

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

«До захисту в ЕК»

«До захисту допущено»

Директор інституту (декан факультету)

Завідувач кафедри

\_\_\_\_\_  
(підпис)

Грегірчак Н.М.  
(прізвище та ініціали)

\_\_\_\_\_  
(підпис)

Пирог Т.П.  
(прізвище та ініціали)

«\_\_» \_\_\_\_\_ 2020 р.

«\_\_» \_\_\_\_\_ 2020 р.

**Кваліфікаційна робота**

**на здобуття освітнього ступеня бакалавра**

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

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

на тему: Одержання Капреоміцину культивуванням *Streptomyces capreolus*

Виконав: здобувач IV курсу, групи З Устименко Софії Олександрівни

Керівник Слободян Ольга Петрівна  
(прізвище та ініціали)

\_\_\_\_\_  
(підпис)

Консультанти Клименко О. М.  
(прізвище та ініціали)

\_\_\_\_\_  
(підпис)

\_\_\_\_\_  
(прізвище та ініціали)

\_\_\_\_\_  
(підпис)

Рецензент \_\_\_\_\_  
(прізвище та ініціали)

\_\_\_\_\_  
(підпис)

Засвідчую, що в цій кваліфікаційній роботі  
немає запозичень із праць  
інших авторів без відповідних  
посилань.

Здобувач \_\_\_\_\_  
(підпис)

Київ – 2020 р.

# НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю.

Кафедра біотехнології і мікробіології.

Освітній ступінь бакалавр.

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

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

**ЗАТВЕРДЖУЮ**  
Завідувач кафедри біотехнології і  
мікробіології  
\_\_\_\_\_ Пирог Т.П.  
«17» березня 2020 року

## ЗАВДАННЯ

### НА КВАЛІФІКАЦІЙНИЙ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

Устименко Софії Олександрівни  
(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Одержання Капреоміцину культивуванням *Streptomyces capreolus*  
Керівник роботи \_\_\_\_\_ Слободян.О.П.доц. \_\_\_\_\_,  
( прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)  
затвержені наказом вищого навчального закладу від «16» березня 2020 року № 227-кв
2. Строк подання здобувачем роботи 01 червня 2020 року.
3. Вихідні дані до роботи біологічний агент *Streptomyces capreolus* цільовий продукт :капреоміцин.
4. Зміст розрахунково-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. Обґрунтування вибору технологічної схеми. РОЗДІЛ 5 Матеріальний баланс і розрахунок обладнання. РОЗДІЛ 6 Специфікація обладнання. РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми .РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва .РОЗДІЛ 9 .Автоматизація ділянки виробництва.
5. Перелік графічного матеріалу  
Технологічні схеми виробництва капреоміцину – 2 аркуші (формат А1 та А2). Апаратурна схема виробництва капреоміцину- 2 аркуші (Формат А1). Схема автоматизації ділянки виробництва – 1 аркуш (формат А2)..

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
<b>Розділ 9</b>	<b>Клименко Олег Миколайович</b> <b>Доцент, к.т.н., кафедра автоматизації та комп'ютерних технологій систем управління</b>	<b>23.03.2020</b>	<b>24.04.2020</b>

7. Дата видачі завдання «17» березня 2020 року

### КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
11.	Характеристика капреоміцину	20.03.2020-25.03.2020	
22.	Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	25.03.2020-31.03.2020	
33.	Техніко-економічне обґрунтування	01.04.2020-07.04.2020	
4 4.	Обґрунтування вибору технологічної схеми	10.04.2020-20.04.2020	
5 5.	Матеріальний баланс і розрахунок обладнання	20.04.2020-28.04.2020	
6 6.	Специфікація обладнання	28.04.2020-03.05.2020	
77.	Опис технологічної схеми	04.05.2020-10.05.2020	
88.	Контроль виробництва	11.05.2020-16.05.2020	
99.	Автоматизація ділянки виробництва	17.05.2020-20.05.2020	
110.	Оформлення пояснювальної записки	21.05.2020-31.05.2020	
111.	Виконання графічної частини проекту	21.05.2020-31.05.2020	

**Здобувач** \_\_\_\_\_  
(Підпис)

**Керівник роботи** \_\_\_\_\_  
(Підпис)

**Устименко С. О.** \_\_\_\_\_  
(Прізвище та ініціали)

**Слободян О. П.** \_\_\_\_\_  
(Прізвище та ініціали)

## РЕФЕРАТ

Дана дипломна робота присвячена розробленню і вдосконаленню технологічного процесу синтезу антибіотику капреоміцин за допомогою штаму мікроорганізму *Streptomyces capreolus* NRRL2773, що проявив найбільш здатні властивості щодо продукуванню даного антибіотика. В технології виробництва даного антибіотику капреоміцин застосовуються різні техніки допоміжних робіт (підготовка і стерилізація поживних середовищ, приготування мийних засобів, приготування допоміжних сумішей, підготовки обладнання, фільтрування, пакування), та основних процесів (підготовка посівного матеріалу, періодичне культивування, нанофільтрування, ліофілізація, фасування) наведених в технологічній та апаратурній схемах.

Дипломна робота складається з вступу, чотирьох розділів ,списку використаних джерел (56 найменування),технологічних та апаратурні схем (формати А1 та А2). Загальний обсяг роботи 111 сторінок, 4 рисунка ,19т. Ключові слова : антибіотик, капреоміцин, виділення, ліофілізація.

## Зміст

РЕФЕРАТ .....	3
ВСТУП.....	6
РОЗДІЛ 1. ОПИС ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ .....	8
РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА .....	15
2.1 Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища .....	15
2.2 Розрахунок складу поживного середовища для вирощування посівного матеріалу <i>Streptomyces capreolus</i> NRRL2773. ....	21
2.3 Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента .....	23
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ .....	25
3.1 Потреба у цільовому продукті.....	25
3.2 Розрахунок потужностей виробництва .....	27
3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів і геометричного об'єму ферментера для біосинтезу капреоміцину.....	27
3.4 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для біосинтезу капреоміцину <i>Streptomyces capreolus</i> NRRL2773.....	28
РОЗДІЛ 4. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	31
4.1 Обґрунтування вибору мийних та дезинфікувальних засобів.....	
4.2 Обґрунтування стадії підготовки обладнання і комунікацій.....	37
4.3 Обґрунтування стадій підготовки аераційного повітря. ....	40
4.4 Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища для культивування <i>Streptomyces capreolus</i> NRRL2773 продуценту антибіотика Капреоміцин .....	41
4.5 Обґрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту.....	42
РОЗДІЛ 5. МАТЕРІАЛЬНИЙ БАЛАНС І РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ .....	48
5.1. Розрахунок партій продукту (виробничих циклів) .....	49
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ.....	67
РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	73

РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА .....	86
8.1.Карта контрольних точок виробництва капреоміцину .....	87
8.2. Мікробіологічний контроль.....	95
8.3.Концентрація цільового продукту (капреоміцину) .....	96
8.4. Концентрація цільового продукту (капреоміцину) .....	101
РОЗДІЛ 9. АВТОМАТИЗАЦІЯ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЦТВА.....	103
9.1 Поставлення завдання на розробку системи автоматизації НФ-установки.	103
9.2. Опис функціональної схеми автоматизації.....	104
9.3. Специфікація засобів автоматизації.....	105
Список використаної літератури.....	107

## ВСТУП

У той час як розвинені (і не тільки) країни світу вже давно зробили свій вибір — майбутнє за біотехнологією, що відкриває фантастичні можливості в сільськогосподарському виробництві, медицині й інших сферах діяльності, Україна, на жаль, залишається поки що на узбіччі прогресу.[1] За оцінками експертів, обсяг виробництва українського сектору біотехнології на сьогодні не перевищує 20 млн. дол. США. Так, у фармацевтичній промисловості частка вітчизняного виробництва на ринку імунобіотехнологічних препаратів становить лише 9%, а сектор промислової біотехнології розвинутий ще менше. На українському ринку лікарських засобів сьогодні переважають імпорتنі пробіотики, і частка продукції зарубіжних фірм становить понад 70%. Водночас в Україні функціонують підприємства, які на сьогодні є успішними та перспективними у виробництві біофармацевтичних препаратів, зокрема, ЗАТ НВЦ "Борщагівський хіміко-фармацевтичний завод" (м. Київ), ЗАТ "Біофарма" (м. Київ), ОАО "Фармак" (м. Київ), ЗАТ "Біолік" (м. Харків), ЗАТ "Лекхім" (м. Харків), ВАТ "Дніпрофарм" (м. Дніпропетровськ), ТОВ "Біостимулятор" (м. Одеса). Суттєвою проблемою вітчизняної біотехнології є те, що на сьогодні з низки причин українські підприємства майже не мають виходу на світовий ринок. По-перше, біотехнологічний напрям є найдорожчим, по-друге, він передбачає найскладніші тривалі дослідження та клінічні випробування, по-третє, саме у сфері біотехнології найбільш високозатратні процедури ліцензування й отримання дозволів для виходу на перспективні ринки, зокрема США і ЄС. Для ефективного розвитку біотехнології у фармацевтичній галузі розпочато співпрацю України із зарубіжними організаціями, зокрема, у рамках Наукової програми НАТО-Україна, з фондом американської венчурної компанії "Drapet Fisher Jarvet-son" (DFJ), з російською організацією "Некомерційне партнерство "Консорціум "Біотехнологія для медицини і агропромислового комплексу (Біофак)".[2]

**Актуальність** даної роботи обумовлена тим, що станом на сьогодні до більшості широко застосовуваних протиінфекційних засобів збудники розвинули

резистентність. Виробництво антибіотиків та їх подальша хімічна модифікація з метою посилення протимікробних властивостей є потенційним вирішенням наявної проблеми. Тому метою роботи є вдосконалення технології виробництва субстанції капреоміцину.

Виділення, дослідження структури та функції і впровадження в медичну практику нових антибіотиків залишається важливою і актуальною медико-біологічною проблемою, не зважаючи на поширену в пресі думку про кінець ери цих біологічно активних сполук у зв'язку із зростанням частоти виділення патогенних мікроорганізмів і ракових клітин, стійких до відомих антибіотичних препаратів, а також відмовою деяких фармацевтичних компаній від реалізації дослідницьких програм із пошуку природних антимікробних сполук для лікування інфекційних хвороб. [3]

**Метою** даної роботи є розробка і вдосконалення технологій виробництва антибіотику капреоміцин. Даний спосіб виготовлення препарату відноситься до процесу приготування капреоміцину сульфату як одного лікарського засобу для лікування туберкульозу легень, особливо швидкого туберкульозу. У дипломній роботі розкривається спосіб отримання капреоміцину. Спосіб приготування капреоміцину включає етапи додавання суперпарамагнітних мікросфер у культуральну рідину для отримання продукту капреоміцину. Спосіб приготування капреоміцину має переваги, що дозволяють уникнути попередньої обробки та попереднього нагрівання культуральної рідини під час вилучення, не потрібне дороге обладнання для вилучення та сепарації, скорочується термін виробництва на 2/3, забруднення зменшується на 50%, вихід збільшується на 10 %, і відповідно технічна підтримка надається для промислового виробництва.

**Новизна** запропонованого методу отримання антибіотику капреоміцин полягає у тому, що при використанні штаму *Streptomyces capreolus* NRRL2773 ми використовуємо нову технологію магнітного сепарування, аби отримати чистий, активніший продукт у більшому обсягу.

## РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА КАПРЕОМІЦИНУ

Капреоміцин (або капастан, хелпоміцин, лікоцин, капоцин) - природний антибіотик поліпептидної природи. Інгібує синтез білка у бактеріальній клітині, виявляє бактеріостатичну дію. Вибірково активний відносно мікобактерій туберкульозу, що локалізуються поза- і усередині клітини. При монотерапії швидко спричинює появу резистентних штамів, характеризується наявністю перехресної стійкості до канаміцину.

Капреоміцин застосовують як препарат резерву для лікування туберкульозу легень при непереносимості або нечутливості до препаратів I ряду (у тому числі при множинній резистентності) мікобактерій туберкульозу до лікарських засобів.

