 000 л. Вони мають повністю асептичну конструкцію, можуть бути модернізовані для виконання конкретних завдань (можна встановити додаткові датчики або замінити крильчатку в культуральному резервуарі). Оснащені такими датчиками як: датчик температури, датчик рН, датчик розчиненого О<sub>2</sub>, мають порт для відбору проб, барботер, датчик контролю рівня піни, мембранний перетворювач тиску. Має замкнуту систему контролю температури, ізоляційну сорочку, систему перемішування, діапазон швидкостей 10-600 об/хв, ручне й автоматичне регулювання швидкості залежно від кількості розчиненого кисню, автоматична подача повітря до 2 об/хв [30].

## 5.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря

*Lysobacter sp.* WAP-8294, що є продуцентом лотилібцину, є облігатним аеробом - це означає, що ферментер повинен бути оснащеним барботером для подачі стерильного аераційного повітря, що є необхідною умовою під час біосинтезу [6]. Процес підготовки посівної культури для вирощування інокуляту у колбах на качалках здійснюється в спеціально обладнаних боксах та мікробіологічних лабораторіях. В цих приміщеннях повітря очищується шляхом стерилізації за допомогою ультрафіолетових ламп.

Процес підготовки стерильного аераційного повітря, яке подається всередину ферментаційного обладнання, складається з кількох важливих етапів:

### 1. Забір атмосферного повітря.

Використовуючи турбокомпресор, повітря береться через забірну шахту на висоті 2-3 метри від найвищої точки будівлі, що становить приблизно 10 метрів (з урахуванням висоти поверху – 6 м, кількості поверхів – 1). Повітря збирається так високо, щоб забезпечити максимально чисте повітря для процесу ферментації. На висоті концентрація пилу, бактерій та інших забруднювачів, як правило, нижча порівняно з приземними шарами повітря.

### 2. Попереднє очищення.

Повітря потрапляє у фільтри попереднього очищення, де значно зменшується кількість контамінантів і видаляється пил.

### 3. Стиснення повітря.

У турбокомпресорі відбувається стиснення повітря до 0,35 – 0,5 МПа, що призводить до його нагрівання до температури 120 – 250 °С і збільшення вмісту вологи в одиниці об'єму.

### 4. Відведення вологи та охолодження.

За допомогою теплообмінника волога з нагрітого під час стиснення повітря відводиться в краплевловлювач з метою охолодження та видалення вологи.

### 5. Видалення конденсованої вологи.

Конденсована волога, що утворюється в компресорі, остаточно видаляється у ресивері, вирівнюється тиск повітря.

6. Повітря проходить через головні фільтри, забезпечуючи первинне очищення від забруднень. Ці фільтри встановлюються в цеху ферментації на головному повітряному колекторі стиснутого аераційного повітря, що забезпечує первинне очищення перед подачею на ферментери.

7. Останнім етапом є очищення повітря на індивідуальних фільтрах, які присутні на кожному ферментері і затримують 99,999% мікроорганізмів

В промисловості, де надзвичайно важливим є забезпечення чистоти повітря, надійним засобом очищення стали фільтри, виготовлені з волокнистих і пористих матеріалів. Завдяки своїй специфічній структурі, ці матеріали здатні затримувати навіть найдрібніші частинки, забезпечуючи надзвичайно високий рівень очищення повітря — до 99,9999%. Такий ступінь фільтрації досягається завдяки комбінації інерційного та дифузійного механізмів осадження, які сприяють ефективному захопленню частинок всередині волокнистої маси. Конструктивні особливості фільтрів визначаються типом матеріалу, з якого вони виготовлені, що впливає на їхню здатність до очищення та довговічність. Для збереження високої ефективності роботи фільтрувальних елементів

необхідним є їх регулярний процес стерилізації. Найефективнішим способом дезінфекції таких фільтрів вважається обробка вологою парою при температурі 125–130°C протягом визначеного проміжку часу [31].

### **5.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів**

#### **5.3.1. Обґрунтування вибору мийних та дезінфікуючих засобів**

Потреба у мийних і дезінфікуючих розчинах на виробництві зумовлена необхідністю підтримання належного рівня асептики та запобігання контамінації продукції патогенними мікроорганізмами. У біотехнологічних і фармацевтичних виробництвах, де вирощуються мікроорганізми для отримання біологічно активних речовин, кожен етап процесу потребує бездоганної стерильності, а невиконання цього стандарту може призвести до забруднення культури, втрати цільового продукту та навіть до небезпеки для здоров'я споживачів.

#### **5.3.1 Обґрунтування вибору мийних та дезінфікуючих засобів**

При виборі дезінфекційного засобу необхідно враховувати низку критеріїв: ефективність, безпеку, сумісність із матеріалами, економічність, стійкість до органічного навантаження, швидкість дії, запах, відсутність займистості та вибухонебезпечності, а також простоту у використанні. Отже, розглянемо характеристику декількох засобів за цими критеріями, що були обрані згідно Державного реєстру деззасобів [32] та ГОСТу.

#### **Каустична сода (Додаток А)**

Засіб використовується для знезараження поверхонь, ефективний проти бактерій, вірусів, грибків. Вимагає дотримання заходів безпеки при використанні, зокрема роботи в рукавичках, окулярах, сумісний із більшістю поверхонь, демонструє високу стійкість до органічного навантаження, ефективно розчиняючи жирові відкладення та білкові забруднення. Засіб не є концентрованим, що не дозволяє зменшити витрати при розведенні, є легкорозчинним у воді. Стійкість до органічного навантаження висока (зберігає активність у присутності органічних забруднень), час експозиції до 15-20 хвилин, запах відчутний, але не надмірний. Займистість та вибухонебезпечність відсутня, але потребує обережності при роботі через свою високу лужну активність та тепло, що виділяється при розчиненні у воді.

## **Данаклін (Додаток Б)**

Засіб має широкий спектр дії проти бактерій, вірусів, грибків, є відносно безпечним при правильному застосуванні, але потребує засобів індивідуального захисту. Підходить для різних типів поверхонь, вигідний у використанні завдяки концентрованій формулі. Стійкість до органічного навантаження середня, не містить окислювачів, добре змішується з водою, час експозиції від 15 до 60 хв (в залежності від концентрату). Запах мінімальний, займистість та вибухонебезпечність відсутня, легке приготування та застосування.

## **ДІ-ХЛОР (Додаток В)**

Хлорвмісний засіб, високоефективний проти бактерій, вірусів, спор, потребує обережного використання через вміст хлору, може викликати подразнення, розчини не пошкоджують поверхні зі скла, дерева, полімерних матеріалів, кахлю, лінолеуму, фаянсу, поверхні з лакофарбовим, гальванічним та полімерним покриттям. Дуже економічний завдяки низькій вартості та ефективності при низьких концентраціях. Стійкість до органічного навантаження висока. Швидкість експозиції - 10-20 хвилин, залежить від концентрації. Наявний відчутний запах хлору, займистість та вибухонебезпечність відсутня. Простота у використанні - потребує точного дозування, оскільки може залишати сліди.

## **Бланідас, марка А (Додаток Г)**

Засіб має широкий спектр дії, ефективний проти бактерій, грибків, вірусів. Безпечний при використанні, не спричиняє корозії металів, не пошкоджують об'єкти з термостабільних та термолабільних матеріалів. Легко змивається і розводиться у воді, не залишаючи слідів чи нальоту. Помірно економічний у використанні, стійкість до органічного навантаження висока, швидкість експозиції 60 хвилин (в залежності від концентрації). Запах легкий, не різкий, займистість та вибухонебезпечність відсутня.

## **ДЕЗОВІР (Додаток Д)**

Засіб містить гліцерин і Д-пантенол, які захищають шкіру від сухості й подразнень, підтримуючи її еластичність і водно-жировий баланс. Має добрі миючі, змочувальні та очищувальні властивості, ефективно видаляє механічні й біологічні забруднення, має рН

6,5–7,5. Призначений для гігієнічної та хірургічної антисептики рук, обробки шкіри пацієнтів, дезінфекції поверхонь і медичних виробів - як у побуті, так і на підприємствах.

### **Лесо DS-E80 (Додаток Ж)**

Ефективний антисептик для дезінфекції рук, шкіри та поверхонь, включно з медичними й косметологічними виробами. Містить етиловий спирт, четвертинні амонієві сполуки, пролонговані компоненти (до 3 годин дії) та засоби для догляду за шкірою. Має бактерицидні, віруліцидні, фунгіцидні й спороцидні властивості, належить до IV класу малонебезпечних речовин. Легкозаймистий - лише для зовнішнього застосування. Протипоказаний дітям, вагітним, при алергії до компонентів, несумісний з йодовмісними препаратами, може підвищувати чутливість шкіри до сонця.

Отже, узагальнюючу характеристику оглянутих вище миючих і дезінфікуючих засобів та засобів для обробки рук персоналу наведено у таблиці 5.1.

Узагальнююча таблиця характеристики мийно-дезінфікувальних засобів

Назва засобу	Склад	Антимікробна дія	Характеристика	Сумісність з оброблюваними поверхнями	Спосіб застосування (концентрація робочого розчину)	Відомості про державну реєстрацію	Ціна	Джерело
<i>Засоби для миття та дезінфекції обладнання</i>								
Каустична сода	NaOH	Бактерії, віруси, гриби, спори	Лугова речовина представлена у формі дрібних гранул, що швидко розчиняються у воді. При використанні рекомендується використовувати засоби індивідуального захисту (рукавички, маску та окуляри), також засипати гранули повільно (через виділення тепла), уникати вдихання парів. Після використання провітрити приміщення.	Відсутня шкідлива дія на матеріали об'єктів, виготовлених з металів, скла, ефективно розчиняє жирові відкладення, білкові забруднення та органічні залишки. Змивання робочого розчину засобу з оброблюваних поверхонь після дезінфекції непотрібне.	Розчини готують шляхом розведення гранул у воді (300-500 г у розведенні на 1 л). Способи обробки: ручний, механізований	Мийний засіб відповідає згідно СТО 00203275-206-2007	1 кг коштує 105 грн	[33]

Данаклін	2-феноксіетанол - 2.0%+0,05: катіоактивні ПАР, неіоногенні ПАР - до 5,0% халатний комплекс, антикорозійний комплекс, Ph регулятор. інші функціональні добавки, вода демінералізована (очищена).	Бактерії, віруси, гриби, спори	Засіб є рідиною, від світло жовтого до зеленого кольору, із слабким запахом. використаної сировини (за потреби, може додаватись віддушка). Величина Ph 0,5% - 5% розчину - 7,5 - 10,5. Робочі розчини засобу мають гарні миючі, дезодоруючі, змочувальні, властивості, усувають неприємні запахи.	Не пошкоджує вироби і поверхні з різних матеріалів, забруднення різних походжень, є не горючим, пожежо- та вибухо небезпечним. Не містить окислювачів та добре змішується з водою в будь яких співвідношеннях.	Розчини готують шляхом розведення у холодній чи гарячій воді у концентраціях від 0,5% до 5%. Способи обробки: ручний, механізований.	Мийний засіб внесено до Державного реєстру дезінфекційних засобів 2020 року за №2240. Дата внесення: 10.06.2020 року. Термін дії до: 10.06.2025 року	1 л коштує 309	[34]
<i>Засоби для миття та дезінфекції приміщень</i>								
ДІ-ХЛОР	Дихлорізоціанурат натрію – 84,0 (діюча речовина); адипінова кислота 8,0 %, карбонат натрію 8,0 % (допоміжні речовини). Вміст активного хлору в засобі 45,5 %.	Бактерії, віруси, гриби, спори	Препарат випускається у формі білих таблеток круглої форми масою 3,45–3,65 г, при розчиненні у воді одна таблетка вивільняє 1,47–1,62 г активного хлору. Засіб добре розчиняється у воді, утворюючи прозорий, безбарвний розчин із легким запахом хлору. Використовується для дезінфекції обладнання, інвентарю, тари та поверхонь у виробничих і підсобних приміщеннях.	Розчини не пошкоджують поверхні зі скла, дерева, полімерних матеріалів, кахлю, лінолеуму, фаянсу, поверхні з лакофарбовим, гальванічним та полімерним покриттям, предмети виготовлені із корозійностійких металів, скла, гуми і пластмас.	У вигляді робочих водних розчинів, бактерицидна концентрація яких встановлена 0,015-0,03% (за активним хлором) та в залежності від об'єкта при температурі 18-20 °С. Способи обробки: ручний, механізований.	Дезінфекційний засіб внесено до Державного реєстру дезінфекційних засобів 2020 року за №3038. Дата внесення: 28.12.2020 року. Термін дії до: 28.12.2025 року	1 кг коштує 520 грн	[35]