*Mycobacterium tuberculosis*, збудник туберкульозу, викликав у людей з початку цивілізації захворювання. Незважаючи на більш ніж 50 років розвитку вакцини та антибіотиків, було підраховано, що між 1998 та 2030 роками виникне 225 мільйонів нових випадків туберкульозу, з 79 мільйонами смертей, пов'язаних з туберкульозом. Одним із завдань у лікуванні цього захворювання є поширений розвиток мультирезистентного туберкульозу (МЛС-ТБ), який визначається як інфекція, яка не реагує на лікування будь-яким із препаратів першого ряду ізоніазиду та рифампіну. Розвиток МЛС-ТБ призвело до збільшення уваги до використання препаратів другого ряду для лікування цих інфекцій. Одним з цих препаратів другого ряду є капреоміцин, набір з чотирьох структурно споріднених пептидних антибіотиків. Важливість капреоміцину для лікування МЛС-ТБ відображена в тому, що цей препарат включений до переліку основних лікарських засобів Всесвітньої організації охорони здоров'я.

					<b>НУХТ БТЕК 04.03.07 КР ПЗ</b>			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	<b>РОЗДІЛ 1. Характеристика капреоміцину</b>	Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.		Устименко С.О.					1	7
Консульт								
Керівник		Слободян О.П.						
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог. Т.П.						
						<b>Кафедра БТМ</b>		<b>8</b>

Існує додатковий інтерес до капреоміцину через недавній висновок, що цей препарат є бактерицидним для нереплекуючого *M. tuberculosis*, що свідчить про потенційне застосування капреоміцину для лікування латентних інфекцій туберкульозу

Відродження туберкульозу є серйозною загрозою для здоров'я людини. В останні роки виникнення мультирезистентного туберкульозу (МЛС-ТБ), *M. tuberculosis* і вірус імунодефіциту людини дефектної суглобової туберкульозної інфекції знову призводить до тенденцій попиту у всьому світі.

Капреоміцин є вторинним метаболітом, продукованим *Streptomyces capreolus* і вперше описаний Herr et al., (1960). Цей антибіотик є активним відносно ряду грампозитивних і грамнегативних організмів, але насамперед ефективний протимікобактерій. Лікування туберкульозу легень капреоміцином у поєднанні з парааміносалицилатом натрію дає результати, аналогічно до такого лікування ізоніазидом і парааміносалицилом натрію. [4]

Капреоміцин можна класифікувати як циклічний пептидний антибіотик, пов'язаний з аміноглікозидами, чий спосіб дії незрозумілий, хоча вважається, що вони поділяють подібні хімічні та біологічні характеристики, що і для віоміцину. Запропонований спосіб дії вимицина полягає в блокуванні синтезу білка при 30S рибосомного комплексу ініціації хоча точна роль капреоміцину у порушенні клітин-мішеней є лише спекуляцією. [9]

Ця сполука належить до класу органічних сполук, відомих як олігопептиди. Це органічні сполуки, що містять послідовність від трьох до десяти альфа-амінокислот, з'єднаних пептидними зв'язками.

Скелет оболонкового кільця продуценту модифікується і не білкові амінокислоти синтезуються природним шляхом множення на стадії рибосомального синтезу п'ятьма оболонковими кільцями. Бета-амінокислотні залишки активують ферменти в оболонці, і виступають в якості конденсаційного ферменту, внаслідок чого утворюється проміжним способом компонент капреоміцину ПА, ПВ - ефективний компонент перетворення ІА, ІВ. Синтез,

доповнений із зовнішніх попередників амінокислот капреоміцину, дозволяє істотно підвищити рівень ферментації капреоміцину.

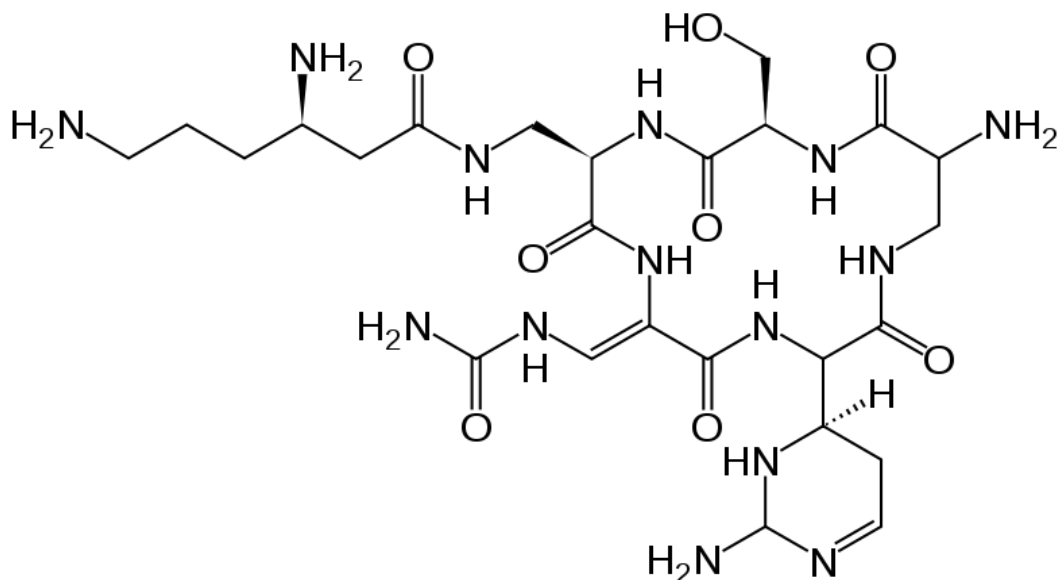


Рис 1.1. Структурна формула капреоміцину

Молярна маса капреоміцину складає 1321.4123 г/моль. Хімічна формула  $C_{50}H_{88}N_{28}O_{15}$ .

Основні фізико-хімічні властивості:



SMED.RU

Рис 1. 2. Ліфолізований порошок капреоміцину

Ліофілізований порошок від білого до майже білого кольору.[5]

Інгібує синтез білка у бактеріальній клітині, чинить бактеріостатичну дію. Вибірково активний щодо мікобактерій туберкульозу, що локалізуються поза і всередині клітини. При монотерапії швидко спричинює появу резистентних штамів, характеризується наявністю перехресної стійкості до канаміцину.[6]

### **Всмоктування і виведення.**

Коли внутрішньом'язово до нормальних добровольців надавалася доза 1 капреоміцину, 52% виводили з сечею протягом 12 годин.[5]

Номер реєстраційного посвідчення: UA/9885/01/01.

### **Протипоказання**

Підвищена чутливість до капреоміцину, дитячий вік, вагітність, період лактації. Капреоміцин протипоказаний при вагітності. При необхідності застосування препарату в період лактації, слід припинити грудне вигодовування.

### **Спосіб застосування та дози:**

Капреоміцин застосовується тільки парентерально: внутрішньом'язово (переважно) або внутрішньовенно. Капреоміцин завжди призначається в поєднанні хоча б з ще одним протитуберкульозним препаратом, до якого чутливий той штам *Mycobacterium tuberculosis*, який є у даного хворого.

Середня доза для пацієнтів з нормальною функцією нирок становить 1 г / добу, але не більше 20 мг / кг / доб. Препарат вводять протягом 60-120 днів, а потім - по 1 г 2 або 3 рази на тиждень. Лікування туберкульозу слід продовжувати протягом 12-24 міс.

Хворим з порушеннями функції нирок слід зменшити дозу відповідно до рекомендацій таблиці, наведеної нижче, ці дозування підібрані так, щоб досягти середнього рівноважного рівня капреоміцину 10 мг / л.

**Розрахунок дози для досягнення середньої рівноважної концентрації капреоміцину в сироватці 10 мг / л (виходячи з кліренсу креатиніну)**

Кліренс креатиніну (мл/хв)	Кліренс капреоміцину (л/кг/год·10 <sup>2</sup> )	Період напіввиведення (год)	Доза для наступних інтервалів		
			24	48	72
0	0,54	55,5	1,29	2,58	3,87
10	1,01	29,4	2,43	4,87	7,3
20	1,49	20,0	3,58	7,16	10,7
30	1,97	15,1	4,72	9,45	14,2
40	2,45	12,2	5,87	11,7	
50	2,92	10,2	7,01	14,0	
60	3,4	8,8	8,16		
80	4,35	6,8	10,4		
100	5,31	5,6	12,7		
110	5,78	5,2	13,9		

**Правила приготування і введення розчинів**

Для внутрішньом'язового або внутрішньовенного введення 1 г препарату (вміст 1 флакона) розчиняють в 2 мл 0,9% хлориду натрію для ін'єкцій або стерильної води для ін'єкцій. Для остаточного розчинення вмісту флакона слід почекати 2-3 хв. При інфузії розчинений капреоміцин слід розвести в 100 мл 0,9% розчину хлориду натрію для ін'єкцій і вводити протягом 60 хв. При внутрішньом'язовій ін'єкції розчинений капреоміцин вводять глибоко у відносно великий м'яз, оскільки поверхнева ін'єкція може викликати підвищену хворобливість і розвиток асептичних абсцесів.

Для введення дози менше 1 г можна скористатися наступною таблицею розведень.

Таблиця розведень

Кількість розчинника, що додається у флакон ємність 10 мл, який містить дозу капреоміцину 1 г	Об'єм розчину капреоміцину для ін'єкцій	Концентрація* розчину (прибл.)
2,15 мл	2,85 мл	350 мг*/ мл
2,63 мл	3,33 мл	300 мг*/ мл
3,3 мл	4 мл	250 мг*/ мл
4,3 мл	5 мл	200 мг*/ мл

\*Еквівалент активності капреоміцину.

Розчин може придбати блідо-солом'яне забарвлення і з часом потемніти, але це не супроводжується втратою активності або появою токсичності. Після розведення розчини капреоміцину для ін'єкцій можна зберігати в холодильнику не більше 24 годин.

#### **Побічні ефекти:**

З боку сечовидільної системи: нефротоксичність (олігурія, порушення функції нирок).

З боку нервової системи: нейротоксичність, нервова блокада.

З боку органів чуття: ототоксичність, вестибулярні порушення.

Алергічні реакції: кропив'янка, макулопапульозний висип, гіпертермія, еозинофілія.

Місцеві реакції: біль і ущільнення в місці ін'єкції, асептичний абсцес.

Інші: кровоточивість.

Лабораторні показники: тромбоцитопенія, лейкопенія, лейкоцитоз, підвищення рівня сечової кислоти (більше 20 мг / 100 мл), циліндрурія, гематурія, лейкоцитурія.

### **Особливі вказівки:**

До початку лікування капреоміцином і регулярно в процесі лікування слід проводити аудіометрію і оцінку вестибулярної функції.

Дослідження ниркової функції слід проводити як до початку лікування капреоміцином, так і щотижня в ході лікування. Можливо пошкодження нирок з некрозом каналців, підвищенням рівня азоту сечовини в крові (далі АМК) або креатиніну сироватки і появою аномального сечового осаду. Незначне підвищення АМК і креатиніну сироватки спостерігалось у значної частини хворих, що проходили тривале лікування. У великому відсотку цих випадків відзначалася поява в сечі циліндрів, еритроцитів і лейкоцитів. Підвищення рівня АМК, більш ніж 30 мг / 100 мл, а також будь-які інші ознаки зниження ниркової функції з підвищенням рівня АМК або без нього вимагають ретельного обстеження хворого, зниження дози або повної відміни препарату.

Клінічно значуще поява аномального сечового осаду і значуще підвищення рівня АМК (або креатиніну сироватки) під дією капреоміцину не встановлено.

Оскільки під час лікування може розвинутися гіпокаліємія, слід контролювати рівень калію в сироватці крові. При введенні великих доз капреоміцину може спостерігатися часткова нервово-м'язова блокада. Слід дотримуватися обережності при призначенні антибіотиків, в тому числі і капреоміцину, хворим з будь-якими формами алергії, особливо лікарської.[7]

## РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

### 2.1 Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища

Цільовий продукт капреоміцин (CMN) належить до сімейства туберактиноміцинів нерибосомних пептидних антибіотиків, які є важливими компонентами арсеналу лікарського засобу для лікування туберкульозу з множинною лікарською стійкістю. Члени цієї родини антибіотиків націлені на рибосоми чутливих бактерій і порушують функцію обох субодиниць рибосоми.