Бланидас, марка А	1-бром-3-хлор-5,5-диметилгідантоїн - 20,0-22,0%; 5,5-диметилгідантоїн, вміст хлорброду становить не менше 19,5%	Бактерії, віруси, гриби, спори	Засіб представляє собою сипучий порошок від білого до світло-жовтого кольору з легким запахом хлору, водні розчини прозорі та безбарвні. Використовується для дезінфекції обладнання, інвентарю, тари та поверхонь у виробничих і підсобних приміщеннях.	Робочі розчини не викликають корозії металів, не пошкоджують об'єкти з термостабільних та термолабільних матеріалів, добре змиваються і не залишають плям або нальоту на оброблених поверхнях, ефективно видаляють механічні, білкові, жирові забруднення.	Робочі розчини дезінфекційного засобу готують у тарі з будь-якого матеріалу, крім оцинкованого заліза, розчиняючи порошок у воді при помішуванні протягом 1–2 хвилин. Концентрації - 0,5–2,5%. Для прискорення розчинення можна використовувати гарячу воду температурою 60–65 °С. Способи обробки: ручний, механізований.	Дезінфекційний засіб внесено до Державного реєстру дезінфекційних засобів 2020 року. Дата внесення: 15.07.2020 року. Термін дії до: 15.07.2025 року	1 кг коштує 758 грн	[36]
----------------------	--	---	---	--	---	---	---------------------	------

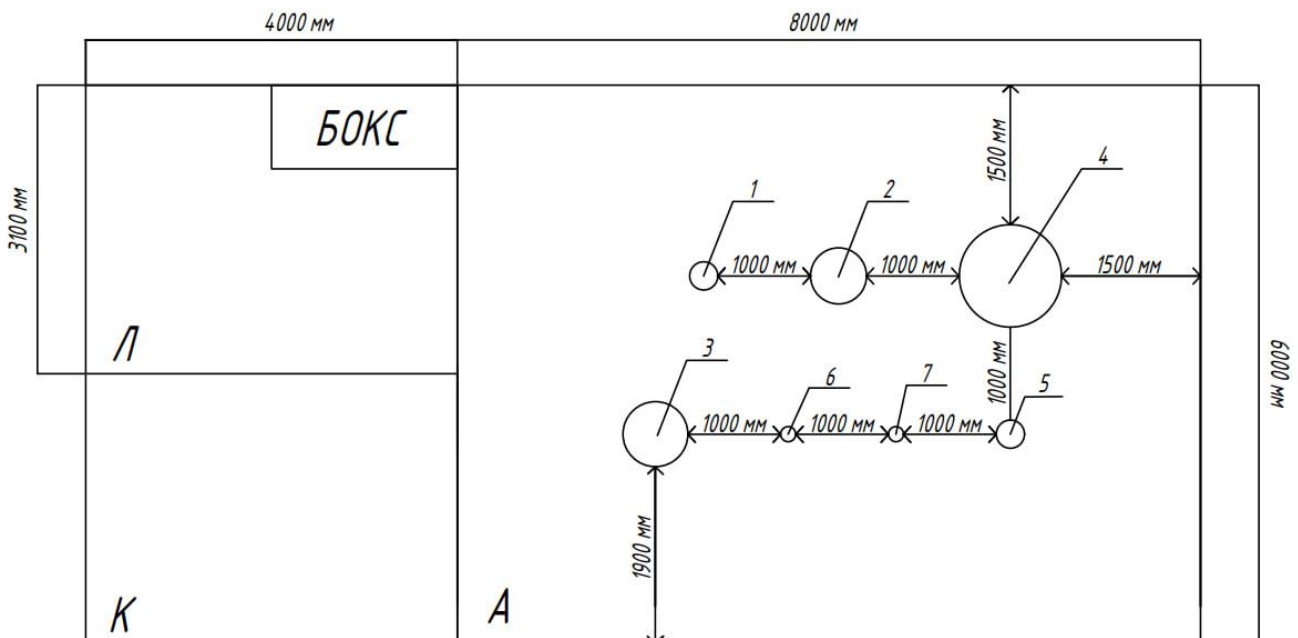
## Засоби для обробки рук персоналу

ДЕЗОВІР	2-Пропанол (ізопропиловий спирт) - 70-75% Пероксид водню- 0,4-0,5% Хлоргексидину біглюканат - 0,50-0,55% Функціональні добавки: комплекс догляду за шкірою, запашка, дистильована вода	Бактерії, віруси, гриби, спори	Засіб представляє собою безбарвний розчин. Має нейтральний рН у межах 6,5–7,5. Призначений для гігієнічної та хірургічної антисептичної обробки рук.	Характеризується добрими змочувальними, миючими й очищувальними властивостями, ефективно розчиняє та видаляє як механічні, так і біологічні забруднення.	–	Дезінфекційний засіб внесено до Державного реєстру дезінфекційних засобів 2020 року. Дата внесення: 15.07.2020 року. Термін дії до: 15.07.2025 року	1 л коштує 165 грн	[37]
Leco DS-E80	Етиловий спирт 75-80%, сумарна вага: алкіл (C12-C18) диметилбензол амонію хлорид, алкіл (C12-(14) диметилетилбензил амонію хлорид 0,2-0,26%, хлоргексидин беглюканат 0,1-0,4%.	Бактерії, віруси, гриби, спори	Засіб представляє собою безбарвний розчин, належить до IV класу малонебезпечних речовин. Призначений для гігієнічної та хірургічної антисептичної обробки рук.	Характеризується добрими змочувальними, миючими й очищувальними властивостями, ефективно розчиняє та видаляє як механічні, так і біологічні забруднення.	–	Дезінфекційний засіб внесено до Державного реєстру дезінфекційних засобів 2020 року. Дата внесення: 3.08.2020 року. Термін дії до: 3.08.2025 року	1 л коштує 240 грн	[38]

### 5.3.2. Розрахунок витрат мийних та дезінфікуючих засобів

Процес виробництва антибіотика лотилібцину із застосуванням бактерій *Lysobacter* WAP-8294A триває 30 днів і передбачає підготовку такого обладнання: інокулятори місткістю 20 і 160 літрів, ферментер для основного виробництва об'ємом 1250 літрів, реактори-змішувачі, що використовуються для підготовки та стерилізації поживного середовища й титрувальних розчинів, качалки, а також спеціальні бокси та лабораторне оснащення. Виробничий процес відбувається у таких приміщеннях: біотехнологічний цех для біосинтезу, лабораторія для виконання допоміжних операцій, оснащена автоклавами, термостатами, холодильниками, ламінарним боксом та обладнанням для проведення необхідних контрольних процедур.

На *рисунку 5.1* зображено орієнтовну схему приміщення, призначеного для отримання лотилібцину. При проектуванні приміщення враховані габарити обладнання, а також мінімальні необхідні відстані між апаратами (не менше 1 метра) і від стін (1–1,5 метра).



*Рис. 5.1. Ескіз плану виробничого приміщення для виробництва лотилібцину з використанням *Lysobacter* WAP-8294A (А – цех виробничого біосинтезу та вирощування інокуляту (1 – інокулятор об'ємом 20 л (I-10), 2 – інокулятор об'ємом 160 л (I-15), 3 –*

реактор-змішувач (P-19) об'ємом 200 л для приготування композиції А, 4 - ферментер (Ф-31) об'ємом 1250 л, 5 - реактор-змішувач (P-13) об'ємом 20 л для приготування композиції А, 6 – реактор-змішувач (P-22) для приготування композиції Б, 7 – реактор-змішувач (P-26) для приготування композиції В; Л – мікробіологічна лабораторія; К – приміщення з качалками).

Для біотехнологічних виробництв, що використовують ферментаційне обладнання значного об'єму (ферментери від 1 м<sup>3</sup> і більше), доцільно враховувати будівельні норми. Виходячи з цього, ширину будівлі приймаємо відповідно до найближчого стандартного значення – 12 м. Довжина будівлі має бути кратною довжині стандартних будівельних плит, тобто 6 м. Габаритні параметри основного обладнання подано в таблиці 5.2.

**Таблиця 5.2**

**Габаритні розміри основного обладнання для виробництва лотилібцину із застосуванням *Lysobacter WAP-8294A***

Обладнання	Геометричний об'єм, л	Діаметр, м	Висота, м
Ферментер	1250	1,1	1,65
Інокулятор (I-10)	20	0,3	0,5
Інокулятор (I-15)	160	0,6	0,9
Реактор-змішувач (P-19) для приготування композиції А	200	0,7	1,1
Реактор-змішувач (P-13) для приготування композиції А	20	0,3	0,5
Реактор-змішувач (P-22) для приготування композиції Б	5	0,16	0,24
Реактор-змішувач (P-26) для приготування композиції В	5	0,16	0,24
<b>Всього</b>	<b>1660</b>		

Згідно з даними таблиці 5.2, загальний обсяг реакторів-змішувачів та апаратів для вирощування посівного матеріалу і біосинтезу складає 1,660 м<sup>3</sup>.

Для підтримки чистоти виробничих приміщень підлога миється щодня, тобто 30 разів на рік. Генеральне прибирання (обробка стін, підлоги, вікон тощо) проводиться один раз на місяць, тобто раз на 30 днів. Для розрахунку кількості мийних засобів необхідно визначити приблизну площу, що підлягає обробці мийними та дезінфікуючими засобами, враховуючи площу підлоги та стін до висоти. Оскільки деякі компоненти поживного середовища подаються до ферментера самоплином, слід також врахувати, що частина обладнання розташована над ним. Згідно з апаратною схемою, на висоті 3,8 м над ферментером знаходяться: реактор-змішувач (P-22) для приготування композиції Б, та реактор-змішувач (P-26) для приготування композиції В. Площа підлоги цеху виробничого біосинтезу складає 32 м<sup>2</sup> (8×4 м), а площа стін розраховується за формулою:  $[(8 \times 4) + (6 \times 6)] \times 2 = 136 \text{ м}^2$ . Загальна площа обробки складає  $32 + 136 = 168 \text{ м}^2$ . Показники загальної площі поверхні для обробки мийними засобами наведено в таблиці 5.3.

**Таблиця 5.3**

**Розрахунок загальної площі стін та підлоги виробничих приміщень**

Приміщення	Площа підлоги, м <sup>2</sup>	Площа стін, м <sup>2</sup>	Загальна площа, м <sup>2</sup>
Цех виробничого біосинтезу та вирощування інокуляту	32	136	168
Мікробіологічна лабораторія	12,4	96,8	109
Приміщення з качалками	11,6	94,4	106
<b>Загальна площа</b>	<b>56</b>	<b>327</b>	<b>383</b>

Виробництво лотилібцину передбачає три виробничі цикли. Оскільки перед кожним циклом проводиться миття обладнання, а після завершення останнього циклу виконується додаткове миття, загальна кількість процесів миття становить чотири. Таким чином, сумарний об'єм води для миття дорівнює:

$$1,660 \times 4 = 6,64 \text{ м}^3.$$

Узагальнені результати розрахунку площі миття та/або дезінфекції за весь виробничий період подано в таблиці 5.4.

**Розрахунок загальної площі миття оброблюваного об'єкту за весь період біосинтезу лотилібцину *Lysobacter sp.* WAP-8294**

Об'єкт миття та/або дезінфекції	Площа (об'єм) оброблюваного об'єкту, м <sup>2</sup> (м <sup>3</sup> )	Кількість процесів миття та/або дезінфекції за весь період виробництва	Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м <sup>2</sup> (м <sup>3</sup> )
Обладнання	1660	4	6640
Підлога	56	30	1680
Стіни, двері, вікна	327	1	327

Для миття ємностей використовується СІР-мийка. Витрати робочого розчину складають від 20 до 30% від об'єму обладнання, яке підлягає миттю. Приймаючи середній рівень витрат 22%, для очищення та дезінфекції 6,64 м<sup>3</sup> обладнання необхідно використовувати:

$$6,64 \times 0,22 = 1,461 \text{ м}^3 \text{ засобу на рік.}$$

Інформацію про вибір мийних і дезінфікуючих засобів доцільно подавати у вигляді узагальненої таблиці 2.4. При виборі таких засобів важливо враховувати їх ефективність, вартість, а також витрати на обробку необхідної площі або об'єму. Зазвичай для обробки 1 м<sup>2</sup> поверхні потрібно 100 мл мийного чи дезінфікуючого розчину.

Згідно з результатами розрахунків, наведених у таблиці 5.5, серед усіх проаналізованих мийних і дезінфекційних засобів найоптимальнішим вибором для обробки обладнання є «Данаклін», а для очищення поверхонь обладнання, стін, вікон, дверей і підлоги — «ДІ-ХЛОР». Обидва засоби відзначаються низькою сумарною вартістю за весь період виробничого біосинтезу (30 днів), що є важливим економічним чинником у виробництві, а також високою ефективністю у використанні.

Водночас важливо враховувати необхідність запобігання виникненню стійких до дезінфікуючих засобів форм мікроорганізмів. Для цього рекомендовано періодично

змінювати використовувані засоби відповідно до затвердженого графіка чергування, зазвичай кожні 1–3 місяці. Як альтернатива «Данакліну» для обробки обладнання може застосовуватись «Каустична сода», а замість «ДІ-ХЛОР» для обробки поверхонь та приміщень — «Бланидас, марка А».