Капреоміцин має широкий спектр синтезування з актиноміцентів роду *Streptomyces*. Саме *Streptomyces capreolus* здатний синтезувати антибіотик капреоміцин, цей продуцент має невеликий спектр штамів для синтезу. Досліди довели, що антибіотик капреоміцин синтезується в промислових масштабах найбільше саме зі штаму *Streptomyces capreolus* NRRL2773. Інші штами здатні продукувати його аналог віоміцин, але було проаналізовано штаму *Streptomyces capreolus* NBRC12847 на предмет продукції капреоміцину. В наукових дисертаціях і патентах можна знайти іншу назву *Streptomyces capreolus*, яка є більш сучасною: «*Saccharothrix mutabilis subsp. Capreolus*». В таблиці 2.1 наведено характеристику біологічних агентів, а саме штамів *Saccharothrixmutabilissubsp.Capreolus*. [8]

Також антибіотик капреоміцин може виявляти свою активність з тест-культурою *Bacillus subtilis*. [9]

					НУХТ БТЕК 04.03.07 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Устименко С.О.			РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	Літ.	Арк.	Акрушів
Консульт							1	11
Керівник		Слободян О.П.				Кафедра БТМ 15		
Н. Контр.								
Зав. Каф.		Пирог Т.П.						

Таблиця 2.1

## Характеристика біологічних агентів

Біологічний агент	Склад поживного середовища	Показники синтезу (г/л)	Тривалість процесу (Год)	Особливості технологічного процесу	Використана література
<i>Streptomyces capreolus</i> NRRL2773	Глюкоза- 30 4.0 NZ-амін типу А 0,3 г/л CaCl <sub>2</sub> 2,5г/л MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 29,2 г/л  Геліта Сол П 7.0 г/л Бурякова меляса  0,5г/л  Натрій едетат 0,2 г/л  Полігліколь P2000	6 г/л	168	27-29 ° С  рН 7-8	[8]
<i>Streptomyces capreolus</i> NBRC1284 7	Екстракт дріжджів 3 г Екстракт солоду 3 г Бактеріологічний пептон 5 г Глюкоза 10 г Сахароза 170 г Агар 20 г  Апраміцин сульфат 0,5 г	50 мг/л	192-288	30° С  рН 7,2	[10]

### Короткий опис таблиці

*Streptomyces capreolus* NRRL2773 має складне середовище, динатрієва сіль, яка входить до поживного середовища піднімає його загальну вартість. Але в порівнянні з іншим продуцентом має значно більший вихід антибіотика, відносний вихід антибіотика становить 6 г/л. Параметри культивування приблизно однакові в порівнянні з іншими штамми, але час культивування коротший.

*Streptomyces capreolus* NBRC12847 має просте середовище, що базується на солодовому і дріжджовому екстракту. Але даний штам має багато мінусів у порівнянні з іншим штамом. Відносний вихід антибіотика є дуже низьким, він становить 50 мг/л. Тривалість культивування значна більша і може коливатися від 8 днів до 12. Хоча поживне середовище і дешевше, але воно не компенсуватиме затрат грошей і часу в порівнянні з іншими штамми.

Методи синтезу через стрептоміцин поліпшують, доповнюючи відповідні попередники, одночасно стимулюючи ефективний синтез та уникаючи отруєння штамів капреоміцину. Полімерні мікросфери є дуже зручною і гнучкою системою для розробки аналізів, тест-систем та біорозподілу, а також в якості стандартів. За своїм специфічним властивостям полімерні мікросфери можна розділити на не пофарбовані (білі): пофарбовані, флуоресцентні та суперпарамагнітні.[11]

Отже, надалі додають суперпарамагнітні мікросфери, вони зменшують зворотний зв'язок із продукуванням бактерій і тим самим значно підвищують вихід капреоміцину. Суперпарамагнітні мікросфери використовуються після стерилізації для забезпечення очищення РНК/ДНК, що забезпечує синтез більшої кількості маси капреоміцину.

Вартість поживних середовищ, використовуваних для вирощування продуцента  
капреоміцину *Streptomyces capreolus* NRRL2773

Біологічний агент	Концентрація кожного компонента поживного середовища (г/л)	Ціна компонента поживного середовища (грн/кг)	Вартість компонента (грн) для приготування 1 л середовища	Джерело інформації
<i>Streptomyces capreolus</i> NRRL2773	Глюкоза 30 г/л	80	2,4	[12]
	NZ-амін типу А 4.0 г/л	720	2,88	[13]
	Натрій едетат 0,5 г/л	1836 грн/500 г	1,83	[14]
	CaCl <sub>2</sub> 0.3г/л	35	0,01	[15]
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 2.5 г/л	65	0,16	[16]
	Геліта Сол П 29.2 г/л	720 грн/кг	21	[17]

	0,2 г/л Поліглікол ь P2000	40 грн/кг	0,01	[18]
	Бурякова м'яса 7.0 г/л	1000 грн/т	0,01	[19]
<i>Streptomyces capreolus NBRC12847</i>	Екстракт дріжджів 3г	180 грн/кг	0,54	[20]
	г Екстракт солоду 3 г	94 грн/кг	0,28	[21]
	Бактеріологіч ний пептон 5 г	720 грн/кг	3,6	[22]
	Глюкоза 10 г	80 грн/кг	0,8	[23]
	Сахароза 170 г	90 грн/кг	15,3	[24]
	Агар 20 г	950 грн/кг	19	[25]
	Апраміцин сульфат 0,5 г	1760 грн/кг	0,88	[26]

З даних наведених у таблиці 2 можна зробити висновок, що для приготування 1 л поживного середовища для *Streptomyces capreolus* NRRL2773 для синтезу капреоміцину ціна становить 28 гривень 30 копійок. А ціна для культивування штаму *Streptomyces capreolus* NBRC12847 вартість середовища становитиме 40

гривень 40 копійок. Набагато вигідніше буде обрати середовище, що призначене для штаму *Streptomyces capreolus* NRRL2773.

Ціна антибіотику на українському ринку становить 94 гривні 56 копійок за 1 ампулу в якій міститься 1 г діючої речовини[27]. В цілому при синтезі з продуцента *Streptomyces capreolus*NRRL2773 виробляється 6 г антибіотику, отже ціна виходу з 1 л середовища становитиме 567,36 гривень. А для синтезу 1 л цього ж середовища потрібно 28 гривень 30 копійок. Отже, прибуток становитиме 539 гривні 6 копійок. Ці умови є дуже вигідними для виробника.

Таблиця 2.3

Характеристика біологічного агента і поживного середовища

біологічний агент	вартість 1 л середовищ (грн.)	концентрація цільового продукту	умовна вартість 1 г(мг) цільового продукту (грн/г)	тривалість культивування	концентрація цільового продукту, синтезованого за год
<i>Streptomyces capreolus</i> NRRL2773	28 гривень 30 копійок	6 г/л	4, 71	168 год	0,035 г
<i>Streptomyces capreolus</i> NBRC12847	40 гривень 40 копійок	50 мг/л	808	192-288 год	0,20 мг

Виходячи із загального становища і спираючись на сукупність всіх раніше перерахованих вище фактів для продукування капреоміцину найвигіднішим буде обрати як біологічний агент *Streptomyces capreolus* NRRL2773, було обрано найефективніший метод, вигідні умови виробництва данного лікарського засобу для виробника.

## 2.2 Розрахунок складу поживного середовища для вирощування посівного матеріалу *Streptomyces capreolus* NRRL2773.

До складу обраного поживного середовища входять:

Глюкоза- 30

4.0 NZ-амін типу А

0,3 г/л CaCl<sub>2</sub>

2,5г/л MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O

29,2 г/л Геліта Сол П

7.0 г/л Бурякова меляса

0,5г/л Натрій едетат

0,2 г/л Полігліколь Р2000

Для того щоб мікроорганізми, які культивуються на поживне середовище проростали, поживне середовище повинно відповідати певним вимогам, тобто мати усі фактори росту, з яких будується клітина, при чому вони мають бути такі, щоб клітини була здатна їх засвоїти.

До складу бактеріальної клітини входять такі елементи, % до маси сухої речовини: вуглець-50; кисень -20; азот-10-14; водень- 8; фосфор-3; сірка, калій -1; кальцій, магній, хлор-0,5; залізо-0,2; решта елементів – близько 0,3. Тільки невелика кількість елементів періодичної системи потрібна мікроорганізму у відносно високих концентраціях ( $\geq 10^{-4}$  М). Це десять головних біологічних елементів: вуглець, кисень, водень, водень, азот, сірка, фосфор, калій, магній, кальцій та залізо. Крім десяти головних біоелементів, мікроорганізмам необхідні мінорні біоелементи, джерелом яких, як правило є водопровідна вода. У середовищі наведеного складу глюкоза є джерелом вуглецю, кисню та водню. CaCl<sub>2</sub> та MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O слугують джерелами кальцію, хлору, магнію, сірки і кисню. Бурякова меляса - вуглецю. Натрій едетат постачає азот, а Gelita Sol P (Пептонний гідралізат) є основним постачальником азоту, калій фосфор та ще багато мінорних біоелементів, а також слугує джерелом необхідних амінокислот, таких як пурини та піримідини, а також вітамінів В і їх похідних.

## *Розрахунок вмісту в середовищі джерела вуглецевого живлення*

### *Потреби для синтезу капреміцину*

Так як основним джерелом вуглецю для синтезу капреоміцину є глюкоза, розрахуємо, скільки вуглецю (за елементом С) міститься в 100г капреоміцину.

Молекулярна маса складає  $C_{50}H_{88}N_{28}O_{15}$  1321.4123 г/моль.

Отже, в 1321,4г міститься 600г вуглецю, а в 100г капреоміцину  $(600 \times 100) / 1321 = 45$ г вуглецю. В нашому середовищі синтезується 6г капреоміцину, а отже  $(600 \times 6) / 1321 = 2,7$ г.

### *Потреби для синтезу біомаси.*

Глюкоза в поживному середовищі є джерелом вуглецю. Вміст вуглецю складає 50% від маси сухої речовини. Молекулярна маса сахарози становить 180,156 г/моль, а вуглеця 72 г/моль. В обраному поживному середовищі у нас міститься 30 г/л глюкози, отже, складемо пропорцію для визначення вмісту вуглецю в глюкозі  $(72 \cdot 30) / 180,156 = 11,9$  г, а за умови, що 50% окислюється, сума становитиме 6,95 г.

В мелясі міститься приблизно 49% сахарози. Молекулярна маса сахарози становить 342,29 г/моль, з них вуглецю 144 г/моль. Розрахуємо вміст вуглецю в  $(144 \cdot 7) / 342 = 2,9$  г, з них 50% окислюється, отже вихід 1,45г.

Загалом в середовищі 8,4 г вуглецю, цього достатньо для синтезу 6г капреоміцину.

Розрахуємо вміст азоту в середовищі. В 6 г капреоміцину його вміст становитиме 0,29 г.

В пептонному гідралізаті міститься 14% азоту. В 29,2 г лептонного гідралізату міститься 4 г азоту, а за умови окиснення 90 % в середовищі для отримання маси є 0,4 г азоту. Цієї кількості достатньо для утворення 6г Капреоміцину.

**Висновок:** Після проведення розрахунку було встановлено, що обране поживне середовище підходить для даного продуценту *Streptomyces capreolus* NRRL2773 і дає спроможність синтезувати на ньому антибіотик капреоміцин в об'єму 6 г/л. Поживне середовище не потребує додавання HCl або NaOH.

## 2.3 Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента

Стрептоміцети (лат. *Streptomyces*) - рід бактерій родини Streptomycetaceae порядку актиноміцетів (*Actinomycetales*), є найбільшим родом сімейства (близько 700 видів, але не більше 835). Основними осередком існування є ґрунт і шари морської води. Стрептоміцети є відомими як продуценти багатьох антибіотиків і використовується з 1940-1950 р в промисловому виробництві антибіотиків. Сімейство Streptomycetaceae, зокрема, видів роду *Streptomyces*, вже давно є предметом дослідження завдяки своїй добре відомій здатності виробляти вторинні метаболіти. Попереднє велике вивчення філогенезу Streptomycetaceae на основі послідовностей генів 16S rRNA дало корисну основу для зв'язків між видами, але не завжди було достатньо дозволу для забезпечення остаточної ідентифікації. Зараз представники роду *Streptomyces* активно використовуються в генній інженерії як господарі для клонування і експресії чужорідної ДНК, так як в клітинах *Streptomyces* відбувається коректна упаковка білків і глікозилування, білок потім секретується в навколишнє середовище, на відміну від широко використовуваної для цієї мети *Escherichia coli*.