## Узагальнена характеристика витрат мийних та дезінфікувальних засобів для виробництва лотилібцину

Назва мийного/дезінфікувального засобу (діюча речовина)	Об'єкт миття та/або дезінфекції	Концентрація робочого розчину, %	Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м <sup>2</sup>	Кількість робочого розчину за весь період виробництва, л	Вартість 1 л/кг мийного або дезінфікувального засобу, грн	Вартість 1 л робочого розчину, грн	Загальна вартість миття та/або дезінфекції за весь період виробництва, грн
Каустична сода <sup>1</sup> (NaOH)	Обладнання	30	6640	1461	105	31,5	46022
Данаклін <sup>2</sup> (ПАР)	Обладнання	0,5	6640	1461	309	1,55	2264,5
ДІ-ХЛОР <sup>3</sup> (DCCNa)	Поверхні обладнання, приміщень	0,3	8647	1902	520	1,56	2967,1
Бланидас, марка А <sup>4</sup> (диметилгідантоїн; 5,5-диметилгідантоїн натрію)	Поверхні обладнання, приміщень	0,5	8647	1902	758	3,79	7208,6

1-[https://klebrig.com.ua/ua/p902982226-kausticheskaya-soda-natrij.html?source=merchant\\_center&utm\\_source=google&utm\\_medium=cpc&utm\\_campaign=PMax\\_2\\_cat&utm\\_content=prodid\\_&utm\\_term=gclid\\_Cj0KCQjwzrzABhD8ARIsANISWNOWvzbIG\\_qjO1dmH3tprjSBgkq9xtIV\\_kBPLq3\\_KrFb\\_MMz2wlu-saAhLREALw\\_wcB&gad\\_source=1&gclid=Cj0KCQjwzrzABhD8ARIsANISWNOWvzbIG\\_qjO1dmH3tprjSBgkq9xtIV\\_kBPLq3\\_KrFb\\_MMz2wlu-saAhLREALw\\_wcB](https://klebrig.com.ua/ua/p902982226-kausticheskaya-soda-natrij.html?source=merchant_center&utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=PMax_2_cat&utm_content=prodid_&utm_term=gclid_Cj0KCQjwzrzABhD8ARIsANISWNOWvzbIG_qjO1dmH3tprjSBgkq9xtIV_kBPLq3_KrFb_MMz2wlu-saAhLREALw_wcB&gad_source=1&gclid=Cj0KCQjwzrzABhD8ARIsANISWNOWvzbIG_qjO1dmH3tprjSBgkq9xtIV_kBPLq3_KrFb_MMz2wlu-saAhLREALw_wcB)

2-[https://hlorka.in.ua/ua/p2517052953-danaklin-universalnyj-1000.html?srsId=AfmBOorJc9CwZGr4Qs9wk5HBS\\_qt6UKE65k4JmXVZq3NzCHdi\\_YVAHpc](https://hlorka.in.ua/ua/p2517052953-danaklin-universalnyj-1000.html?srsId=AfmBOorJc9CwZGr4Qs9wk5HBS_qt6UKE65k4JmXVZq3NzCHdi_YVAHpc)

3-<https://pestco.com.ua/ua/products/tabletki-di-hlor-dezinfikuyuchiy-zasib-1-kg-300-tab.html?srsId=AfmBOorjdGWKKnU0KinBxB3HDh4zM00-OnhZt6oZAGA5U58Qx7R1xSud>

4-<https://hlorka.in.ua/ua/p773525745-blanidas-marka.html#:~:text=Бланидас%20марка%20А%20-%20хлорний%20дезінфікуючий,%20%20басейнів%20%20води%20та%20ін.>

#### 5.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Для виробничого біосинтезу лотилібцину *Lysobacter sp.* WAP-8294 використовується середовище такого складу (г/л) [5]:

- Глюкоза - 25;
- Знежирене соєве борошно - 20;
- соєва олія - 4;
- NaCl - 2,5;
- CaCO<sub>3</sub> - 5;
- рН середовища - 7,2.

Згідно з розрахунками, наведеними у розділі 1, виробничий біосинтез здійснюється у ферментері об'ємом 1,25 м<sup>3</sup>, що містить 0,63 м<sup>3</sup> поживного середовища. Підготовка інокуляту відбувається у чотири стадії: в колбах на качалці, в інокуляторах об'ємом 20 і 160 л та посівному апараті об'ємом 1,25 м<sup>3</sup>.

Для визначення оптимальних методів приготування компонентів середовища та вибору відповідних ємностей (колб, реакторів) важливо розрахувати необхідну кількість компонентів для кожної стадії виробництва.

*Таблиця 5.6*

#### *Розрахунок вмісту та особливості приготування титрувальних розчинів*

Об'єм середовища, л	HCl (6%)		NaOH	
	Об'єм, мл	Особливість приготування	Об'єм, мл	Особливість приготування
1	-	-	-	-
9	18	у колбі на 25 мл	18	у колбі на 25 мл

## Закінчення таблиці 5.6

73	146	у колбі на 150 мл	146	у колбі на 150 мл
630	1260 (1,26 л)	у колбі на 2 л	1260 (1,26 л)	у колбі на 2 л

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

Проаналізувавши склад поживного середовища, умовно ділимо його на такі композиції (залежно від режиму стерилізації компонентів):

Композиція А: знежирене соєве борошно (спочатку борошно заварюють при 70-90°C впродовж 30 хв), глюкоза, соєва олія (режим стерилізації: 112 °C, 30 хв).

Композиція Б: NaCl (режим стерилізації: 131 °C, 40 хв).

Композиція В: CaCO<sub>3</sub> (режим стерилізації: 131 °C, 40 хв).

Компоненти композиції А є термостабільними, а отже вимагають м'якої стерилізації, сіль Натрію стерилізують при стандартній температурі. Обидві композиції далі стерилізують в автоклаві. Композиція А також має найбільшу кількість компонентів, тому на неї буде використовуватись найбільша кількість води.

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках наведений у табл. 5.7:

**Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці**

<b>Компонент поживного середовища</b>	<b>Вміст, г/л</b>	<b>Кількість для приготування 1000 мл (1л) середовища, г</b>	<b>Композиції</b>	<b>Об'єм композиції, V, мл</b>
Глюкоза	25	25 г	А	400 мл
Соєва олія	4	4 г		
<b>Вода</b>		<b>300 мл</b>		
Знежирене соєве борошно	20	20 г		
<b>Вода</b>		<b>100 мл</b>		
NaCl	2,5	2,5 г	Б	400 мл
<b>Вода</b>		<b>400 мл</b>		
CaCO <sub>3</sub>	5	5 г	В	200 мл
<b>Вода</b>		<b>200 мл</b>		
<b>Усього</b>				<b>1000 мл</b>

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

Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 20 л

Для здійснення культивування в інокуляторі об'ємом 20 л, необхідно приготувати 9 л поживного середовища. Склад композицій та умови їх стерилізації аналогічні пункту

5.4.1., а композицію А так само заварюється і стерилізується окремо. Розподіл води, та розрахунок компонентів наведено в табл. 5.8:

*Таблиця 5.8.*

**Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 20 л**

<b>Компонент поживного середовища</b>	<b>Вміст, г/л</b>	<b>Кількість для приготування 9 л середовища, г (мл)</b>	<b>Композ иції</b>	<b>Об'єм композиції, V, л</b>
Глюкоза	25	225 г	А	2 л
Соева олія	4	36 г		
<b>Вода</b>		<b>1 л</b>		
Знежирене соєве борошно	20	180 г		
<b>Вода</b>		<b>1 л</b>		
NaCl	2,5	22,5 г	Б	4,8 л
<b>Вода</b>		<b>4,4 л</b>		
<b>Конденсат</b>		<b>0.4</b>		
CaCO <sub>3</sub>	5	45 г	В	2,2 л
<b>Вода</b>		<b>2,2 л</b>		
<b>Усього</b>				<b>9 л</b>

Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 160 л

Для цієї стадії необхідно 73 л поживного середовища, склад композицій та умови їх стерилізації аналогічні пункту 5.4.1, враховуємо 10% цього об'єму - конденсат. Композиція А так само заварюється і стерилізується окремо. Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 160 л наведений у табл. 5.9:

*Таблиця 5.9.*

**Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 160 л**

<b>Компонент поживного середовища</b>	<b>Вміст, г/л</b>	<b>Кількість для приготування 73 л середовища, г (мл)</b>	<b>Композиції</b>	<b>Об'єм композиції, V, л</b>
Глюкоза	25	1,83 кг	А	15,2 л
Соева олія	4	292 г		
Знежирене соєве борошно	20	1,5 кг		
<b>Вода</b>		<b>15 л</b>		
<b>Конденсат</b>		<b>0,2 л</b>		
NaCl	2,5	182,5 г	Б	45 л
<b>Вода</b>		<b>45 л</b>		
CaCO <sub>3</sub>	5	365 г	В	3,5 л
<b>Вода</b>		<b>3,5 л</b>		
<b>Усього</b>				<b>65,7 л</b>

### 5.4.3. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 1,25 м<sup>3</sup>

Для цієї стадії необхідно 0,63 м<sup>3</sup> поживного середовища. Композиція А потребує попереднього розварювання в окремому реакторі-змішувачі, в якому й стерилізуються. Композиція Б та Композиція В також розчиняють і стерилізують в окремих реакторах-змішувачах при стандартній для цих солей температурі. Склад композицій та умови їх стерилізації аналогічні пункту 5.4.2, враховуємо 10% цього об'єму - конденсат. Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 1,25 м<sup>3</sup> наведений у табл. 5.10:

*Таблиця 5.10.*

#### Склад композицій для стерилізації поживного середовища у ферментері об'ємом 1,25 м<sup>3</sup>

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 0,63 м <sup>3</sup> середовища, кг	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Глюкоза	25	15,8 кг	А	171,7 л
Соева олія	4	2,52 кг		
Знежирене соєве борошно	20	13 кг		
Вода		170 л		
<b>Конденсат</b>		<b>1,7 л</b>		
NaCl	2,5	1,6 кг	Б	254 л
Вода		231 л		
<b>Конденсат</b>		<b>23 л</b>		

*Закінчення таблиці 5.10.*

CaCO <sub>3</sub>	5	3,2 кг	В	198 л
Вода		180 л		
Конденсат		18 л		
<b>Усього</b>				<b>623,7 л</b>

## РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання

*Таблиця 6.1*

### Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу лотилібцину

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
ПЗ-1	Повітрозабірник	1	Шахта вентиляційна. 500 мм із АБС-пластику. Вентиляційні труби мають довжину 140 метрів, товщина стінки димоходу становить 30 мм, містить дифузор. Виробник: «Prolisok», Україна [39].
Ф-2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтр CFM (G2). Фільтруючий матеріал – плетена алюмінієва проволка, ефективність очистки - 75 %, швидкість очищення - 2 м/с. Виробник: «General filter», Італія [40].
К-3	Компресор	1	Гвинтовий компресор ВК 20PSMA-16-500Д з осушувачем повітря. Максимальний тиск - 16 бар, продуктивність - 1400 л/хв, потужність - 15 кВт. Виробник: «Лідер», Україна [41].

<i>НУХТ БТЕК 04.01.30 КР ПЗ</i>				
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>
<i>Розробив</i>		<i>Кузнєцова С.В.</i>		
<i>Перевірів</i>		<i>Красінько В.О.</i>		
<i>Реценз.</i>				
<i>Н. Контр.</i>				
<i>Зав. каф.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>		
<i>РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання</i>				
		<i>Літера</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркушів</i>
			52	82
<i>Кафедра БТМ</i>				

Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Кожухотрубний теплообмінник “Ангара” ESK-71 з нержавіючої сталі. Сумарна продуктивність – 71,5 кВт, витрати води – 11,5 м <sup>3</sup> /год, робочий тиск від 6 до 30 бар. Виробник: «Далгакиран», Україна [42].
Р-5	Ресивер	1	Ресивер об’єм 0.25 – 0.90 м <sup>3</sup> , тиск від 11 до 50 бар, наявна комплектація для відділення конденсату. Виробник: «Kaeser», Німеччина [43].
Т-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Водяний нагрівач повітря НКВ 400x200-2. Витрата повітря - 1100 м <sup>3</sup> /год, максимальний робочий тиск - 1,6 МПа та температура води - 100 °С. Виробник: «VENTS», Україна [44].
Ф-7	Головний фільтр очистки	1	Фільтр PFGI із нержавіючої сталі, ущільненим сіліконовим корпусом. Довжина картриджа від 12,7 до 76,2 см. Робочий тиск - 10 бар, робоча температура - 150 °С. Виробник: «Masterfilter», Європа [45].
ІФ-8	Індивідуальний фільтр очистки повітря	1	Фільтр PFGG із нержавіючої сталі, ущільненим сіліконовим корпусом. Довжина картриджа від 2 до 11 см. Діаметр вхідного/вихідного отвору від 50,8 до 127 мм. Робочий тиск - 10 бар, робоча температура - 150 °С. Виробник: «Masterfilter», Європа [46].

*Продовження таблиці 6.1*

Д-9	Об'ємний дозатор для подачі води	1	Лічильник-дозатор для води. Об'єм дозуючої води від 10 мл до 9999л; робочий тиск 0,5 атм – 10 атм. Виробник: «Agro-teh», Україна [47].
I-10	Інокулятор	1	Біореактор на 20 л. Робочий тиск - 3 бар, робоча температура до +160 °С, швидкість обертання - до 300 об/хв. Оснащений сорочкою, барботером, плавно-регульованою мішалкою, системою автоматичного піногасіння та регулювання рН. Виробник: «Промвіт», Україна [48].
ІФ-11	Індивідуальний фільтр очистки повітря	1	Фільтр PFGG із нержавіючої сталі, ущільненим сіліконовим корпусом. Довжина картриджа від 2 до 11 см. Діаметр вхідного/вихідного отвору від 20 до 50 мм. Робочий тиск - 10 бар, робоча температура - 150 °С. Виробник: «Masterfilter», Європа [46].
Д-12	Ваговий дозатор для подачі компонентів композиції А	1	Ваговий дозатор для рідин. Мінімальна межа дозування – 100 г, максимальна – 60 кг; напруга: 220 В. Виробник: «Agro-teh», Україна [49].
Р-13	Реактор-змішувач для приготування композиції А	1	Реактор лабораторний 20 літрів з нержавіючої сталі з мішалкою та сорочкою. Потужність реактора - 6 кВт, Частота обертання гомогенізатору до 3000 об/хв, діапазон регулювання температури сорочки до +95°С. Виробник: «STS Group», Україна [50].
Д-14	Об'ємний дозатор для подачі води	1	Лічильник-дозатор для води. Об'єм дозуючої води від 10 мл до 9999л; робочий тиск 0,5 атм – 10 атм. Виробник: «Agro-teh», Україна [47].

*Продовження таблиці 6.1*

I-15	Інокулятор	1	Реактор DCI з нержавіючої сталі на 160 л. Робочий тиск - 3 бар, максимальна температура нагрівання - 190°C. Внутрішня частина бака і кришки покрита бісфенолом, має дволопатову мішалку, швидкість обертання - до 345 об/хв [51].
Д-16	Об'ємний дозатор для подачі води	1	Лічильник-дозатор для води. Об'єм дозуючої води від 10 мл до 9999л; робочий тиск 0,5 атм – 10 атм. Виробник: «Agro-teh», Україна [47].
ІФ-17	Індивідуальний фільтр очистки повітря	1	Фільтр PFGG із нержавіючої сталі, ущільненим сіліконовим корпусом. Довжина картриджа від 2 до 11 см. Діаметр вхідного/вихідного отвору від 20 до 50 мм. Робочий тиск - 10 бар, робоча температура - 150 °С. Виробник: «Masterfilter», Європа [46].
Д-18	Ваговий дозатор для подачі компонентів композиції А	1	Ваговий дозатор для рідин. Мінімальна межа дозування – 100 г, максимальна – 60 кг; напруга: 220 В. Виробник: «Agro-teh», Україна [49].
Р-19	Реактор-змішувач для приготування композиції А	1	Реактор моделі ТТ-RG200/300ЕхМ на 200 л, з боросилікатного скла, робоча температура - 300 °С, . Зовнішні габарити: 2500x800x800 мм. Потужність від 50 до 700 об/хв. Виробник: «Титан Техникс» [52].
Д-20	Об'ємний дозатор для подачі води	1	Лічильник-дозатор для води. Об'єм дозуючої води від 10 мл до 9999л; робочий тиск 0,5 атм – 10 атм. Виробник: «Agro-teh», Україна [47].

*Продовження таблиці 6.1*

Н-21	Насос відцентровий для перекачування композиції А в ферментер	1	Відцентровий поверхневий насос моделі CS 50-160 С. Потужність: 4 кВт; тиск: 10 бар; максимальний напір: 25 м; матеріал: чавун; продуктивність: 72 м <sup>3</sup> /год (1200 л/хв). Виробник: «Speroni», Україна [53].
Р-22	Реактор-змішувач для Композиції Б	1	Скляний хімічний реактор на 5 л з нержавіючої сталі. Виробник: «Amerging Technologies», Індія [33].
Д-23	Об'ємний дозатор для подачі води композиції Б	1	Лічильник-дозатор для води. Об'єм дозуючої води від 10 мл до 9999л; робочий тиск 0,5 атм – 10 атм. Виробник: «Agro-teh», Україна [47].
Д-24	Ваговий дозатор для подачі компонентів композиції Б	1	Ваговий дозатор для рідин. Мінімальна межа дозування – 100 г, максимальна – 60 кг; напруга: 220 В. Виробник: «Agro-teh», Україна [49].
Н-25	Насос відцентровий для перекачування композиції Б в ферментер	1	Відцентровий поверхневий насос моделі CS 50-160 С. Потужність: 4 кВт; тиск: 10 бар; максимальний напір: 25 м; матеріал: чавун; продуктивність: 72 м <sup>3</sup> /год (1200 л/хв). Виробник: «Speroni», Україна [53].
Р-26	Реактор-змішувач для Композиції В	1	Скляний хімічний реактор на 5 л з нержавіючої сталі. Виробник: «Amerging Technologies», Індія [54].
Д-27	Об'ємний дозатор для подачі води композиції В	1	Лічильник-дозатор для води. Об'єм дозуючої води від 10 мл до 9999л; робочий тиск 0,5 атм – 10 атм. Виробник: «Agro-teh», Україна [47].

*Закінчення таблиці 6.1*

Д-28	Ваговий дозатор для подачі компонентів композиції В	1	Ваговий дозатор для рідин. Мінімальна межа дозування – 100 г, максимальна – 60 кг; напруга: 220 В. Виробник: «Agro-teh», Україна [49].
Н-29	Насос відцентровий для перекачування композиції В у ферментер	1	Відцентровий поверхневий насос моделі CS 50-160 С. Потужність: 4 кВт; тиск: 10 бар; максимальний напір: 25 м; матеріал: чавун; продуктивність: 72 м <sup>3</sup> /год (1200 л/хв). Виробник: «Speroni», Україна [53].
Д-30	Об'ємний дозатор для подачі води	1	Лічильник-дозатор для води. Об'єм дозуючої води від 10 мл до 9999л; робочий тиск 0,5 атм – 10 атм. Виробник: «Agro-teh», Україна [47].
ФР-31	Ферментер	1	Ферментер об'ємом 1250 л. Оснащений сорочкою, барботером, пробовідбірником, лопатевою мішалкою. Робоча температура - 176°C, 10-600 об/хв. Виробник: «SYSBIOTECH» (Австрія) [30].
Н-32	Насос відцентровий для перекачування культуральної рідини у збірник	1	Відцентровий поверхневий насос моделі CS 50-160 С. Потужність: 4 кВт; тиск: 10 бар; максимальний напір: 25 м; матеріал: чавун; продуктивність: 72 м <sup>3</sup> /год (1200 л/хв). Виробник: «Speroni», Україна [53].

## РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми.

### ДР 1. Підготовка стерильного повітря.

#### ДР 1.1. Забір атмосферного повітря.

Забір повітря здійснюється у найвищій точці будівлі (Н=10м) за допомогою вертикальної труби вентиляційної шахти (ПЗ-1).

#### ДР 1.2. Очищення від пилу та механічних часток.

Попереднє очищення повітря від грубих домішок у фільтрі грубого очищення (Ф-2) проводиться з ефективністю  $E=90\%$ . Очищене повітря надходить до компресора (К-3).

#### ДР 1.3. Стиснення повітря.

Щоб забезпечити належну аерацію та подолати гідравлічний тиск рідини в ферментері, а також для інших потреб виробництва, повітря стискається в компресорі (К-3) при цьому повітря нагрівається до  $120\text{--}200\text{ }^{\circ}\text{C}$ , тиск становить  $0,35\text{ МПа}$ .

#### ДР 1.4. Охолодження повітря.

Стиснене повітря, отримане на попередньому етапі, необхідно охолодити в теплообміннику-охолоджувачі (Т-4) до  $25\text{--}30\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Це дозволить видалити надлишкову вологу.

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.30 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми.</i>	<i>Літера</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розробив</i>		<i>Кузнецова С.В.</i>					58	82
<i>Перевірів</i>		<i>Красінько В.О.</i>						
<i>Реценз.</i>								
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Зав. каф.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>			<i>Кафедра БТМ</i>			

## **ДР 1.5. Видалення вологи та нагрівання повітря.**

Для подальшого видалення вологи використовується ресивер (Р-5). Оптимальна вологість повітря після очищення має становити 60-70%. Нагрівання проводиться у теплообміннику-нагрівачі (Т-6) при температурі 40-50 °С, вологість повітря після має становити 50 %.

## **ДР 1.6. Очищення повітря в головному фільтрі.**

Повітря проходить очищення в головному фільтрі (Ф--7), де видаляється 95% залишкових домішок. Зміну фільтрувального матеріалу рекомендується проводити двічі на рік.

## **ДР 1.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі.**

Перед кожним посівним апаратом або ферментером встановлюється індивідуальний фільтр, який забезпечує 99,999% очищення повітря.

## **ДР 2. Приготування титрувальних розчинів**

### **ДР 2.1. Приготування 6%-го розчину HCl**

#### **ДР 2.1.1. Приготування 6%-го розчину HCl для посівного апарату об'ємом 160л**

Для приготування 146 мл 6%-го розчину HCl у термостійку конічну колбу об'ємом 150 мл подають за допомогою мірного циліндру 100 мл дистильованої води та вносять 46 мл 36-% розчину соляної кислоти. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою, перемішують вміст до повного розчинення. Стерильність буде досягнута шляхом змішування концентрованої кислоти зі стерильною водою у асептичних умовах. Після цього, в асептичних умовах.

#### **ДР 2.1.2. Приготування 6%-го розчину HCl для ферментеру об'ємом 1,25м<sup>3</sup>**

Для приготування 1,26 л 6%-го розчину HCl у термостійку конічну колбу об'ємом 2 л подають за допомогою мірного циліндру 0,9 л дистильованої води та подають 0,36 л

36-% розчину соляної кислоти. Стерильність буде досягнута шляхом змішування концентрованої кислоти зі стерильною водою у асептичних умовах.

## **ДР 2.2. Приготування і стерилізація 6%-го розчину NaOH**

### **ДР 2.2.1. Приготування і стерилізація 6%-го розчину NaOH для посівного апарату об'ємом 100л**

Для приготування 146 мл розчину, у колбу об'ємом 150 мл подають за допомогою мірного циліндра 100 мл дистильованої води та вносять наважку 46 г їдкого натру. Вміст перемішують, колбу закривають ватно--марлевою пробкою, передають на стерилізацію в автоклав при температурі 131°C на 40 хв (0,15 МПа).

### **ДР 2.2.2. Приготування і стерилізація 6%-го розчину NaOH для ферментеру об'ємом 1,25м<sup>3</sup>**

Для приготування 1,26 л розчину їдкого натру, у терmostійку конічну колбу об'ємом 2 л подають за допомогою мірного циліндру 0,9 л дистильованої води та подають 36 г їдкого натру. Вміст перемішують до повного розчинення, стерилізують при температурі 131°C на 40 хв (0,15 МПа).

## **ДР 3. Приготування та стерилізація поживних середовищ**

### **ДР 3.1. Приготування і стерилізація поживних середовищ для колб на качалках**

Для здійснення культивування в колбах на качалках, необхідно приготувати 1000 мл поживного середовища, для приготування композицій необхідно використати 1000 мл води, яку розподіляють в залежності від ступеня розчинення компонентів.

#### **ДР 3.1.1. Приготування і стерилізація композиції А**

Найбільшу кількість компонентів містить композиція А, тому для неї будемо використовувати найбільшу кількість води - 400 мл. За допомогою технічних ваг формують наважку знежиреного соєвого борошна масою 20 г після чого переносять в колбу об'ємом 20 мл. Після чого додають 100 мл відміряної дистильованої води. Колбу

ставлять на водяну баню при температурі 75 °С та, при постійному перемішуванні скляною паличкою, заварюють 30 хвилин. Після композицію переносять у колбу на 500 мл, в яку до цього внесли наважку глюкози у 25 г та соєвої олії - 4 г, що були попередньо сформовані за допомогою технічних ваг. Додають 300 мл відміряної дистильованої води та перемішують до повного розчинення. Колбу закривають ватно-марлевым корком та поміщають в автоклав, де впродовж 30 хв відбувається стерилізація при температурі 112 °С.

### **ДР 3.1.2. Приготування і стерилізація композиції Б**

На технічних терезах зважують 2,5 г NaCl, після чого наважку поміщають у колбу об'ємом 500 мл. За допомогою мірного циліндра додають питну воду об'ємом 400 мл, перемішують до повного розчинення скляною паличкою, закривають ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С (40 хв).

### **ДР 3.1.3. Приготування і стерилізація композиції В**

На технічних терезах зважують 5 г CaCO<sub>3</sub>, після чого наважку поміщають у колбу об'ємом 250 мл. За допомогою мірного циліндра додають питну воду об'ємом 200 мл перемішують до повного розчинення скляною паличкою, закривають ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С (40 хв).

## **ДР 3.2. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 20л**

Для здійснення культивування в інокуляторі об'ємом 20 л (I-10), необхідно приготувати 9 л поживного середовища, для приготування композицій необхідно використати 9 л води, яку розподіляють в залежності від ступеня розчинення компонентів.

### **ДР 3.2.1. Приготування і стерилізація композиції А**

Через технічні ваги роблять наважку знежиреного соєвого борошна масою 180 г, після чого переносять в колбу об'ємом 2 л. Після чого додають 1 л відміряної питної води, відбувається нагрівання до температури 75 °С, подачею пари в сорочку апарата, та,

при постійному перемішуванні, суміш заварюють 30 хвилин. Після вносять наважку глюкози у 225 г та соєвої олії - 36 г, що були попередньо сформовані за допомогою технічних ваг. Додають 1 л відміряної питної води, перемішують до повного розчинення. Отриману суміш стерилізують в автоклаві 30 хв при температурі 112 °С.