Вид *Streptomyces* вважаються сапрофітними бактеріями, присутніми в ґрунті та розпадаючою органічною речовиною. Проте, вони знаходяться у водоймищних будинках, де мешканці захворіли. Род вважається опортуністичним збудником, що викликає інфекцію.

*Морфологія та культуральні ознаки Streptomyces capreolus*

*Streptomyces capreolus* - актиноміцет, грампозитивний, спороутворюючий, утворює міцелій, факультативний оліготроф, мікроаерофіл, мешкає у ґрунті. Вони мають вигляд грибового типу. ДНК має високий вміст G-C. Субстрат міцелію, який, як передбачається, виросте на середовищі має середній діаметр 0,7 мкм і 0,01-0,02 мкм товщина клітинної стінки муко пептиду. Такий міцелій подовжений до апікальний ріст на кінчиках, одночасно розгалужуючи складну мережу взаємопов'язані гіфи, які ефективно охоплюють субстрат. Гіфи повітряного міцелію прямі або злегка звивисті, розпадаються на фрагменти різної довжини; поверхню суперечка гладка

Початковий етап зростання супроводжується коротким перериванням; накопичення біомаси потім відновлюється, що супроводжується виникненням повітряних гіфів на поверхні колонії та настанням вторинного метаболізму.

#### *Морфологічні ознаки*

Вони грам позитивні і мають вигляд грибкового типу. ДНК має високий вміст G-C. Гіфи повітряного міцелію прямі або злегка звивисті, розпадаються на фрагменти різної довжини; поверхню суперечка гладка.

#### *Фізіолого-біохімічні показники біологічного агента (хемоорганогетеротроф)*

*Streptomyces capreolus*- це представник мезофільних мікроаерофілів алкалофільних бактерій. Бактерії здатні рости на середовищах з 8,0-12,0, при температурному оптимумі 26-30° С

Приготування штамів стриптизованої рідини насіння *Streptomyces* штам *Streptomyces* або спори інокулюють у групу культур насіння 27-29 ° С, 48-72 год, щоб одержати насінну культуральну рідину.

#### *Антагоністичні властивості .*

Капреоміцин є антибіотиком, продукований *S. capreolus* відповідно, є сильним інгібітором синтезу білків бактерій. Хоча цей організм дуже толерантний до власних продуктів *in vivo*, його рибосоми повністю чутливі до дії препаратів *in vitro*. Однак вони обробляють нові антибіотикореактивні ферменти (капреоміцин фосфотрансфераза, капреоміцин-ацетилтрансфераза), які, крім можливої біосинтетичної ролі, можуть сприяти резистентності, що спостерігаються в організмі *in vivo*.

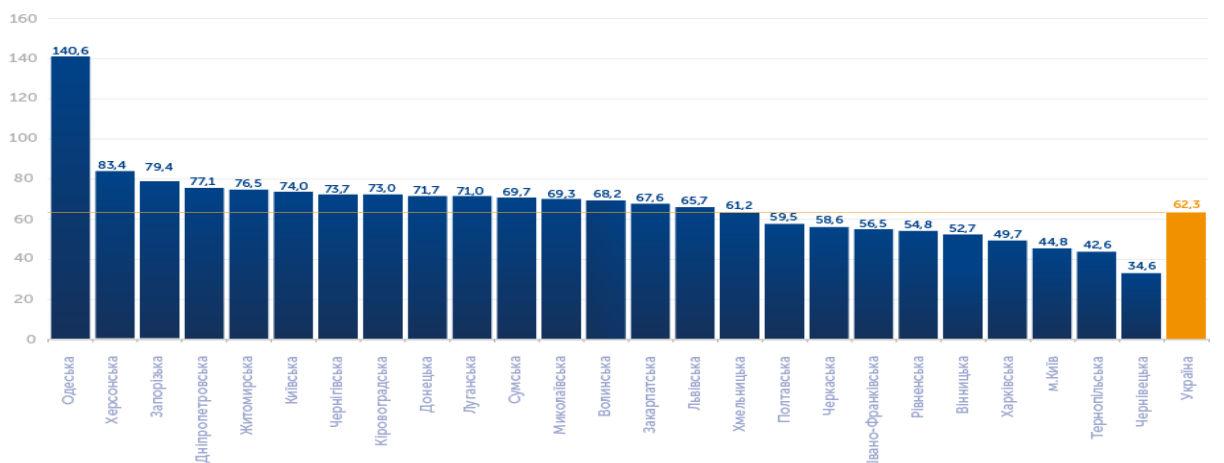
#### *Таксономічні властивості.*

У дев'ятому виданні Визначника бактерій Бергі всі прокаріоти розподілені по групах, які не мають таксономічного статусу. Група 25 - стрептоміцети і родинні форми. Актиноміцети утворюють добре розвинений повітряний міцелій, який в процесі подальшого циклу розвитку не розпадається на фрагменти. Розмноження спорами, що формуються на кінцях гіф, або шматочками вегетативного міцелію.

## РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

### 3.1 Потреба у цільовому продукті

За даними Центру медичної статистики МОЗ України, в Україні за 2018 р. кількість уперше зареєстрованих захворювань на ТБ, включно з його рецидивами, становила 26 321, або 62,3 на 100 000 населення, що на 2,5% менше 2017 р. (63,9 на 100 000). Захворюваність на ТБ серед дітей, яка тісно пов'язана з туберкульозом у дорослих, мала тенденцію також до зниження — на 4,3% (із 9,3 до 8,9 на 100 000 дітей віком до 14 років включно). Показник захворюваності на ТБ серед підлітків в Україні зменшився на 18,4% (із 23,3 до 19,0 на 100 000 дітей віком 15–17 років включно). Захворюваність на активний туберкульоз у поєднанні з хворобою, зумовленою вірусом імунодефіциту людини, за 2018 р. порівняно з 2017 р. мала тенденцію до зростання — на 3% (із 13,3 до 13,7 на 100 000 населення). Захворюваність на туберкульоз серед працівників закладів охорони здоров'я України за 2018 р. зменшилася на 6,3%, порівняно з 2017 р. (відповідно 6,0 проти 6,4 на 10 000 працівників ЗОЗ). [28]



\* На 100 000 населення.

www.phc.org.ua

Рис. 3.1 Захворюваність на туберкульоз в Україні станом на 2018 рік.

					<b>НУХТ БТЕК 04.03.07 КР ПЗ</b>			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Устименко С.О.			<b>РОЗДІЛ 3. Техніко- економічне обґрунтування</b>	Літ.	Арк.	Акрушів
Консульт							1	6
Керівник		Слободян О.П.				<b>Кафедра БТМ</b>		
Н. Контр.								
Зав. каф		Пирог Т.П.						

Це обумовлює необхідність застосування у клінічній практиці ефективних препаратів для лікування.

Комітет з лікування Міжнародної протитуберкульозної спілки в 1975 р. запропонував таку класифікацію протитуберкульозних препаратів:

- група А (найбільш ефективні) — ізоніазид, рифампіцин;
- група В (ефективні) — стрептоміцин, піразинамід, етамбутол, канаміцин, капреоміцин, етіонамід, циклосерин, віоміцин;
- група С (найменш ефективні) — ПАСК, тіоацетазон. [29]

Група В, або препарати II порядку назначають при комбінованому лікуванні туберкульозу легень, спричиненого чутливим до певного антибіотика (в нашому випадку - капреоміцину) мікобактеріями при неефективності або непереносимості препаратів I(A) ряду.

*Таблиця 3.1*

З наказу №2113 19.11.2018 «Про затвердження 100 % потреби та потреби у лікарських засобах та медичних виробках з урахуванням обсягу фінансування»[30]

Міжнародна непатентована назва лікарського засобу	Форма випуску	Дозування	Орієнтовний обсяг потреби, 100 відсотків	Орієнтовна кількість з урахуванням обсягу фінансування
Капреоміцин	ампули	1000 мг	12220	3156

Згідно Таблиці 3.1 ми можемо побачити, що станом на 2018 рік фінансування дозволяє закупити лише 25.86% необхідного обсягу антибіотика від 100%.

### 3.2 Розрахунок потужностей виробництва

На даний час в Україні немає фармацевтичних підприємств, котрі б виробляли вітчизняний препарат «Капреоміцин». Його постачання надає публічне акціонерне товариство «Київмедпрепарат». Закупівля 3,156 кг лікарського препарату «Капреоміцин» у вигляді порошку для розчинів для ін'єкцій згідно наказу МОЗ України №528 від 29.07.2019 проводиться у виробника "Neon Antibiotics Pvt.Ltd." для "Keenmind Pharmaceuticals Pvt.Ltd", Індія.

Враховуючи фінансування України на забезпечення населення антибіотиком «Капреоміцин», ми можемо розрахувати потужність виробництва.

Отже, продуцент *Streptomyces capreolus* NRRL2773 продукує 6 г капреоміцину на 1 л.

6000 мг - 1л;                      X=526 л культуральної рідини

3156000 мг – X.

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

$$V_{кр.} = 526 / (1 - 0,4) = 876 \text{ л.}$$

### 3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів і геометричного об'єму ферментера для біосинтезу капреоміцину.

Для лікування легеневого туберкульозу дорослого населення України препаратами капреоміцину необхідно одержати (з урахуванням втрат і очищенні)  $876 \text{ л} = 0,876 \text{ м}^3$  культуральної рідини.

Розрахуємо кількість культуральної рідини, яку необхідно отримати за цикл ферментації і стадій приготування посівного матеріалу.

На 2020 рік кількість робочих днів становитиме 28 днів. Таким чином, кількість цільового продукту на добу складатиме:

$$V_d = V_{\text{гп}} / T_{\text{гд}} = 0,876 \text{ м}^3 / 28 \text{ днів} = 0,031 \text{ м}^3/\text{добу}$$

Кількість продукту за один цикл ( $V_{\text{кр}}$ ) становитиме:

$$V_{\text{кр}} = (K_1 \cdot V_d \cdot T_{\text{цф}}) = 1,2 \cdot 0,031 \cdot 174,5 = 0,27 \text{ м}^3$$

Цикл роботи ферментера ( $T_{\text{цф}}$ ) включає тривалість ферментації і тривалість підготовчих робіт. Тривалість біосинтезу – 168 год. Підготовчі роботи для ферментера включають 6,5 год: миття та огляд апарату – 1,5 год, підігрів апарату – 0,5 год, стерилізація апарату – 1 год, охолодження апарату 0,5 год, завантаження середовища – 1,5 год, засів – 0,5 год, вивантаження – 0,5 год. Так цикл роботи ферментера становить – 174,5 год.

Розрахуємо геометричний об'єм ферментера  $V_{\text{г}}$  для одержання необхідної кількості культуральної рідини:

$$V_{\text{г}} = V_{\text{цк}} / K_{\text{зп}} = 0,27 / 0,8 = 0,34 \text{ м}^3$$

Оптимальним буде використання ферментера для одержання 0,34 м<sup>3</sup> культуральної рідини з геометричним об'ємом  $V_{\text{ф}} = 0,42 \text{ м}^3$ , який буде зроблено на замовлення.

Перевіримо чи підійде обраний коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зп}} = V_{\text{цк}} / V_{\text{ф}} = 0,34 / 0,42 = 0,8 \text{ ;}$$

### **3.4 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для біосинтезу капреоміцину *Streptomyces capreolus* NRRL2773.**

За один виробничий цикл можливо отримати  $V_{\text{цк}} = 0,34 \text{ м}^3$  культуральної рідини.

При одержанні культуральної рідини втрат в результаті крапле виносу через колектор становить не буде. Так кількість поживного середовища та інокулянту перед виробничим біосинтезом складатиме:

$$V_{\text{роб1}} = V_{\text{цк}} = 0,34 \text{ м}^3$$

Розрахуємо можливий геометричний об'єм інокулятора для заданого об'єму культуральної рідини за коефіцієнта заповнення ( $K_{\text{зп}}$ ) – 0,8.

$$V_{\text{ф}} = V_{\text{роб1}} / K_{\text{зп}} = 0,34 / 0,8 = 0,42 \quad \text{м}^3$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний інокулятор –  $V_{\text{сф}} 0,42 \text{ м}^3$  і перераховуємо попередньо заданий коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зп1}} = V_{\text{роб1}} / V_{\text{ф}} = 0,34 / 0,42 = 0,8$$

Отримане значення не перевищує задане значення, а отже коефіцієнт заповнення був обраний правильно.

Кількість посівного матеріалу ( $X_{\text{ф}}$ ) для засіву інокулятора складає 10% від об'єму поживного середовища. Кількість поживного середовища в обраному інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{пс1}} = V_{\text{роб1}} / (1 + X_{\text{ф}}) = 0,34 / 1,1 = 0,30$$

Так кількість посівного матеріалу складатиме:

$$V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб1}} - V_{\text{пс1}} = 0,34 - 0,3 = 0,04$$

Для одержання 0,04 м<sup>3</sup> посівного матеріалу в інокуляторі втрати у результаті крапле виносу через колектор відпрацьованого повітря Так, кількість

поживного середовища  $V_{пс2}$  і посівного матеріалу ( $V_{пм2}$ ) становитиме:

$$V_{роб2} = V_{цк} = 0,04 \text{ м}^3$$

$$V_{пс2} = V_{роб2} / (1 + X_{ф}) = 0,04 / 1,1 = 0,036 \text{ м}^3$$

$$V_{пм2} = V_{роб2} - V_{пс2} = 0,004 \text{ м}^3$$

Об'єм інокулянту  $V_{роб2} = 0,04 \text{ м}^3$  можна отримати під час культивування штаму-продуцента у посівному апараті з геометричним об'ємом  $V_{пм2} = V_{роб2} / K_{зп} = 0,04 / 0,8 = 0,05 \text{ м}^3$ .

Приймаємо стандартний посівний апарат з геометричним об'ємом  $V_{сф2} = 0,06 \text{ м}^3$ . Уточнюємо прийнятий коефіцієнт заповнення  $K_{зп2} =$

$$V_{роб2} / V_{сф2} = 0,05 / 0,06 = 0,8$$

Кількість посівного матеріалу для засіву невеликого ферментера

$V_{пм5} = 4000 \text{ мл}$  можна отримати шляхом культивування штаму-продуцента в

колбах на качалці. Для цього використовують колби Еленмеєра з  $V_{колб} = 750 \text{ мл}^3$

коефіцієнтом заповнення  $K_3 = 0,2$ .

Кількість колб для отримання посівного матеріалу становитиме:

$$N_{колб} = V_{пм5} / (V_{колб} \cdot K_3) = 4000 / (750 \cdot 0,2) = 27$$

Таким чином для одержання інокулянту необхідно 27 колб Еленмеєра.

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого

біосинтезу капреоміцину у двох ферментерах ферментері об'ємом  $0,16 \text{ м}^3$  з

коефіцієнтом заповнення 0,8 буде проходити в чотири етапи. Так, за

результатами розрахунків для біосинтезу капреоміцину

*Streptomyces capreolus* NRRL2773 необхідно встановити наступні апарати: два

ферментера об'ємом  $0,16 \text{ м}^3$ , один інокулятор ємністю 30 л.

## РОЗДІЛ 4. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

### 4.1 Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого синтезу

Стрептоміцети (лат. *Streptomyces*) - рід бактерій родини Streptomycetaceae порядку актиноміцетів (*Actinomycetales*), є найбільшим родом сімейства (близько 700 видів, але не більше 835 ). *Streptomyces capreolus* - актиноміцет, грампозитивний, спороутворюючий, утворює міцелій, факультативний оліготроф, мешкає у ґрунті. Вони мають вигляд грибкового типу. ДНК має високий вміст G-C. Субстрат міцелію, який, як передбачається, виросте на середовищі має середній діаметр 0,7 мкм і 0,01-0,02 мкм товщина клітинної стінки муко пептиду. Такий міцелій подовжений до апікальний ріст на кінчиках, одночасно розгалужуючи складну мережу взаємопов'язані гіфи, які ефективно охоплюють субстрат. Гіфи повітряного міцелію прямі або злегка звивисті, розпадаються на фрагменти різної довжини; поверхню суперечка гладка.

Початковий етап зростання супроводжується коротким перериванням; накопичення біомаси потім відновлюється, що супроводжується виникненням повітряних гіфів на поверхні колонії та настанням вторинного метаболізму.

*Streptomyces capreolus*- це представник мезофільних факультативних анаеробних алкалофільних бактерій. Бактерії здатні рости на середовищах з діапазоном значень рН 8,0-12,0, при температурному оптимумі 26-30° С°. *Streptomyces capreolus* є факультативним анаеробом. за здатністю утилізувати вуглеводи: глюкоза, цукроза, арабіноза, фруктоза, рафіноза, рамноза позитивний, ксилозонегативний , поліцукри (целюлоза), багатоатомні спирти (маніт, сорбіт- позитивний), відновлювати нітрати до нітритів і/або молекулярного азоту, утворювати сірководень і аміак, синтезувати позаклітинні ферменти (амілаза, колагеназа). Тривалість культивування становить 168 годин.

					НУХТ БТЕК 04.03.07 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Устименко С.О			<b>РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми</b>	Літ.	Арк.	Акрушів
Консульт							1	15
Керівник		Слободян О.П.				<b>Кафедра БТМ</b> 31		
Н. Контр.								
Зав. Каф.		Пирог Т.П.						

Для синтезу капреоміцину було обрано періодичний глибинний метод. Саме цей метод використовують для мікроорганізмів з анаеробним типом дихання і для густих поживних середовищ, в яких мікроорганізми розвиваються по всій товщі.

Поєднання поживного середовища і мікроорганізмів, які ростуть в ньому називають культуральною рідиною.

Перевага глибинного культивування заключається у тому, що цей спосіб не потребує великих площ і громіздкого обладнання, об'єм ферментаторів можна збільшити за рахунок збільшення висоти. Також перевагою являється простота обслуговування, можливість автоматизації, а головне, зручність видалення непошкодженого цільного продукту із культуральної рідини.

У середовищі присутні компоненти, що сприяють піноутворенню, наприклад Полігліколь, тож необхідно передбачити внесення піногасника. Як піногасник можна використати рослинні олії або синтетичні піногасники на основі модифікованих полісилікатів. Як правило, у якості піногасника використовують жири рослинного походження (наприклад, фірми "Structol").

Біосинтез капреоміцину проводять в два етапи: перший етап- підготовка посівного матеріалу, а другий – одержання цільового продукту. Для пришвидшення росту культури проводять перший етап, він заключається в тому, щоб утворилися вегетативні клітини продуцента, які надалі будуть використані як посівний матеріал для отримання продуцента. Для цього необхідно відновити музейну культуру, яка знаходиться у замороженому стані при  $-80^{\circ}\text{C}$  з 10% гліцерином в якості кріопротектора. Її відновлюють на агаризованому середовищі за температурою  $30^{\circ}\text{C}$  протягом 7 днів. При утворенні спор їх відбирають і розводять до кількості  $10^3$ -  $10^5$  спор/мл використовують для засівання поживного середовища і інкубують у колбах на качалках за температурою  $30^{\circ}\text{C}$  і рН 7,0 при 100 об/хв. Це забезпечує скорочення лаг-фази і дає змогу росту з експоненційної фази.

#### **4.1.2 Обґрунтування способу культивування і типу ферментера**

Другий етап виробничого синтезу капреоміцину є культивування у ферментері відповідного робочого об'єму при приблизно аналогічному температурному режимі.

Методи синтезу через стрептоміцин поліпшують, доповнюючи відповідні попередники, одночасно стимулюючи ефективний синтез та уникаючи отруєння штамів капреоміцину. Полімерні мікросфери є дуже зручною і гнучкою системою для розробки аналізів, тест-систем та біорозподілу, а також в якості стандартів. За своїм специфічним властивостям полімерні мікросфери можна розділити на не пофарбовані (білі): пофарбовані, флуоресцентні та суперпарамагнітні.[31]

Подальше додають полімерні мікросфери діаметром 5-30 мкм у кількості 10-20 г на л культуральної рідини, вони зменшують зворотний зв'язок із продукуванням бактерій і тим самим значно підвищують вихід капреоміцину. Суперпарамагнітні мікросфери на даному етапі технологічного процесу використовуються як стандарт. Капреоміцин є вторинним метаболітом, тому суперпарамагнітні мікросфери створюють певні умови для забезпечення очищення РНК/ДНК, що забезпечує синтез більшої кількості маси капреоміцину, використовуються після стерилізації.

#### **4.1.3 Вибір мийних та дезинфікуючих засобів**

*Streptomyces capreolus* здатен до утворення міцелію, тому при перемішуванні середовища потрібно уникати надлишкових зрізових зусиль. Аби цьому запобігти використовують турбідні мішалки, або зменшують швидкість перемішування.

Виробництво поверхневого антибіотику капреоміцин здійснюється упродовж 28 днів (див. розділ 1). Оптимальна площа виробничого приміщення, в якій встановлено ферментер (420 л), інокулятор (60л), качалки, збірники, автоклав та інше обладнання становить 42 м<sup>2</sup> (7×6 м). Висота стін – 4 м. Загальна площа стін становить  $((7 \times 4) + (6 \times 4)) \times 2 = 104 \text{ м}^2$ . Площа підлоги – 42 м<sup>2</sup>. Визначимо площі поверхонь, які необхідно мити та/або дезінфікувати.

**Розрахунок загальної площі миття та/або дезинфекції оброблюваного об'єкту за весь період виробництва поверхневого антибіотику капреоміцину**

Об'єкт миття та/або дезинфекції	Площа (об'єм) оброблюваного об'єкту, м <sup>2</sup> (л)	Кількість процесів миття та/або дезинфекцій за весь період виробництва	Загальна площа (об'єм) миття та/або дезинфекції об'єкту за весь період виробництва, м <sup>2</sup> (м <sup>3</sup> )
Обладнання, інвентар, комунікації	1626	4	6504
Підлога	42	28	1176
Стіни, двері, вікна	104	7	728

Щоб обрати миючий та дезинфікуючий засіб, необхідно врахувати його вартість та витрати на оброблювання потрібної площі виробничого приміщення. Приблизно на 1 м<sup>2</sup> витрачається 100 мл робочого розчину мийного чи дезинфікувального засобу (згідно з методичними рекомендаціями щодо підготовки виробничих приміщень, наказ МОЗ України від 14.12.2001 № 502).

## Узагальнена характеристика витрат мийних та дезінфікувальних засобів для виробництва

Назва миючого/ дезінфікуючого засобу	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> (л)	Кількість робочого розчину за весь період виробництва, л	Вартість 1 л/кг мийного або дезінфікувально-го засобу, грн	Загальна вартість миття та/або дезінфекції за весь період виробництва, грн
Біомой	Обладнання, інвентар, комунікації, тара	0,3	6504	3252	34	331,70
Хлорантоїн 0,2%	Стіни, підлога, вікна, двері, інвентар, тара	0,2	1176	117,6	108,54	255,28

Дезактін	Стіни, тара підлога, вікна, двері, інвентар	0,2	1176	117,6	135	317,52
Лізоформін 3000	Обладнання, інвентар,  комунікації, тара, стіни, підлога, вікна, двері, інвентар	0,1	7680	7680	375	2880
Каустична сода	Обладнання, інвентар,  комунікації,  тара	2,0	6504	3252	18	1170,72
Маносепт	Миття рук персоналу	-	-	-	-	114

Проаналізувавши дані, наведені у Таблицял. 4.2, можна зробити такі висновки:

- для миття обладнання, інвентарю, комунікацій, тари доцільно використовувати мийний засіб Біомой;
- для миття та дезинфекції стін, підлоги, вікон та дверей – Дезактін та Хлорантоїн, оскільки вони є мийно-дезинфікувальними засобами, що дає змогу заощадити кошти.
- засіб Лізоформін 3000 є універсальним і може використовуватися для миття будь-яких поверхонь.

Засоби варто застосовувати з інтервалом в 3 місяці для запобігання розвитку стійких штамів мікроорганізмів [32],

Миття ферментера (12500 л), інокуляторів (1000 л, 100 л, 10 л), збірників для приготування композицій для двох стадій культивування (загалом 200 л) відбуватиметься циркуляційним способом. Об'єм мийного засобу складатиме близько половини кожного з відповідних об'ємів обладнання. Всього для одного циклу необхідно витратити приблизно 150 л робочого розчину мийного засобу, а для всього періоду виробництва – 3600 л.

Підлогу необхідно мити та дезинфікувати кожного дня (всього 28 разів), стіни, двері та вікна – 1 раз на місяць, тобто 1 раз.