### **ДР 3.2.2. Приготування і стерилізація композиції Б**

На технічних терезах зважують 22,5 г NaCl, після чого наважку поміщають у інокулятор об'ємом 11 л (I-10). За допомогою об'ємного дозатора для подачі води (Д-9) подають питну воду об'ємом 4,8 л, перемішують до розчинення при нагріванні. Отриманий розчин стерилізують гострою парою 40 хв при температурі 131 °С.

### **ДР 3.2.3. Приготування і стерилізація композиції В**

На технічних терезах зважують 45 г CaCO<sub>3</sub>, після чого наважку поміщають у колбу об'ємом 3 л. За допомогою циліндра подають питну воду об'ємом 2,2 л, перемішують до суспендування при нагріванні. Отриману суспензію стерилізують в автоклаві 40 хв при температурі 131 °С.

## **ДР 3.3. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі місткістю 160л.**

Для здійснення культивування в інокуляторі об'ємом 160 л (I-15), необхідно приготувати 73 л поживного середовища. Потрібно пам'ятати, що 10% припадає на посівний матеріал і 10% складе конденсат, який утвориться при стерилізації поживного середовища в інокуляторі, отже для приготування композицій необхідно використати 65,7 л води, яку розподіляють в залежності від ступеня розчинення компонентів.

### **ДР 3.3.1. Приготування і стерилізація композиції А**

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д-12) подають наважку знежиреного соєвого борошна масою 1,5 кг після чого переносять в реактор (Р-13) об'ємом 20 л. Після чого додають 5 л відміряної питної води за допомогою об'ємного дозатора для подачі води (Д-14), відбувається нагрівання до температури 75 °С, подачею пари в сорочку апарата, та, при постійному перемішуванні, суміш заварюють 30 хвилин. Після вносять наважку

глюкози у 1,83 кг та соєвої олії - 292 г, що були попередньо сформовані за допомогою технічних ваг. Додають 10 л відміряної дистильованої води та перемішують до повного розчинення. Отриману суспензію стерилізують гострою парою 30 хв при температурі 112 °С.

### **ДР 3.3.2. Приготування і стерилізація композиції Б**

На технічних терезах зважують 182,5 г NaCl, після чого наважку поміщають у колбу об'ємом 2 л. За допомогою циліндра додають воду об'ємом 1 л, розчиняють. Перекачують за допомогою конектора у попередньо простерилізований інокулятор об'ємом 160 л (І-15). За допомогою об'ємного дозатора для подачі води (Д-16) подають питну воду об'ємом 44 л. Вмикають перемішуючий пристрій, у сорочку інокулятора подають пару, одночасно подають гостру пару, стерилізують 40 хв при температурі 131 °С (0,15 МПа).

### **ДР 3.3.3. Приготування і стерилізація композиції В**

На технічних терезах зважують 365 г CaCO<sub>3</sub>, після чого наважку поміщають у колбу об'ємом 5 л. За допомогою циліндра подають питну воду об'ємом 3,5 л, перемішують до суспендування при нагріванні. Отриману суспензію стерилізують в автоклаві 40 хв при температурі 131 °С (0,15 МПа).

### **ДР 3.5. Приготування і стерилізація поживного середовища для ферментера об'ємом 1,25м<sup>3</sup>**

Для здійснення культивування у ферментері об'ємом 1,25 м<sup>3</sup> (ФР-31) потрібно 0,63 м<sup>3</sup> поживного середовища. Усі композиції готуються в окремих реакторах-змішувачах. Розрахунок потрібної кількості компонентів для приготування середовища, яке використовуватиметься для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 1,25 м<sup>3</sup>, наведено в таблиці 5.7.4.

#### **ДР 3.5.1. Приготування і стерилізація композиції А**

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д-18) подають наважку знежиреного соєвого борошна масою 13 кг після чого переносять в реактор (Р-19) об'ємом 200 л. Після чого додають 70 л відміряної питної води за допомогою об'ємного дозатора для подачі води

(Д-20), відбувається нагрівання до температури 75 °С, подачею пари в сорочку апарата, та, при постійному перемішуванні, суміш заварюють 30 хвилин. Після вносять наважку глюкози у 15,8 кг та соєвої олії - 2,52 кг, що були попередньо сформовані за допомогою технічних ваг. Додають 100 л відміряної дистильованої води та перемішують до повного розчинення. Отриману суспензію стерилізують гострою парою 30 хв при температурі 112 °С.

### **ДР 3.5.2. Приготування і стерилізація композиції Б**

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д-24) подають наважку 1,6 кг NaCl. у реактор-змішувач об'ємом 5 л (Р-22). За допомогою об'ємного дозатора для подачі води (Д-23) подають питну воду об'ємом 2 л, перемішують до розчинення при нагріванні. Отриманий розчин через насос (Н-25) подають у ферментер (ФР-31), додають через дозатор для подачі води (Д-30) 229 л питної води, вмикають перемішувальний пристрій. Після стерилізують гострою парою 40 хв при температурі 131 °С (0,15 МПа).

### **ДР 3.5.3. Приготування і стерилізація композиції В**

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д-28) подають наважку 3,2 кг CaCO<sub>3</sub>. у реактор-змішувач об'ємом 5 л (Р-26). За допомогою об'ємного дозатора для подачі води (Д-27) подають питну воду об'ємом 1,5 л, перемішують до розчинення при нагріванні. Отриманий розчин через насос (Н-29) подають у ферментер (ФР-31), додають через дозатор для подачі води (Д-30) 229 л питної води, вмикають перемішувальний пристрій. Після стерилізують гострою парою 40 хв при температурі 131 °С (0,15 МПа).

## **ТП 4. Підготовка посівного матеріалу**

### **ТП 4.1. Підтримання колекційної культури**

Отримана колекційна культура *Lysobacter sp.* WAP-8294 зберігається у пробірці на скошеному щільному агаризованому середовищі (триптоно-соєвому агарі, (TSA)) при температурі 3-5°С (в холодильнику). Культуру треба пересівати 2-3 рази на місяць на свіже поживне середовище [6]. Усі роботи з колекційною культурою проводять строго в стерильних умовах.

### **ТП 4.2. Одержання робочої культури**

Колекційну культуру *Lysobacter sp.* WAP-8294, розсівають до ізольованих колоній на чашки Петрі із TSA агаром і вирощують при температурі  $+30\pm 1^\circ\text{C}$  упродовж 36 год [6].

#### **ТП 4.3. Вирощування інокуляту у пробірках на агаризованих середовищах**

Отримані ізольовані колонії *Lysobacter sp.* WAP-8294 із чашок Петрі (від ТП 4.2) пересівають петлею у пробірки зі скошеним триптоно-соевим агаром. Одну ізольовану колонію засівають в одну окрему пробірку. Тривалість інкубування становить 36 годин за температури  $30\pm 1^\circ\text{C}$ . Здійснюється мікробіологічний контроль культури шляхом висіву на чашки Петрі та подальшим мікроскопіюванням.

#### **ТП 4.4. Вирощування інокуляту в колбах на качалках**

У колбі об'ємом 1 л, в асептичних умовах, з сумішшю перемішаних стерильних композицій: А (від ДР 3.1.1), Б (від ДР 3.1.2) та В (від ДР 3.1.3), що складає 1000 мл, розливають по 143 мл у 7 стерильні качалочні колби об'ємом 500 мл. Далі, у пробірки з робочою культурою *Lysobacter sp.* WAP-8294, що була вирощена на TSA-агарі, в умовах асептики вносять 5 мл фізіологічного розчину. Клітини суспендують, після чого, піпеткою, відбирають одержану суспензію клітин та вносять у колби з розлитим поживним середовищем. Для засіву 1 колби використовують бактеріальну суспензію з 1 пробірки. Проводять культивування на качалках (180 об/хв) при температурі  $30^\circ\text{C}$  упродовж 36 год, після чого відбирається зразок культуральної рідини та здійснюють мікробіологічний контроль, шляхом висіву на чашки Петрі, та для визначення концентрації біомаси.

#### **ТП 4.5. Вирощування в інокуляторі об'ємом 20л**

Дана операція проводиться виключно в асептичних умовах - у бактеріологічному боксі. Композиції А (від ДР 3.2.1), Б (від ДР 3.2.2) та В (від ДР 3.2.3) зливаються у балон для асептичної подачі посівного матеріалу, після чого відповідно перекачується в інокулятор об'ємом 11 л (І-10). Через засівну колбу на вносять посівний матеріал (від ТП 4.4.), культивують при температурі  $30^\circ\text{C}$  упродовж 36 год (180 об/хв) за умови постійної аерації. З метою проведення мікробіологічного контролю та для визначення концентрації біомаси, кожні 8 години відбираються проби об'ємом 60 мл.

#### **ТП 4.6. Вирощування в інокуляторі об'ємом 160л**

У посівний апарат (I-15) об'ємом 160 л із композицією А (від ДР 3.3.1) додають композицію Б (від ДР 3.3.2) та В (від ДР 3.3.3). Вмикають перемішувальний пристрій, автоматично подаються датчиками рН 6% розчин NaOH (від ДР 2.2.1.) та 6% розчин HCl (від ДР 2.1.1), до показів датчиків рН 6,0 - 6,5. Через засівну колбу на вносять посівний матеріал (від ТП 4.5.), культивують при температурі 30 °С упродовж 36 год (180 об/хв) за умови постійної аерації. З метою проведення мікробіологічного контролю та для визначення концентрації біомаси, кожні 8 години відбираються проби об'ємом 60 мл.

## **ТП 5. Виробниче культивування**

### **ТП 5.1. Виробниче культивування з використанням ферментеру об'ємом 1,25м<sup>3</sup>**

У попередньо простерилізований ферментер об'ємом 1,25 м<sup>3</sup> (Ф-31) із стерильною композицією А (від ДР 3.5.1) подають суспензію композиції Б (від ДР 3.5.2) самоплином. Вмикають перемішувальний пристрій, автоматично подаються датчиками рН 6% розчин NaOH (від ДР 2.2.2.) та 6% розчин HCl (від ДР 2.1.2.), до показів датчиків рН 6,0 - 6,5. Через насос, перекачуванням подається посівний матеріал (від ТП 4.7). Культивують упродовж 72 год при температурі 30-32 °С (підтримуємо подачею води в сорочку для охолодження) та постійною аерацією, швидкість перемішувального пристрою складає 180 об/хв. Під час виробничого синтезу, кожні 8 години відбираються проби об'ємом 60 мл, для визначення концентрації джерел вуглецю, азоту, біомаси, самого антибіотику та, відповідно, для проведення мікробіологічного контролю.

Виробничий біосинтез здійснюється до того моменту поки концентрація цільового продукту (лотилібцину) не становитиме 0,68 г/л.

## РОЗДІЛ 8. Основні етапи виділення та очищення цільового продукту

Лотилібцин є екзометаболітом, тобто вторинним метаболітом, що секретується продуцентом у поживне середовище. Виділення цього антибіотика з комплексу WAP-8294A відбувається з використанням послідовної рідинної хроматографії для очищення і поділу на фракції.

Згідно статті [55], першим етапом є вилучення екзометаболіту з культуральної рідини. Після ферментації, 5 л культурального бульйону піддавали обробці етанолом, підкислювали до рН 2,5 N HCl з метою осадження, та центрифугували для видалення біомаси. Надосадова рідина є джерелом цільового продукту. Основний етап первинного очищення здійснювався за допомогою абсорбційної хроматографії на колонці Diaion HP-20, нерухомою фазою якого є стирол-дивінілбензол. Колонку послідовно промивали водою, з метою видалення домішок, ацетоном при лужному рН та чистим ацетоном, після чого елюювали активну фракцію 80% ацетоном з додаванням 0,05% трифтороцтової кислоти (TFA). Отриманий елюат концентрували й сублімували, отримуючи сирий комплекс WAP-8294A (3,4 г).

Другим етапом є розділення фракцій з комплексу - поділ фракцій за гідрофобністю. Для поділу компонентів комплексу застосовували колонкову хроматографію на ODS-силікагелі (Chromatorex ODS), що працює за принципом зворотної фази. Елюювання проводили зростаючими концентраціями ацетонітрилу (CH<sub>3</sub>CN) з TFA, що дозволило розділити суміш на кілька фракцій: Ах, А1, А2 і А4.

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.30 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>РОЗДІЛ 8. Основні етапи виділення та очищення цільового продукту</i>	<i>Літера</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розробив</i>		<i>Кузнецова С.В.</i>						
<i>Перевірів</i>		<i>Красінько В.О.</i>					67	82
<i>Реценз.</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Зав. каф.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						

Фінальним етапом є очищення та виділення фракції A2, яка містить найбільшу кількість цільового продукту. Відокремлюють активну фракцію на колонці SP-TOYOPEARL (іонообмінна хроматографія). Колонку промивали водою та елюювали поетапно від 0,1 М NaCl до 0,8 М NaCl. Далі проводять додаткове очищення на колонці Chromatorex ODS та використовують зростаючу концентрацію ацетонітрилу з TFA (40% і 45%). У результаті отримуємо очищену форму WAP-8294A2 у кількості 693 мг солі [55].

Fig. 4. Isolation procedures for WAP-8294A.