Чистота повітря в приміщеннях повинна відповідати встановленим нормам [32], отже обираємо періодичність включення стельових бактерицидних ламп - 1 година після кожного генерального прибирання та 0,5 години кожного робочого дня (під час обідньої перерви).

#### **4.1.4 Обґрунтування стадії підготовки обладнання і комунікацій.**

Для підготовки обладнання і комунікацій обирають спосіб зовнішньої та внутрішньої мийки. Розрізняють наступні способи мийки: ручна; мийка

замочуванням (ванни для замочування з'ємних деталей); струминна мийка під високим тиском; пінна мийка із застосуванням гелів; циркуляційна СІР-мийка (Cleaning In Place) – безрозбірна мийка (часто автоматизована) для ємностей і трубопроводів за допомогою пристроїв високого та низького тиску. Обґрунтовують температурний та часовий (залежно від ємності обладнання) режими ополіскування.

### **Стадія технічного огляду (ТО).**

Після миття та ополіскування ємнісного обладнання проводять його технічний огляд з метою виявлення можливих неущільнень в комунікаціях та запірній арматурі на обладнанні. У разі їх знаходження проводять підтягування різьбових з'єднань.

### **Перевірка на герметичність.**

Наступна стадія підготовки обладнання (інокуляторів, посівних апаратів, ферментера) до стерилізації полягає в перевірці їх на герметичність. Для цього на апараті закривають усю запірну арматуру і подають аераційне повітря до набору надлишкового тиску  $P = 0,1 - 0,2$  МПа.

Перекривають вентиль подачі повітря і фіксують покази манометра на кришці апарату та час витримки (30–60 хв) в операційному журналі. Якщо падіння тиску не перевищує 0,01 МПа, вважається, що апарат герметичний. В іншому випадку здійснюють пошук неущільнень на апараті та у місцях з'єднання запірної арматури з комунікаціями.

Для цього використовують такі методи. Найпростіший – «омилювання» місць з'єднань. Готують мильний розчин і резиновою грушою оприскують всі місця з'єднань. У разі появи в місцях оприскування дрібних мильних бульбашок фіксують це місце і здійснюють підтягування різьбового з'єднання. Якщо ця операція не дала позитивного результату, міняють прокладку і операцію

«омилювання» повторюють. Процес здійснюють до ліквідації усіх виявлених неущільнень.

Проте такий метод є трудомістким та йому притаманні ряд недоліків (необхідність створення достатньо високого тиску в апараті, неможливість контролю при підвищених температурах поверхностей апарата та вузлів, неможливість перевірки важкодоступних вузлів). Сучасніший метод перевірки на герметичність базується на використанні галогенових течієпошукачів. Прилад укомплектований тонким щупом та вимірювачем вмісту галогену. Перед набором тиску в апарат вносять (поміщають) невелику кількість легкої галогенвмісної речовини, зазвичай чотирихлористий карбон (CCl<sub>4</sub>), шестифтористий сульфур (SF<sub>6</sub>) або фреон-12, закривають усю запірну арматуру, апарат нагрівають до температури 80о С і збільшують тиск в апараті до 0,2 МПа. Пари галогенвмісної речовини проникають через неущільнення і виявляються у разі наближення щупа течієпошукача до них. Тривалість перевірки одного апарату цим методом становить 1,5–2 год. У разі виявлення неущільнень здійснюють операції з їх ліквідації як описано вище.

Стадія стерилізації обладнання та комунікацій.

Для цього використовують, зазвичай, термічну стерилізацію водяною насиченою парою з тиском  $P= 0,28-0,3$  МПа. Процес умовно поділяють на три етапи: нагрів апарата, витримування за температури стерилізації (стерилізація) та охолодження.

*Нагрів апарата.* Під час стерилізації апарата попередньо в сорочку подають глуху пару і прогрівають апарат до температури 80–90°С.

*Стерилізація.* Відкривають усю запірну арматуру на відкритих трубних закінченнях та підведених до апарата комунікаціях і подають гостру пару безпосередньо в апарат через барботер або нижній спуск, попередньо відкривши вентиль виходу відпрацьованого повітря для видалення повітря з

апарату. При досягненні в апараті температури стерилізації  $t_{ст} = 130-135$  оС закривають усю запірну арматуру на апараті, крім парової, і витримують заданий час стерилізації. При стерилізації апарата паралельно стерилізуються індивідуальні фільтри стерильного та відпрацьованого повітря.

*Охолодження.* Закриваються уся запірні арматура подачі пари в апарат. У сорочку подається холодна вода. Для компенсації падіння тиску (утворення вакууму при конденсації пари в апараті) в апарат подають стерильне повітря. Процес охолодження здійснюють до досягнення температури до 30–40 оС і надлишкового тиску  $P = 0,003-0,005$  МПа.

#### **4.1.5. Обґрунтування стадій підготовки аераційного повітря.**

*Streptomyces capreolus*- це представник мезофільних мікроаерофільних алкалофільних бактерій. Бактерії здатні рости на середовищах з діапазоном значень рН 8,0-12,0, при температурному оптимумі 26-30° С°.

В наукових дисертаціях і патентах можна знайти іншу назву *Streptomyces capreolus*, яка є більш сучасною: «*Saccharothrix mutabilis subsp. Capreolus*».

*Saccharothrix mutabilis subsp. Capreolus* являє собою мікроаерофільний мікроорганізм, тип організмів, що вимагають наявності кисню для виживання, але одночасно вимагає оточень, де концентрація кисню нижча, ніж атмосферна (де його концентрація становить близько 20 %) його можна назвати факультативним анаеробом.

В цьому випадку штам який використовується для біосинтезу капреоміцину не потребує аерацій, бо здатні до типу дихання притаманному анаеробам — вилучення концентрованого кисню з матеріалів довкілля. [31]

#### **4.1.6 Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища для культивування *Streptomyces capreolus* NRRL2773 продуценту антибіотика Капреоміцин**

максимальний синтез антибіотика ( $P_{кр} = 6$  г/л за 168 год) досягається за умов росту штаму *Streptomyces capreolus* NRRL2773 на середовищі такого складу (г/л):

Глюкоза –  $C_1 = 30$

NZ-амін типу А  $C_2 = 4.0$

CaCl<sub>2</sub> -  $C_3 = 0,3$  г/л CaCl<sub>2</sub>

MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O -  $C_4 = 2,5$ г/л

Геліта Сол П –  $C_5 = 29,2$  г/л

Бурякова меляса -  $C_6 = 7.0$  г/л

Натрій едетат –  $C_7 = 0,5$ г/л

Полігліколь Р2000 –  $C_8 = 0,2$  г/л

Згідно розрахунків розділу ТЕО, виробничий біосинтез відбувається у декілька етапів: одержання посівного матеріалу у колбах на качалках, та інокуляторах, посівних апаратах і ферментері.

##### *Приготування і стерилізація поживного середовища*

Кожний етап стерилізації потребує створення композицій, в нашому випадку 3. На першому етапі стерилізація в колбах на качалках 600 мл.

**Композиція А:** Глюкоза, бурякова меляса. Склад компонентів визначається більшою спорідненістю компонентів. Також ці компоненти містять в основному джерела вуглецю і не містять великої кількості термолабільних речовин. (режим стерилізації:  $t - 130^{\circ}\text{C}$ , тривалість – 20 хв.);

**Композиція Б:** пептонні гідролізати: NZ-амін типу А, Геліта Сол П. Даний склад композиції пояснюється наявністю у ній споріднених компонентів білкової природи, які можуть містити термолабільні поживні речовини, тому

потребують більш низької температури стерилізації. (режим стерилізації:  $t - 120^{\circ}\text{C}$ , тривалість – 20-30 хв.);

**Композиція В:**  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , натрій едетат. Солі кристалогідрату магній сульфату і кальцій хлориду дають малорозчинний  $\text{CaSO}_4$ , але натрій едетат робить нерозчинні солі розчинними, тому їх і об'єднано в одну композицію (режим стерилізації:  $t - 131^{\circ}\text{C}$ , тривалість - 40-60 хв. )

Надалі відбувається розрахунок для кожного етапи стерилізації.

## 4.2 Обґрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту

Після процесу ферментації настає процес виділення і очищення антибіотика. Для видалення антибіотику капреоміцин використовують метод іонообмінної хроматографії або метод манітної сепарації за допомогою додавання суперпарамагнітних мікросфер.

Процес іонообмінної хроматографії включає смолообмін згорнутого стрептоміцетом ферментованого продукту метаболізму, промивання для усунення домішок на поверхні смоли, елюювання сірчаною кислотою, знесолення, знешкодження, знебарвлення, повторну нейтралізацію, концентрування та рафінування. Технологічний процес може скомпанувати біоактивність СРМ і має високу якість продукції, високий вихід продукту, але він є довготривалим. Даний винахід відноситься до проведення колонкової хроматографії з використанням глинозему як адсорбентної смоли для капреоміцину, отриманого з мікробної культури, до способу очищення антибіотику капреоміцин. У способі згідно з цим винаходу глиноземна смола переважно активуються послідовно соляною кислотою, гідроксидом натрію та сірчаною кислотою. Крім того, антибіотик капреоміцин, отриманий з культурального середовища мікроорганізмів, переважно буде розчинятися в зворотному осмосі (R / O вода), тоді як проточний зворотний осмос може виконувати колонкову хроматографію. Потім елюат, отриманий з колонковою хроматографією, концентрують за допомогою зворотного осмосу, більш кращим є крапельна кристалізація етанолу.[34]

Технологія виділення і очищення капреоміцину за допомогою манітної сепарації за допомогою додавання суперпарамагнітних мікросфер включає наступні етапи:

- Додавання у культуральну рідину після біосинтезу суперпарамагнітних мікросфер - порошку наночасток оксиду заліза ,
- Промивання і підкислення реакційної суміші;
- Декантація наночасток,
- Освітлення розчину шляхом додавання активованого вугілля;
- Фільтрування розчину для вилучення вугілля;
- Нанофільтрація освітленого розчину;
- Сушіння отриманого концентрату у розпилювальній сушарці.

Спосіб виділення і очищення включає наступні етапи.

#### I етап

Порошок суперпарамагнітних мікросфер оксиду заліза з діаметром часток 30 мкм кількістю 30 г на 1 л культуральної рідини додають у культуральну рідину , перемішують протягом 2 годин.

#### II етап

У середовище додають промивну суміш: 100 мл промивної води + 200 мл 0,5М розчину соляної кислоти на 1 л культуральної рідини.

#### III етап

У культуральну рідину додають активоване вугілля кількістю 0,5-1г на 1 л для освітлення розчину. Отриману суспензію фільтрують для видалення вугілля і

мікросфер.

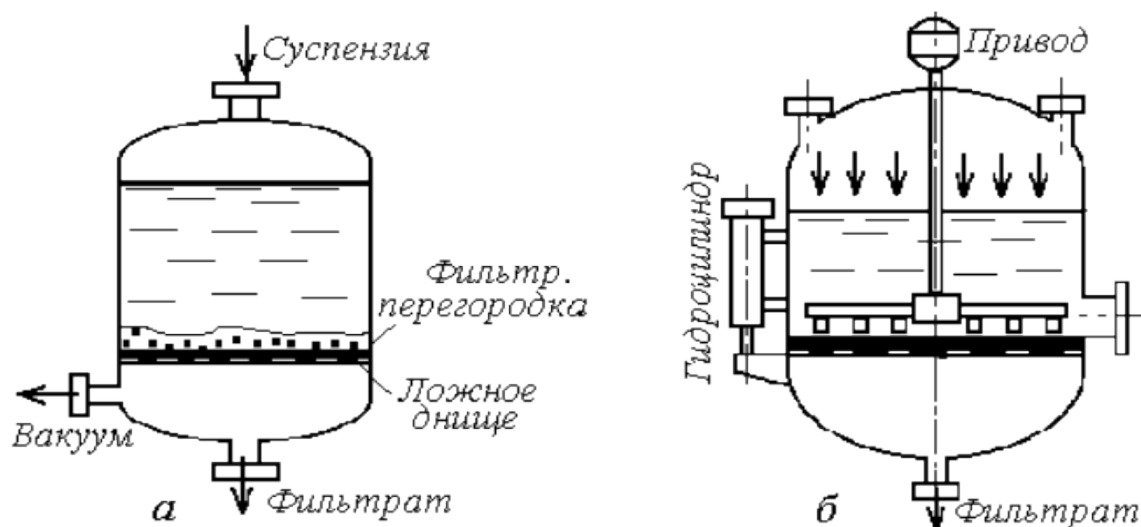


Рис. 4.1 Приклад фільтрування на НУТЧ фільтрі

Освітлений розчин далі очищують на установці нанофільтрації.