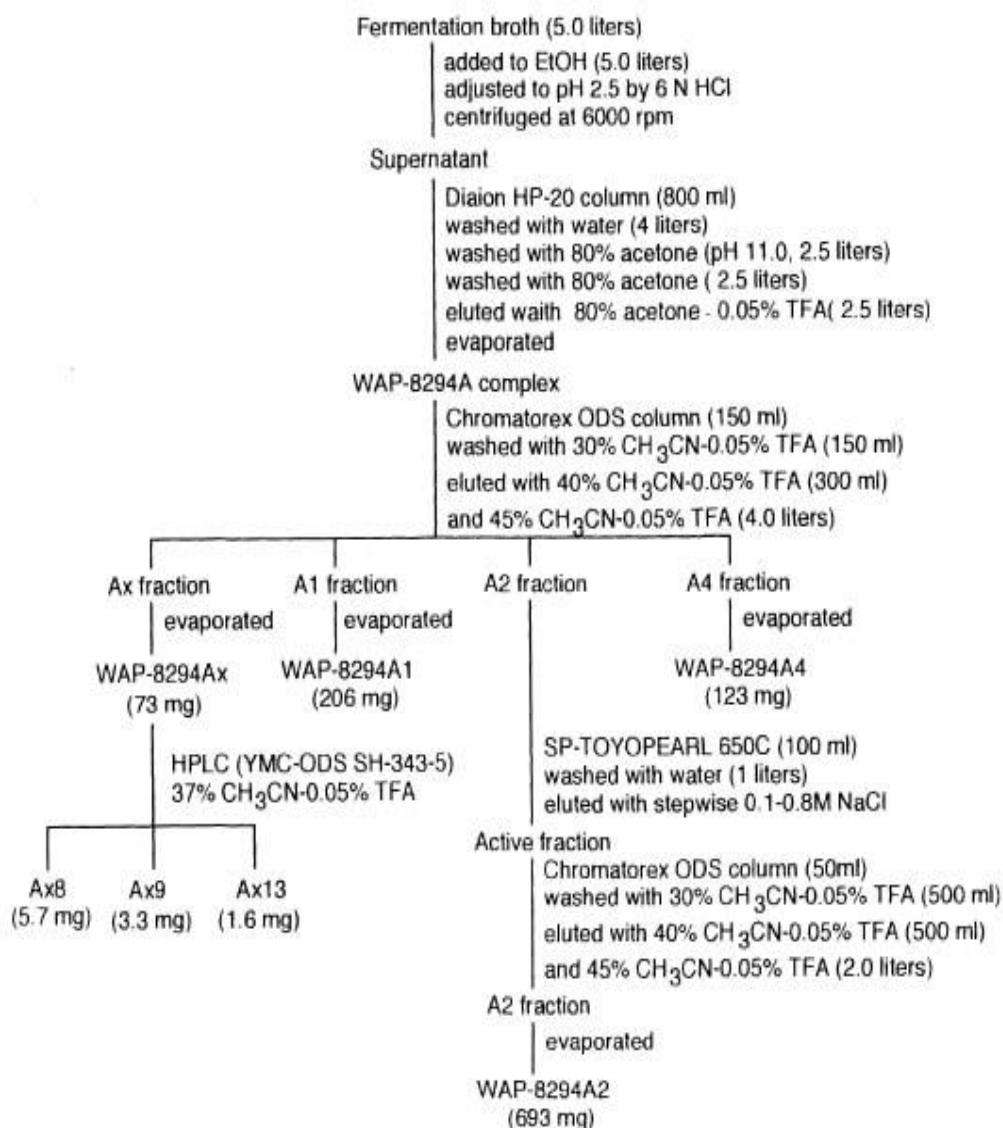


Рис 8. Процедури ізоляції для WAP-8294A [55].

## РОЗДІЛ 9. Контроль виробництва

### 9.1. Мікробіологічний контроль

Для перевірки чистоти культури застосовують два основні методи мікробіологічного контролю: прямий висів на агаризоване середовище МПА та мікроскопіювання. Останнє виконують за допомогою світлового мікроскопа з імерсійною системою. Під час підготовки мазка, в стерильних умовах, на знежирене предметне скло наносять краплю культуральної рідини, розподіляючи її так, щоб мазок мав діаметр близько 1 см. Після висушування при кімнатній температурі на сухий препарат додають 1–2 краплі імерсійного масла. По завершенні спостереження залишки масла видаляють з об'єктива ватою, змоченою у спирті.

За відсутності сторонньої мікрофлори в полі зору видно клітини *Lysobacter sp.* — грамнегативні палички розміром  $0,4\text{--}0,6 \times 2\text{--}5$  мкм. У популяції трапляються також значно подовжені клітини й нитки (до 70 мкм). Пересуваються шляхом ковзання, спор не утворюють [10, 11].

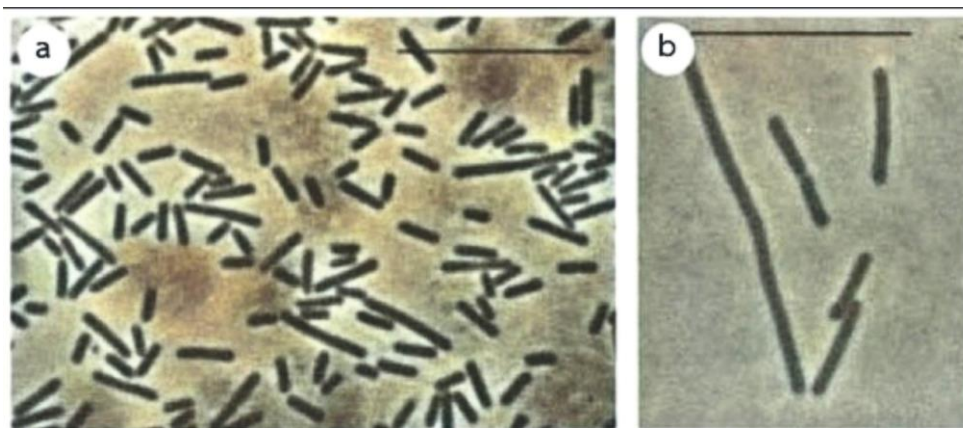


Рис. 9.1. Мікроскопічне зображення *Lysobacter sp.* [11].

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.30 КР ПЗ</i>			
Змн.	Арк.	№ документа	Підпис	Дата	<i>РОЗДІЛ 9. Контроль виробництва</i>	Літера	Аркуш	Аркушів
Розробив		<i>Кузнецова С.В.</i>					69	82
Перевірів		<i>Красінько В.О.</i>						
Реценз.								
Н. Контр.								
Зав. каф.		<i>Стабніков В.П.</i>			<i>Кафедра БТМ</i>			

Для виявлення контамінації або запобігання її повторному виникненню після стерилізації необхідно провести мікробіологічний контроль шляхом посіву зразків на чашки Петрі. Для виявлення грибів і дріжджів використовують середовище СА, а для бактерій — МПА. У попередньо простерилізовані в сухожаровій шафі чашки наливають по 20–30 мл розплавленого на водяній бані поживного середовища, дають йому застигнути, після чого витримують 2–3 дні.

Зразки відбирають стерильною піпеткою (0,1 мл) з простерилізованого середовища та наносять на поверхню відповідного агарового шару, рівномірно розподіляючи стерильним шпателем Дригальського. Після цього чашки загортають у папір і поміщають у термостат для інкубації при температурі 32–34°C на 1–2 доби. Після інкубації здійснюють візуальний контроль на наявність росту мікроорганізмів [31].

## 9.2. Показники росту і синтезу цільового продукту

### 9.2.1. Концентрація біомаси

Концентрацію біомаси визначаємо ваговим методом. 10 мл культури ділять порівну у дві центрифужні пробірки (по 5 мл) і центрифугують при 3000 об/хв протягом 5 хвилин. Після центрифугування, верхній шар рідини (фугат) зливають, а до осаду додають по 5 мл дистильованої води. Промивання повторюють двічі за аналогічних умов. Очищену біомасу переносять у попередньо висушений та зважений бюкс, висушують до сталої маси в сушильній шафі при 105 °С. Потім бюкси охолоджують в ексікаторі до кімнатної температури та зважують на аналітичних вагах. Різниця між двома останніми зважуваннями не повинна перевищувати кількох одиниць у четвертому знаку після коми. На основі результатів обчислюють кількість біомаси на 1 мл культуральної рідини [56].

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

де  $X$  – кількість сухої біомаси в г/л;  $A$  – маса біксу з осадом в г;  $B$  – маса біксу без осаду в г;  $V$  – об'єм культуральної рідини, узятій для центрифугування в мл.

### 9.2.2. Концентрація цільового продукту

Для визначення концентрації лотилібцину використовують метод рідинної хроматографії з маспектрометрією (РХ-МС). Рідинна хроматографія заснована на розділенні компонентів суміші шляхом їх розподілу між рухомою та нерухомою фазами залежно від полярності, розміру молекул чи інших властивостей. Високоєфективна рідинна хроматографія (ВЕРХ) вирізняється застосуванням високого тиску та дрібнодисперсних сорбентів. Речовини розділяються за принципом, подібним до газової хроматографії, але з використанням рідкої рухомої фази. Через велику густину рідин і високий опір колонок обладнання ВЕРХ має специфічну конструкцію, зокрема потужні насоси для подачі чистих розчинників або їх сумішей. Розділення забезпечується взаємодією з адсорбентами — найчастіше це силікагель завдяки його широкій пористості й низькій каталітичній активності. Оксид алюмінію застосовується рідше через його схильність до хемосорбції та розкладання аналізованих сполук [57].

Даним методом аналізували 20 мкл одержаного з культуральної рідини екстракту антибіотика. Спочатку йде пробопідготовка - екстрагування антибіотика з КР. 3 мл культурального бульйону збирали, і рН бульйону доводили до 2,5 за допомогою 37% НСІ. Потім оброблений бульйон екстрагували н -бутанолом/етилацетатом (1/1, об.), що містить 0,05% ТФА. Органічну фазу сушили на повітрі, а залишки повторно розчиняли в 200 мкл метанолу, що містить 0,05% ТФА. Вода/0,05% FA (розчинник А) і ацетонітрил/метанол (1/1, об.)/0,05% FA (розчинник В) використовувалися як рухомі фази зі швидкістю потоку 1,0 мл/хв. Подача рухливої фази - градієнтна за схемою: наступною: 57% В в А протягом перших 5 хвилин, 57–100% В через 5–32 хвилини, 100% В через 32–40 хвилин, повернення до 57% В через 41 хвилину та підтримувалося до 48 хв. Детекція при 280 нм на УФ-детекторі [58].



*Рис 9.2. Хромато-масс-спектрометр LCMS-8060 Shimadzu [59].*

### **9.2.3. Концентрація джерела вуглецю і азоту**

#### **Вуглець.**

Головним джерелом вуглецю в даному середовищі є глюкоза, концентрацію якої будемо визначати за методом Бертрана. Метод заснований на здатності карбонільних груп цукрів відновлювати в лужному середовищі  $\text{Cu}_2\text{O}$  до  $\text{CuO}$ . Під час розчинення сульфатом заліза (III) сульфату амонію оксид міді (I), що утворився, окислюючись до  $\text{Cu}_2\text{O}$ , відновлює залізо (III) у залізо (II), кількість якого визначають титруванням розчином перманганату калію. Пентози і гексози далі розраховуються виходячи з кількості використаного перманганату калію.

Із ферментера відбирають пробу культуральної рідини, центрифугують та фільтрують. У конічну колбу (100–150 мл) піпеткою додають 20 мл фільтрату і по 20 мл реактивів Фелінга №1 і №2. Отриману суміш об'ємом 60 мл кип'ятять протягом 3 хвилин (рахуючи від початку кипіння), після чого фільтрують. Осад (що має бути синього кольору) дають відстоятись, після чого промивають струменем гарячої свіжо прокип'яченої води, яку також зливають на фільтр. Над осадом залишають трохи води з метою запобігання його окисленню. Далі осад переносять у чисту колбу, додають 7 мл залізоамонійних квасців, перемішують і знову фільтрують. Після повного розчинення

залишків осаду, колбу та фільтр промивають холодною кип'яченою водою до зникнення кислої реакції на лакмусі. Завершальним етапом є титрування розчину перманганатом калію до зміни кольору із зеленого на рожевий [60, 61].

### **Азот.**

Головним джерелом азоту в даному середовищі є знежирене соєве борошно, концентрацію якої будемо визначати йодометричним методом по Попу і Стівенсу.

Метод визначення масової частки амінного азоту базується на здатності амінокислот утворювати з міддю розчинні комплексні сполуки, які можна кількісно визначити за допомогою йодометричного титрування. Суть цього методу полягає в додаванні надлишку суспензії фосфату міді ( $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ ) в буфері до слаболужного розчину, що містить амінокислоти. У такій суспензії вся мідь спочатку перебуває у нерозчинній формі, але під дією амінокислот частина її переходить у розчин у вигляді комплексів. Цю кількість міді, пропорційну до вмісту амінного азоту, визначають після фільтрації надлишку фосфату. Щоб виміряти кількість міді до розчину додається калій йодид в результаті даної реакції виділяється певна кількість йоду, що дорівнює кількості міді. Отже, і кількості азоту амінокислоти, яку титрують розчином тіосульфату натрію [62].