IV етап

Концентрат, що утворився сушать у ліофільній сушці.

В ході порівняння цих двох методів було вихначено, що більше переваг є у методі з використанням суперпарамагнітних мікросфер, а саме:

- Відсутність необхідності попередньої обробки та/або попереднього нагрівання культуральної рідини;
- Технологія не потребує використання дорогого обладнання;
- Скорочення тривалості виділення і очищення капреоміцну на 33,3%,
- Зменшення відходів виробництва на 50%,
- Збільшення виходу капреоміцину на 10 %,
- Можливість адаптації технології для промислового виробництва капреоміцину.

Магнітовмісні полімерні мікросфери, як один з різновидів магнітокерованих дисперсних систем, найбільш інтенсивно розвиваються сучасними засобами для вирішення ряду завдань медичної біотехнології, мікробіології, імунології, клітинної біології та медицини, паразитології, біохімії та екології.

Магнітовмісні полімерні мікросфери представляють собою частинки різних природних і синтетичних матеріалів з розмірами від 0,01 до 100 мкм, що містять високодисперсні частинки заліза, кобальту, нікелю, різних магнітних оксидів і інших речовин, що володіють магнітними властивостями.

Такі системи часто використовуються в апаратах для проведення ферментативних реакцій, для виділення і культивування клітин, в різних видах імуноаналізу, як магнітних міток, для спрямованого транспорту ліків в організмі людини за допомогою магнітного поля.

Метод магнітної сепарації з використанням магнітосприйнятливих дисперсних систем дозволяє істотно спростити і прискорити процеси поділу цінних біологічно-активних сполук у порівнянні з різними варіантами колоної хроматографії та іншими методами. Метод магнітної сепарації на магнітовмісних полімерних мікроносіях дозволяє отримати речовину з високим ступенем чистоти.

Для більшості галузей використання полімерних мікросфер потребує мікроносіїв з суперпарамагнітними властивостями, тоді мікроорганізми практично не матимуть залишкову намагніченості, і не будуть схильні утворювати агломерації часточок у відсутності магнітного поля після хоча б одноразового намагнічування.[35]

У методі магнітної сепарації у виробництві можуть використовуватися іонообмінні смоли. Іонообмінні смоли - це сполуки, іони яких здатні до обміну з іонами того ж заряду і знака, які знаходяться у розчині електролітів. Іонообмінні смоли тверді, нерозчинні, гранично набухаючі в розчинах електролітів та органічних розчинниках зшиті полімери, здатні до електролітичної дисоціації. До складу іонообмінних смол входить матриця (сітчастий полімер) та закріплені на ній іоногенні групи, які несуть електричні заряди, врівноважені рухливими іонами протилежного знака (напр.  $\text{SO}_3\text{H}$ ,  $\text{COOH}$ ,  $\text{PO}_3\text{H}_2$ ,  $\text{N}^+(\text{CH}_3)_2\text{C}_2\text{H}_4\text{OH}$ ,  $\text{N}^+\text{R}_3$ ,  $\text{NH}_2$ ). Залежно від знака іонів, що обмінюються, розрізняють катіонообмінні смоли, аніонообмінні та амфотерні[36].

Хоча іонообмінні смоли у порівнянні з полімерними мікросферами на одному рівні, ми обираємо саме суперпарамагнітні мікросфери у зв'язку із їх попереднім використанням у культивуванні.

Використання магнітної сепарації має наступні переваги:

1. Використання суперпарамагнітних мікросфер позбавляє від необхідності попередньої обробки та попереднього нагрівання ферментаційного бульйону під час процесу екстрагування, завдяки чому можна досягти простого та легкого розділення цілі, виробничий цикл скорочується з 56 год до 18 год, а ефективність підвищується на 33,3%, зменшуючи скидання відходів рідкої води на 50%;

2. Суперпарамагнітні мікросфери мають високу селективність, не можна використовувати дороге обладнання для вилучення та сепарування для отримання високоочищених капреоміцинових продуктів, якість продукції краща за стандарт фармакопеї, а вихід більший на 10%;

3. Захист навколишнього середовища за рахунок того, що не використовується органічний розчинник у всьому процесі вилучення і зменшуються затрати води, а також енергозбереження, за рахунок зменшення часу виробничого циклу

4. суперпарамагнітні мікросфери мають переваги переробки, повторного використання, легкої регенерації тощо;

5. Спосіб має нетривалий технологічний процес, долає недоліки, щодо важкого очищення капреоміцину, має переваги простої експлуатації та легкої керованості, а також забезпечує надійну технічну підтримку промислового виробництва[37].

Після процесу виділення необхідно провести стадію концентрування антибіотику. Для концентрування використовують фільтрацію або упарювання розчинів. В нашому випадку використання фільтрації буде більш дієвим для концентрування капреоміцину.

Установка нанофільтрації забезпечує безреагентну фільтрацію. Фільтри високоефективні при видаленні найпростіших бактерій, вірусів і інших домішок з розміром від 0,1 до 1 мкм, включаючи лямблії і криптоспоридії. Також перевагою використання даної установки є низькі енерговитрати.

Отже, щоб забезпечити максимальне концентрування препарату, а також підвищити його якість і чистоту діаметр пор мембран установлюють на молекулярну вагу антибіотика, капреоміцин – 669 кДа.

По закінченню процесу концентрування антибіотик необхідно привести в необхідну лікарську форму. Капреоміцин застосовують парентерально, а саме ін'єкції внутрішньовенно або внутрішньом'язово. Для цього необхідно виготовити ліофілізований порошок для ін'єкцій.

Аби виготовити таку лікарську форму використовують ліофільні сушарки. Принцип методу ліофільної сушки з одного боку досить простий: заморожується препарат (який необхідно висушити), поміщається у вакуумну камеру, відбувається сублімація розчинника. Але з іншого боку, ліофільна сушка трудомісткий процес: підготовка препарату до сушіння повинна бути ретельною, для повного висихання потрібно високий вакуум, сам процес досить тривалий і вимагає великих енерговитрат. Однак сучасне лабораторне обладнання зводить до мінімуму ці недоліки.

## РОЗДІЛ 5. МАТЕРІАЛЬНИЙ БАЛАНС І РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ

З ТЕО потреба в субстанції антибіотика оксациліну складає  $G_{нд} = 3,156$  кг. За умовами замовника цю кількість антибіотика потрібно виробити за  $T_{рд} = 28$  днів. За даними максимальний синтез антибіотика ( $P_{кр} = 6$  г/л за 168 год) досягається за умов росту штаму *Streptomyces capreolus* NRRL2773 на середовищі такого складу (г/л):

Глюкоза –  $C_1 = 30$

NZ-амін типу А  $C_2 = 4.0$

$CaCl_2$  -  $C_3 = 0,3$  г/л  $CaCl_2$

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$  -  $C_4 = 2,5$ г/л

Геліта Сол II –  $C_5 = 29,2$  г/л

Бурякова меляса -  $C_6 = 7.0$  г/л

Натрій едетат –  $C_7 = 0,5$ г/л

Полігліколь Р2000 –  $C_8 = 0,2$  г/л

Всього: 73,7 г/л

Для вирощування посівного матеріалу використовують середовище наступного складу:

Глюкоза –  $C_1 = 30$

NZ-амін типу А  $C_2 = 4.0$

$CaCl_2$  -  $C_3 = 0,3$  г/л  $CaCl_2$

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$  -  $C_4 = 2,5$ г/л

Геліта Сол II –  $C_5 = 29,2$  г/л

Бурякова меляса -  $C_6 = 7.0$  г/л

Натрій едетат –  $C_7 = 0,5$ г/л

Полігліколь Р2000 –  $C_8 = 0,2$  г/л

Всього: 73,7 г/л					<b>НУХТ БТЕК 04.03.07 КР ПЗ</b>			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Устименко С.О				<b>РОЗДІЛ 5. Матеріальний баланс і розрахунок обладнання</b>	Літ.	Арк.	Акрушів
Консульт							1	18
Керівник	Слободян О.П.					48		
Н. Контр.						<b>Кафедра БТМ</b>		
Зав. Каф.	Пирог Т.П.							

Відповідно до нормативно-технічної документації вміст сухих речовин в готовому продукті  $CP_{\text{гп}}$  має складати не менше 94% .

- час циклу роботи ферментера  $T_{\text{цф}} = T_{\text{ф}} + T_{\text{по}} = 168 + 6,5 = 174,5$  год, де  $T_{\text{по}}$  – час підготовчих операцій;
- коефіцієнт запасу (втрати культуральної рідини або посівного матеріалу від нестерильних операцій 1,1-1,5)  $K_1 = 1,2$ ;
- коефіцієнт заповнення ферментера, частка, (0,5 - 0,65) ; приймаємо  $K_{\text{зф}} = 0,6$ ;
- коефіцієнт заповнення посівного апарата, частка  $K_{\text{па}} = 0,8$ ;
- коефіцієнт заповнення інокулятора, частка  $K_{\text{ін}} = 0,8$ ;
- коефіцієнт заповнення колб, частка  $K_{\text{кол}} = 0,2$ ;

Для подальших розрахунків приймаємо наступні початкові дані:

- коефіцієнт заповнення збірника, частка (0,7-0,8)  $K_{\text{зб}} = 0,8$ .  
Сумарні втрати при виділенні готового продукту (сума всіх втрат на стадіях виділення готового продукту), частка  $E_{\text{св}} = 0,35$ ; кількість посівного матеріалу для виробничих ферментерів, частка (0,05-0,1)  $X_{\text{ф}} = 0,1$ ; кількість посівного матеріалу для посівних апаратів, частка (0,02-0,1)  $X_{\text{па}} = 0,1$ ; кількість посівного матеріалу для інокуляторів, частка (0,02-0,1)  $X_{\text{ін}} = 0,1$ ; кількість посівного матеріалу для качалочних колб, частка (0,02-0,1)  $X_{\text{кол}} = 0,1$ ; втрати посівного матеріалу у процесі його культивування в посівних апаратах, частка (0,1- 0,2)  $E_{\text{па}} = 0,5$ ; втрати посівного матеріалу у процесі його культивування в інокуляторах, частка (0,05- 0,1)  $E_{\text{ін}} = 0,05$ ; втрати посівного матеріалу у процесі його культивування в колбах, частка (0,01- 0,02)  $E_{\text{кол}} = 0,01$ .

### 5.1. Розрахунок партій продукту (виробничих циклів)

Кількість продукту на добу,  $G_{\text{нтд}} = G_{\text{нт}} / T_{\text{рд}} = 3,156 / 28 = 0,11$  кг /добу

Кількість антибіотика за цикл,  $G_{\text{цк}} = G_{\text{пд}} \cdot T_{\text{цф}} / 24 = 0,11 \cdot 174,5 / 24 = 0,82$  кг/цикл

Об'єм КР, що зливається за одну ферментацію (циклу) з урахуванням втрат за виробничий цикл ( $E_{св}=0,35$ )

$$V_{кр} = K_1 \cdot G_{цк} \cdot CP_{гп} / P_{кр}(1-E_{св}) = 1,2 \cdot 0,94 \cdot 0,82 / 6 (1-0,35) = 0,24 \quad \text{м}^3/\text{цикл}$$

$$\text{Кількість ферментацій (циклів) на рік } N_{цк} = G_{нт} / G_{цк} = 3,156 / 0,82 = 3,89.$$

Округлюємо кількість циклів до цілого  $N_{цк} = 4$ .