Для аналізу з ферментера відбирають 5 мл культуральної рідини, центрифугують і фільтрують. До 5 мл очищеної проби додають кілька крапель тимолфталейну та 1N NaOH до слабкого синього кольору, потім — 30 мл суспензії фосфату міді й доводять об'єм до 50 мл дистильованою водою. Після перемішування й фільтрації, 10 мл фільтрату підкислюють 0,5 мл оцтової кислоти та додають приблизно 1 г KI, пізніше отриманий розчин титрують 0,01 N тіосульфатом, додаючи на завершення 4 краплі розчину крохмалю. Об'єм тіосульфату, використаний для титрування, перемножують на 0,28 для розрахунку вмісту аміноазоту в мг/мл вихідного зразка [17]. Вміст амінного азоту (X) розраховують за рівнянням:

$$X = \frac{\square \times 0,28 \times 5 \times 10 \times 100}{50}, \text{ (мг в 100 мл культуральної рідини) [62].}$$

## ЛІТЕРАТУРА

1. Chen, Xusheng, et al. Systematic optimization for production of the anti-MRSA antibiotics WAP-8294A in an engineered strain of *Lysobacter enzymogenes*. *Microbial Biotechnology* 12.6 (2019): 1430-1440.
2. Among superbugs, MRSA is at the forefront of antimicrobial resistance [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.healthdata.org/news-events/insights-blog/acting-data/among-superbugs-mrsa-forefront-antimicrobial-resistance#:~:text=MRSA%20was%20the%20deadliest%20pathogen,The%20Lancet%20in%20January%202022>.
3. Staphylococcal pneumonia [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.sciencedirect.com/topics/pharmacology-toxicology-and-pharmaceutical-science/staphylococcal-pneumonia#:~:text=Staphylococcus%20aureus%20pneumonia%20is%20a, follow%20measles%20or%20whooping%20cough>.
4. Pat. WO2019239352A1. Enhancement of antibacterial actions of a depsipeptide antibiotic using synergistic amounts of boric acid [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://patents.google.com/patent/WO2019239352A1/en>
5. Itoh, H., Tokumoto, K., Kaji, T., Paudel, A., Panthee, S., Hamamoto, H., ... & Inoue, M. (2017). Total synthesis and biological mode of action of WAP-8294A2: a menaquinone-targeting antibiotic. *The Journal of Organic Chemistry*, 83(13), 6924-6935
6. Kato, Azusa, et al. "A new anti-MRSA antibiotic complex, WAP-8294A II. Structure characterization of minor components by ESI LCMS and MS/MS." *The Journal of antibiotics* 64.5 (2011): 373-379
7. Clements-Decker, Tanya, et al. "Underexplored bacteria as reservoirs of novel antimicrobial lipopeptides." *Frontiers in Chemistry* 10 (2022): 1025979.
8. LOTILIBCIN (XT4808181K) [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://drugs.ncats.io/substance/XT4808181K>
9. CHRISTENSEN, PENELOPE, and F. D. Cook. "Lysobacter, a new genus of nonfruiting, gliding bacteria with a high base ratio." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 28.3 (1978): 367-393.
10. Vasilyeva, N. V., Tsfasman, I. M., Suzina, N. E., Stepnaya, O. A., & Kulaev, I. S. Secretion of bacteriolytic endopeptidase L5 of *Lysobacter* sp. XL1 into the medium by means of outer membrane vesicles. *The FEBS journal*. 2008, 275(15), 3827-3835.
11. Reichenbach, Hans. "The genus lysobacter." *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*. New York, NY: Springer New York, 1992. 3256-3275.
12. Лобанок А.Г. Биотехнологии —признак современности и прогресса. Наука и инновации. 2006, № 11 (45): 27-30
13. Kudryakova, Irina V., et al. "Deletion of alpB gene influences outer membrane vesicles biogenesis of *Lysobacter* sp. XL1." *Frontiers in Microbiology* 12 (2021): 715802.
14. SNEATH, Peter HA, et al. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Volume 2. 1986.

15. Among superbugs, MRSA is at the forefront of antimicrobial resistance [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.healthdata.org/news-events/insights-blog/acting-data/among-superbugs-mrsa-forefront-antimicrobial-resistance#:~:text=MRSA%20was%20the%20deadliest%20pathogen,The%20Lancet%20in%20January%202022.>
16. Staphylococcal pneumonia [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.sciencedirect.com/topics/pharmacology-toxicology-and-pharmaceutical-science/staphylococcal-pneumonia#:~:text=Staphylococcus%20aureus%20pneumonia%20is%20a, follow%20measles%20or%20whooping%20cough.>
17. Sattar, Saud Bin Abdul, Andrew D. Nguyen, and Sandeep Sharma. "Bacterial pneumonia." *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing, 2024
18. ВАНКОМІЦИН - МІП 1000 МГ [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://mozdocs.kiev.ua/likiview.php?id=33328>
19. "Чисельність наявного населення України"/"Number of Present Population of Ukraine" [Електронний ресурс] – режим доступу: [https://www.ukrstat.gov.ua/druk/publicat/kat\\_u/publnasel\\_u.htm](https://www.ukrstat.gov.ua/druk/publicat/kat_u/publnasel_u.htm)
20. Salmanov, Aidyn G., et al. "Molecular epidemiology of the transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Kyiv acute care hospitals, Ukraine." (2022).
21. Clinical Overview of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Healthcare Settings [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.cdc.gov/mrsa/hcp/clinical-overview/index.html#:~:text=About%20two%20in%20every%20100,not%20develop%20serious%20MRSA%20infections.>
22. Нормативно-директивні документи МОЗ України: ВАНКОМІЦИН [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://mozdocs.kiev.ua/lik.php?name=%C2%CD%CA%CE%CC%B2%D6%8%CD&lang=1&manufacturer=&category=0&likform=0&pokaz=&atcode=&go=%CF%EE%F8%F3%EA&nav=1&hf=1&am=>
23. Lotilibcin [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.benchchem.com/product/b1675160>
24. Lotilibcin [Електронний ресурс] – режим доступу: <http://www.rrscientific.com/product/plist/1102>
25. Lotilibcin [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.thebiotek.com/product/bt-273811#intro>
26. Glycolysis / Gluconeogenesis - *Lysobacter sp.* TY2-98 [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.genome.jp/pathway/lyt00010>
27. Valine, leucine and isoleucine biosynthesis - *Lysobacter enzymogenes* C3 [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.genome.jp/pathway/lez00290>

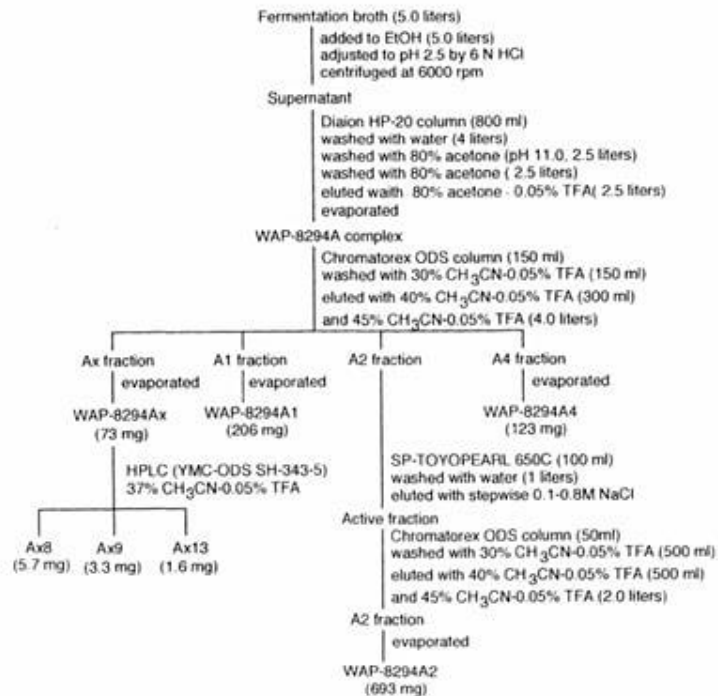
28. Fatty acid biosynthesis - *Lysobacter* sp. TY2-98 [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.genome.jp/pathway/lyt00061>
29. Карлаш, Ю. В., & Красінько, В. О. (2022). Основи проектування біотехнологічних виробництв.
30. Industrial-scale fermenter 1000-5000L [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://en.sysbiotech.at/industrial-scale-fermenter-1000-5000l/>
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.
32. Державний реєстр дезінфекційних засобів [Електронний ресурс] Режим доступу: [https://docs.google.com/spreadsheets/d/1q46VIbcMAN3I6CoSYOJ3zJGmsf92IPE\\_KsuKpPX0wOU/edit?gid=1141636733#gid=1141636733](https://docs.google.com/spreadsheets/d/1q46VIbcMAN3I6CoSYOJ3zJGmsf92IPE_KsuKpPX0wOU/edit?gid=1141636733#gid=1141636733)
33. Каустична сода 1 кг Натрій гідроксид для прочистки труб [Електронний ресурс] Режим доступу: [https://klebrig.com.ua/ua/p902982226-kausticheskaya-soda-natrij.html?source=merchant\\_center&utm\\_source=google&utm\\_medium=cpc&utm\\_campaign=PMax\\_2\\_cat&utm\\_content=prodid\\_&utm\\_term=gclid\\_Cj0KCQjwzrzABhD8ARIsANISWNOWvzbIG\\_qjO1dmH3tptrjSBgkq9xtIV\\_kBPLq3\\_KrFb\\_MMz2wlu-saAhLREALw\\_wcB&gad\\_source=1&gclid=Cj0KCQjwzrzABhD8ARIsANISWNOWvzbIG\\_qjO1dmH3tptrjSBgkq9xtIV\\_kBPLq3\\_KrFb\\_MMz2wlu-saAhLREALw\\_wcB](https://klebrig.com.ua/ua/p902982226-kausticheskaya-soda-natrij.html?source=merchant_center&utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=PMax_2_cat&utm_content=prodid_&utm_term=gclid_Cj0KCQjwzrzABhD8ARIsANISWNOWvzbIG_qjO1dmH3tptrjSBgkq9xtIV_kBPLq3_KrFb_MMz2wlu-saAhLREALw_wcB&gad_source=1&gclid=Cj0KCQjwzrzABhD8ARIsANISWNOWvzbIG_qjO1dmH3tptrjSBgkq9xtIV_kBPLq3_KrFb_MMz2wlu-saAhLREALw_wcB)
34. Данаклін універсальний, 1000 мл [Електронний ресурс] Режим доступу: [https://hlorka.in.ua/ua/p2517052953-danaklin-universalnyj-1000.html?srsltid=AfmBOorJc9CwZGr4Qs9wk5HBS\\_qt6UKE65k4JmXVZq3NzCHdi\\_YVAHpc](https://hlorka.in.ua/ua/p2517052953-danaklin-universalnyj-1000.html?srsltid=AfmBOorJc9CwZGr4Qs9wk5HBS_qt6UKE65k4JmXVZq3NzCHdi_YVAHpc)
35. Таблетки Ді-хлор, дезінфікуючий засіб 1 кг (300 таб) [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://pestco.com.ua/ua/products/tabletki-di-hlor-dezinfikuyuchiy-zasib-1-kg-300-tab.html?srsltid=AfmBOorjdGWKKnU0KinBxB3HDh4zM00-OnhZt6oZAGA5U58Qx7R1xSud>
36. Бланідас, марка А, 1 кг [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://hlorka.in.ua/ua/p773525745-blanidas-marka.html#:~:text=Бланідас%20марка%20А%20-%20хлорний%20дезінфікуючий,%2C%20басейнів%2C%20води%20та%20ін.>
37. «Дезовір», 1000 мл [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://dezo.com.ua/shop/zasib-dezinfikuyuchij-dezovir-1000-ml>
38. DS-E80 Засіб дезінфекційний, "шкіра рук і поверхні" [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://domo.ua/ds-e80-zasib-dezinfektsiinyi-shkira-ruk-i-poverkhni-1-l/>
39. Шахта вентиляційна 1.4 м Ø 500 (1,7 з дифузором) з гумою EPDM [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://agroprolisok.com.ua/ua/p2027426639-shahta-ventilyatsionnaya-500.html>
40. Фільтри грубого очищення (G2-G4) [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://air-filter.com.ua/filters/primary/panel>
41. Гвинтовий компресор Лідер ВК 20PSMA-16-500Д з осушувачем повітря (025535)

- [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://tusk.ua/ua/vyntovoi-kompressor-lyder-vk-20psma-16-500d-s-osushytele-m-vozdukha/>
42. Кожухотрубні конденсатори серії ESK [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://dalgakiran.ua/uk/products/kozhuhotrubi-kondensatory-seriyi-sk/>
43. Air receivers (90 – 10 000 l; 11 – 50 bar) [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.kaeser.com/int-en/products/compressed-air-storage-and-pressure-maintenance/air-receivers>
44. Вентс НКВ 315-4 [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://vents.ua/product/nkv-315-4/#downloads>
45. PFGI - Pharmaceutical Liquid and Gas Inline Filter Housing [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.masterfilter.com/en/products/product-details/pfqi-pharmaceutical-liquid-and-gas-inline-filter-housing>
46. Masterfilter PFGG Series [Електронний ресурс] – режим доступу: [https://www.masterfilter.com/fileadmin/Downloads/Data\\_Sheets/Filter\\_housings/PFGG\\_PB\\_EN.pdf](https://www.masterfilter.com/fileadmin/Downloads/Data_Sheets/Filter_housings/PFGG_PB_EN.pdf)
47. Дозатор води и жидкостей [Електронний ресурс] – режим доступу: [https://agro-teh.com.ua/p370228267-dozator-vody-zhidkostej.html?source=merchant\\_center&gclid=CjwKCAjwwL6aBhBIEiwADycBIIzTn8EH4CTPrPs\\_jtdhVoqwqfeTI4Ln7cNCF5ZKvJFNJhu9Kpn99xoCC64QAvD\\_BwE](https://agro-teh.com.ua/p370228267-dozator-vody-zhidkostej.html?source=merchant_center&gclid=CjwKCAjwwL6aBhBIEiwADycBIIzTn8EH4CTPrPs_jtdhVoqwqfeTI4Ln7cNCF5ZKvJFNJhu9Kpn99xoCC64QAvD_BwE)
48. БИОРЕАКТОР 20 ЛИТРІВ для виробництва біопрепаратів в агропромисловій галузі [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://promvit.com.ua/bioreaktor-20-litriv-dlya-virobnictva-biopreparativ-v-agropromisloviy-galuzi/>
49. Весовой дозатор 0,1 - 60 кг [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://agro-teh.com.ua/p565239385-vesovoj-dozator.html>
50. Реактор лабораторний 20 літрів з нержавіючої сталі з мішалкою та сорочкою [Електронний ресурс] – режим доступу: [https://stprom.com.ua/ua/p1723663252-reaktor-laboratornyj-litrov.html?srsId=AfmBOorPb8nBxKRTchARWdMUMOR\\_vqzkH1xaglr1uuGuuHrtFA3j0MCR](https://stprom.com.ua/ua/p1723663252-reaktor-laboratornyj-litrov.html?srsId=AfmBOorPb8nBxKRTchARWdMUMOR_vqzkH1xaglr1uuGuuHrtFA3j0MCR)
51. 160 Liter DCE 160 L Bioreactor / Fermentor - 316 Stainless Steel for Sale [Електронний ресурс] – режим доступу: [https://www.bid-on-equipment.com/tanks/jacketed-stainless-steel-tanks/fermentors/423418~160-liter-dce-160-l-bioreactor---fermentor---316-stainless-steel.htm?srsId=AfmBOoq9f\\_sBGNiTh2Qe024y8Bgg8VAHvu2yCPhRLfY1mCo4wEzaDuBe](https://www.bid-on-equipment.com/tanks/jacketed-stainless-steel-tanks/fermentors/423418~160-liter-dce-160-l-bioreactor---fermentor---316-stainless-steel.htm?srsId=AfmBOoq9f_sBGNiTh2Qe024y8Bgg8VAHvu2yCPhRLfY1mCo4wEzaDuBe)
52. Хімічний скляний реактор 200 літрів TT-RG200/300ExM Хімічний скляний реактор 200 літрів TT-RG200/300ExM Високоякісний [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://titantech.com.ua/ru/khimichni-reaktory/1899/>
53. Відцентровий поверхневий насос Speroni CS 50-160 С 4 кВт (101802280) [Електронний ресурс] – режим доступу: [https://teploradost.com.ua/ua/centrobezhnyj-poverhnostnyj-nasos-speroni-cs-50160-c-4-kvt?utm\\_source=google&utm\\_medium=cpc&utm\\_campaign=vse\\_tovari\\_fid\\_sredn-visokii\\_5-49\\_k\\_grn\\_pmax&utm\\_content=&utm\\_term=&gad\\_source=1&gclid=CjwKCAiAxKy5BhBbEiwAYiW--y8V7rCrg9NJiARQHANu4d\\_Cj88EtIUoirIMsiHPtJ3XLJaa-IkrhBoCjGkQAvD\\_BwE](https://teploradost.com.ua/ua/centrobezhnyj-poverhnostnyj-nasos-speroni-cs-50160-c-4-kvt?utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=vse_tovari_fid_sredn-visokii_5-49_k_grn_pmax&utm_content=&utm_term=&gad_source=1&gclid=CjwKCAiAxKy5BhBbEiwAYiW--y8V7rCrg9NJiARQHANu4d_Cj88EtIUoirIMsiHPtJ3XLJaa-IkrhBoCjGkQAvD_BwE)

54. 5L Autoclavable Fermenter [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.amergingtechnologies.com/fermentor-bioreactor.html>
55. Kato, A., Nakaya, S., Kokubo, N., Aiba, Y., Ohashi, Y., Hirata, H., ... & Harada, K. I. (1998). A new anti-MRSA antibiotic complex, WAP-8294A I. Taxonomy, isolation and biological activities. *The Journal of antibiotics*, 51(10), 929-935.
56. Навчальний посібник «Біотехнологія та біоінженерія. Частина 1. Основи біотехнології: рекомендації до виконання лабораторних робіт» / Укл. В. В. Мотроненко, Т. М. Луценко, Л. М. Дронько / К.: КПІ. – Київ. – 2022. с. 82.
57. Мінаєва В. О. Хроматографічний аналіз: Підручник для студентів вищих навчальних закладів. – Черкаси: Вид. від. ЧНУ імені Богдана Хмельницького, 2013. – 284 с.
58. Yield Improvement of the Anti-MRSA Antibiotics WAP-8294A by CRISPR/dCas9 Combined with Refactoring Self-Protection Genes in *Lysobacter enzymogenes* OH11 [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5775038/>
59. Хроматомасс-спектрометр LCMS-8060 Shimadzu [Електронний ресурс] – режим доступу: [https://chemtest.com.ua/хроматомасс-спектрометр\\_lcms-8060\\_shimadzu](https://chemtest.com.ua/хроматомасс-спектрометр_lcms-8060_shimadzu)
60. Постнова, О. М., Касабова, К. Р., Гревцева, Н. В., & Шматченко, Н. В. (2018). Методи контролю продукції харчових виробництв.
61. Загальна біотехнологія: Лабораторний практикум для студ. напряму 6.051401 "Біотехнологія" ден. та заоч. форм навч. / Уклад.: Ю.М. Пенчук, С.О. Старовойтова, В.О. Красінько. – К.: НУХТ, 2010. — 71 с.
62. Загальні технології харчової промисловості: Метод. вказівки до вик. лаб. практикуму студ. заоч. форми навчання напряму підготовки 6.051701 “Харчові технології та інженерія“ спец. “Технологія продуктів бродіння і виноробства” / Укл.: А.М. Куц, М.В. Бондар, Ю.В. Булій. – К: НУХТ, 2011. – 53 с.



Fig. 4. Isolation procedures for WAP-8294A.



This strain belongs to genus *Lysobacter*<sup>7)</sup>. According to further comparison with those of species belonging to the same genus, the strain is most closely related to *Lysobacter enzymogenes*, but it is not in agreement with the latter in specific details such as the ability of assimilating citric acid. Therefore, the strain was named *Lysobacter* sp. WAP-8294.

Fermentation and Isolation

A well-grown slant culture of strain WAP-8294 was inoculated into a 500 ml Erlenmeyer flask containing 100 ml of seed medium consisting of glucose 2.5%, defatted soybean flour 2%, soybean oil 0.4%, NaCl 0.25% and CaCO<sub>3</sub> 0.5%, pH 7.2 and incubated at 30°C for 1 day on a rotary shaker (180 rpm). A 2 ml portion of the seed culture was transferred into a 500 ml Erlenmeyer flask containing 100 ml of the same medium. Fermentation was done at 30°C for 3 day on a rotary shaker (180 rpm). The antibiotic production in the fermentation broth was monitored by HPLC analysis and paper disc assay.

An example of the typical isolation is illustrated in

Fig. 4. The fermentation broth (5 liters) was mixed with equal volumes of ethanol (5 liters), and the mixture was adjusted to pH 2.5 with 6N HCl. The mixture was centrifuged and the cell mass was discarded. The supernatant was passed through a column of Diaion HP-20 (Mitsubishi Chemical, Tokyo, Japan). The column was washed with water, 80% acetone (pH 11.0) and 80% acetone, and then eluted with 80% acetone containing 0.05% trifluoroacetic acid (TFA). The eluate was concentrated and freeze-dried to give the WAP-8294A complex (3.4 g). The complex was chromatographed on a Chromatorex ODS (Fuji Silysia Chemical, Kasugai, Japan) column [30% acetonitrile containing 0.05% TFA]. The column was washed with 30% acetonitrile containing 0.05% TFA and then eluted with 40% acetonitrile containing 0.05% TFA and 45% acetonitrile containing 0.05% TFA. The fractions containing WAP-8294Ax1~13 were concentrated and separated on a preparative HPLC column of YMC pack SH-343-5 (20 × 250 nm, YMC) using a mobile phase of 37% acetonitrile containing 0.05% TFA. The eluate was concentrated and freeze-dried to give WAP-8294Ax8

(5.7 mg), WAP-8294Ax9 (3.3 mg) and WAP-8294Ax13 (1.6 mg) as trifluoroacetate. The A1 fraction and A4 fraction were concentrated and freeze-dried to give WAP-8294A1 (206 mg) and WAP-8294A4 (123 mg) as trifluoroacetate. The A2 fraction was applied to a column of SP-TOYOPEARL 650C (Tosoh, Tokyo). The column was washed with water and eluted in a stepwise manner with 0.1 M NaCl to 0.8 M NaCl. The active eluate was further purified by Chromatorex ODS (45% acetonitrile containing 0.05% TFA) to give 693 mg of pure A2 trifluoroacetate salt.

#### Physico-chemical Properties

The physico-chemical properties of WAP-8294A1, A2, A4, Ax8, Ax9 and Ax13 are quite similar. They are soluble in water, methanol and dimethyl sulfoxide, and insoluble in acetone, ethyl acetate and chloroform. They are positive to the ninhydrin reaction. In the IR spectra, they showed dominant absorptions at 1636 and 1541  $\text{cm}^{-1}$  due to peptide bonds. Molecular formulas of WAP-8294A1, A2, A4, Ax8, Ax9 and Ax13 were determined by high resolution FAB mass spectrometry. The

Table 2. High resolution mass spectrometry of WAP-8294A1, A2, A4, Ax8, Ax9 and Ax13.

WAP-	Found (M+H) <sup>+</sup>	Calcd. (M+H) <sup>+</sup>	Molecular formula
A1	1548.8088	1548.8063	C <sub>72</sub> H <sub>109</sub> N <sub>17</sub> O <sub>21</sub>
A2	1562.8224	1562.8219	C <sub>73</sub> H <sub>111</sub> N <sub>17</sub> O <sub>21</sub>
A4	1576.8363	1576.8375	C <sub>74</sub> H <sub>113</sub> N <sub>17</sub> O <sub>21</sub>
Ax8	1548.8079	1548.8063	C <sub>72</sub> H <sub>109</sub> N <sub>17</sub> O <sub>21</sub>
Ax9	1548.8065	1548.8063	C <sub>72</sub> H <sub>109</sub> N <sub>17</sub> O <sub>21</sub>
Ax13	1576.8324	1576.8375	C <sub>74</sub> H <sub>113</sub> N <sub>17</sub> O <sub>21</sub>

Table 3. Antimicrobial activity of WAP-8294A1, A2, A4, Ax8, Ax9 and Ax13.

Test organism	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )					
	A1	A2	A4	Ax8	Ax9	Ax13
<i>Staphylococcus aureus</i> JCM 8702 (MRSA)	0.39	0.78	0.78	n.t.	n.t.	n.t.
+ 10% FCS	<0.1	<0.1	<0.1	n.t.	n.t.	n.t.
<i>S. aureus</i> No. 1 <sup>a</sup> (MRSA)	0.39	0.78	0.78	3.13	3.13	3.13
+ 10% FCS	<0.1	<0.1	<0.1	3.13	3.13	3.13
<i>S. aureus</i> No. 11 <sup>b</sup> (MRSA)	0.39	0.78	0.78	n.t.	n.t.	n.t.
+ 10% FCS	<0.1	<0.1	<0.1	n.t.	n.t.	n.t.
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0.39	0.78	0.78	3.13	3.13	3.13
+ 10% FCS	<0.1	<0.1	<0.1	1.56	1.56	1.56
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	0.39	0.78	0.78	1.56	1.56	1.56
+ 10% FCS	<0.1	<0.1	<0.1	0.78	0.78	0.78
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	0.78	0.78	0.78	1.56	3.13	3.13
+ 10% FCS	<0.1	<0.1	<0.1	0.78	1.56	1.56
<i>Enterococcus faecium</i> CIP 103510 (VRE)	n.t.	6.25	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
+ 10% FCS	n.t.	6.25	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	6.25	6.25	6.25	>100	>100	>100
+ 10% FCS	25	25	25	>100	>100	>100
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	>100	>100	>100	>100	>100	>100
+ 10% FCS	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	>100	>100	>100	>100	>100	>100
+ 10% FCS	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Candida albicans</i> TIMM 0239	>100	>100	>100	>100	>100	>100
+ 10% FCS	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Aspergillus fumigatus</i> IAM 2004	>100	>100	>100	>100	>100	>100
+ 10% FCS	>100	>100	>100	>100	>100	>100

<sup>a</sup> Clinical isolate.

FCS: Fetal calf serum, n.t.: not tested.