**Розрахунок об'ємів поживного середовища та посівного матеріалу для виробничого біосинтезу та вирощування посівного матеріалу та розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.**

Об'єм готового поживного середовища та посівного матеріалу у виробничому ферментері

$$V_{ф} = V_{кр} = 240 \text{ л}$$

$$V_{р} = V_{кр} / K_{зап} = 240 / 0,8 = 300$$

Найближчий об'єм ферментера  $= 0,25 \text{ м}^3$ , який не підходить для біосинтезу антибіотика капреоміцин, отже обираємо 2 ферментера компанії «Біорус» на  $0,16 \text{ м}^3$ , які працюватимуть паралельно(16)

$$K_3 = V_{кр} / V_{р} = 240 / 320 = 0,8, \text{ що лежить у допустимих межах}$$

Об'єм готового поживного середовища для виробничого ферментера, л

$$V_{пс1} = V_{ф} / (1 + X_{ф}) = 240 / (1 + 0,1) = 218,2 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу становить:

$$V_{пмф} = V_{ф} - V_{псф} = 240 - 218,2 = 21,8 \text{ л}$$

**Розрахунок кількості компонентів поживного середовища виробничого ферментера**

У відповідності з прийнятим складом поживного середовища для виробничого біосинтезу загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища  $V_{псф}$  складуть,:

$$G_{\phi} = V_{\text{псф}} \cdot C_{\Sigma\phi} = 109,1 \cdot 73,7 = 8041 \text{ г, в тому числі:}$$

$$\text{Глюкоза} - G_1 = G_{\phi} \cdot C_1 / C_{\Sigma\phi} = 8041 \cdot 30 / 73,7 = 3273,1$$

$$\text{NZ-амін типу А} G_2 = G_{\phi} \cdot C_2 / C_{\Sigma\phi} = 8041 \cdot 4 / 73,7 = 436,4$$

$$\text{CaCl}_2 - G_3 = G_{\phi} \cdot C_3 / C_{\Sigma\phi} = 8041 \cdot 0,3 / 73,7 = 32,7$$

$$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - G_4 = G_{\phi} \cdot C_4 / C_{\Sigma\phi} = 8041 \cdot 2,5 / 73,7 = 272,8$$

$$\text{Геліта Сол П} - G_5 = G_{\phi} \cdot C_5 / C_{\Sigma\phi} = 8041 \cdot 29,2 / 73,7 = 3185,85$$

$$\text{Бурякова меляса} - G_6 = G_{\phi} \cdot C_6 / C_{\Sigma\phi} = 8041 \cdot 7 / 73,7 = 763,7$$

$$\text{Натрій едетат} - G_7 = G_{\phi} \cdot C_7 / C_{\Sigma\phi} = 8041 \cdot 0,5 / 73,7 = 54,55$$

$$\text{Полігліколь Р2000} - G_8 = G_{\phi} \cdot C_8 / C_{\Sigma\phi} = 8041 \cdot 0,2 / 73,7 = 21,8$$

**Розрахунок кількості води для приготування поживного середовища для виробничого ферментера з 109,1 л поживного середовища.**

Кількість води визначають за наступною формулою  $V_{\text{вф}} = V_{\text{псф}} - G_{\phi} - V_{\text{фк}} = 109,1 - 8,04 - 21,82 = 79,24$ ,

де  $V_{\text{фк}} = V_{\text{псф}} \cdot K_{\text{кон}} = 240 \cdot 0,2 = 21,82$  л –кількість конденсату;  $K_{\text{кон}}$  – частка конденсату у загальній кількості води, що йде на приготування поживного середовища.

Формування композицій А, Б, В.

Таблиця 5.1

Склад композицій для стерилізації поживного середовища для виробничого ферментера

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 0,24 м <sup>3</sup> середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, г
Бурякова меляса	7	763,7	А	4036,8
Глюкоза	30	3273,1		
CaCl <sub>2</sub>	0,3	32,7	В	360,05
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2,5	272,8		
Натрій едетат	0,5	54,55		
NZ-амін типу А	4	436,4	Б	3644,05
Геліта Сол П	29,2	3185,85		
Полігліколь Р2000	0,2	21,8		
Конденсат		21,82		21,84
Вода		79,24		79,24
Разом:	73,7	109,1		

**Розрахунок кількості компонентів поживного середовища для посівного апарата з поживним середовищем у кількості 21,8 л**

Кількість поживного середовища і посівного матеріалу у посівному апараті становитиме:

$$V_{\text{роб2}} = V_{\text{цк}} = 21,8$$

Кількість поживного середовища в ферментері з поправкою на інокулят 10% буде становити:

$$V_{\text{пс2}} = V_{\text{роб2}} / (1 + X_{\text{ф}}) = 21,8 / 1,1 = 19,8$$

Звідси кількість посівного матеріалу становить:

$$V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб2}} - V_{\text{пс2}} = 21,8 - 19,8 = 2$$

Відповідно з прийнятим складом поживного середовища для посівного матеріалу, загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища складуть:

$$G_{\text{ф}} = V_{\text{псф}} \cdot C_{\Sigma\text{ф}} = 19,8 \cdot 73,7 = 1459 \text{ г, в тому числі:}$$

$$\text{Глюкоза} \quad - \quad G_1 \quad = \quad G_{\text{ф}} \cdot C_1 / C_{\Sigma\text{ф}} \quad = \quad 1459 \cdot 30 / 73,7 \quad = \quad 593,9$$

$$\text{NZ-амін типу А} \quad G_2 \quad = \quad G_{\text{ф}} \cdot C_2 / C_{\Sigma\text{ф}} \quad = \quad 1459 \cdot 4 / 73,7 \quad = \quad 79,2$$

$$\text{CaCl}_2 \quad - \quad G_3 \quad = \quad G_{\text{ф}} \cdot C_3 / C_{\Sigma\text{ф}} \quad = \quad 1459 \cdot 0,3 / 73,7 \quad = \quad 5,9$$

$$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} \quad - \quad G_4 \quad = \quad G_{\text{ф}} \cdot C_4 / C_{\Sigma\text{ф}} \quad = \quad 1459 \cdot 2,5 / 73,7 \quad = \quad 49,5$$

$$\text{Геліта Сол П} \quad - \quad G_5 \quad = \quad G_{\text{ф}} \cdot C_5 / C_{\Sigma\text{ф}} \quad = \quad 1459 \cdot 29,2 / 73,7 \quad = \quad 578$$

$$\text{Бурякова меляса} \quad - \quad G_6 \quad = \quad G_{\text{ф}} \cdot C_6 / C_{\Sigma\text{ф}} \quad = \quad 1459 \cdot 7 / 73,7 \quad = \quad 138,6$$

$$\text{Натрій едетат} \quad - \quad G_7 \quad = \quad G_{\text{ф}} \cdot C_6 / C_{\Sigma\text{ф}} \quad = \quad 1459 \cdot 0,5 / 73,7 \quad = \quad 9,9$$

$$\text{Полігліколь Р2000} \quad - \quad G_8 \quad = \quad G_{\text{ф}} \cdot C_6 / C_{\Sigma\text{ф}} \quad = \quad 1459 \cdot 0,2 / 73,7 \quad = \quad 4$$

**Розрахунок кількості води для приготування поживного середовища для посівного апарату з середовищем у кількості 0,024 м<sup>3</sup> (24 л)**

Кількість води визначають за наступною формулою  $V_{\text{вф}} = V_{\text{псф}} - G_{\text{ф}} - V_{\text{фк}} = 19.8 - 1,459 - 3,96 = 14,38$ ,

де  $V_{\text{фк}} = V_{\text{псф}} \cdot K_{\text{кон}} = 24 \cdot 0,2 = 3,96$  л –кількість конденсату;  $K_{\text{кон}}$  – частка конденсату у загальній кількості води, що йде на приготування поживного середовища.

Формування композицій А, Б, В.

Таблиця 5.2

**Склад композицій для стерилізації поживного середовища у кількості 21.8 м<sup>3</sup> для посівного апарата**

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 0,24 м <sup>3</sup> середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, г
Бурякова меляса	7	763,7	А	4036,8
Глюкоза	30	3273,1		
CaCl <sub>2</sub>	0,3	32,7	В	360,05
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2,5	272,8		
Натрій едетат	0,5	54,55		
NZ-амін типу А	4	436,4	Б	3644,05
Геліта Сол II	29,2	3185,85		

Полігліколь Р2000	0,2	21,8		
Конденсат		21,82		21,84
Вода		79,24		79,24
Разом:	73,7	109,1		

**Розрахунок кількості компонентів поживного середовища для вирощування у колбах на качалках з поживним середовищем у кількості 2л**

Кількість поживного середовища становить 2000 мл, відповідно посівного матеріалу для 2000 мл становить 200 мл суспензійної культури. Кінцева кількість поживного середовища становить 1800 мл.

Таку кількість посівного матеріалу можна отримати у колбах на качалках об'ємом 2000 мл з коефіцієнтом заповнення 0,2.

Тоді кількість колб для отримання посівного матеріалу буде становити:

$$N_{\text{колб}} = V_{\text{пм4}} / (V_{\text{колб}} \cdot K_3) = 2000 / (750 \cdot 0,2) = 13,3 \sim 14 \text{ шт.}$$

Відповідно з прийнятим складом поживного середовища для посівного матеріалу, загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища складуть:

$$G_{\text{ф}} = V_{\text{псф}} \cdot C_{\Sigma\text{ф}} = 1,8 \cdot 73,7 = 132,66 \text{ г, в тому числі:}$$

$$\text{Глюкоза} - G_1 = G_{\text{ф}} \cdot C_1 / C_{\Sigma\text{ф}} = 132,66 \cdot 30 / 73,7 = 54$$

$$\text{NZ-амін типу А} - G_2 = G_{\text{ф}} \cdot C_2 / C_{\Sigma\text{ф}} = 132,66 \cdot 4 / 73,7 = 7,2$$

$$\text{CaCl}_2 - G_3 = G_{\text{ф}} \cdot C_3 / C_{\Sigma\text{ф}} = 132,66 \cdot 0,3 / 73,7 = 0,54$$

$$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - G_4 = G_{\text{ф}} \cdot C_4 / C_{\Sigma\text{ф}} = 132,66 \cdot 2,5 / 73,7 = 4,5$$

$$\text{Геліта Сол II} - G_5 = G_{\text{ф}} \cdot C_5 / C_{\Sigma\text{ф}} = 132,66 \cdot 29,2 / 73,7 = 52,56$$

Бурякова меляса -  $G_6 = G_{\phi} \cdot C_6 / C_{\Sigma\phi} = 132,66 \cdot 7 / 73,7 = 12,6$   
 Натрій едетат -  $G_7 = G_{\phi} \cdot C_7 / C_{\Sigma\phi} = 132,66 \cdot 0,5 / 73,7 = 0,9$   
 Полігліколь Р2000 -  $G_8 = G_{\phi} \cdot C_8 / C_{\Sigma\phi} = 132,66 \cdot 0,2 / 73,7 = 0,36$

**Розрахунок кількості води для приготування поживного середовища для посівного апарату з середовищем у кількості 2000 мл**

Оскільки об'єм поживного середовища у посівному апараті складає 1800 мл, конденсат буде відсутній, оскільки компоненти поживного середовища будуть стерилізуватися в колбах. Кількість води необхідної для розбавлення компонентів поживного середовища буде  $V_{\text{вф}} = V_{\text{псф}} - G_{\phi} = 1800 - 132,66 = 1667,34$  мл

Формування композицій А, Б, В.

*Таблиця 5.3*

Склад композицій для стерилізації поживного середовища у колбах на качалках 2000 мл

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 5 л середовища, г (мл)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Бурякова меляса	7	12,6	А	66,6
Глюкоза	30	54		
CaCl <sub>2</sub>	0,3	0,54	В	5,94
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2,5	4,5		
Натрій едетат	0,5	0,9		

NZ-амін типу А	4	7,2	Б	60,12
Геліта Сол П	29,2	52,56		
Полігліколь Р2000	0,2	0,36		
Вода		1667,34		1667,34
Разом:	73,7	1800		

**Розрахунок матеріального балансу (із врахуванням кількості стадій підготовки посівного матеріалу, розрахованої у підрозділі 1.4 (розділ 1 «Техніко-економічне обґрунтування»))**

*Таблиця 5.4*

Матеріальний баланс на один цикл виробничого біосинтезу

№	Використано		Отримано	
	2	3	4	5
	Назва сировини і напівпродукту	Кількість, кг, дм <sup>3</sup>	Назва кінцевого продукту, відходів та втрат	Кількість, кг, дм <sup>3</sup>
1.	<b>ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ВИРОЩУВАННЯ ІНОКУЛЯТУ В КОЛБАХ НА КАЧАЛКАХ(мл,г)</b>			
1.1	Бурякова меляса	12,6	Нестерильне ПС	1800
1.2	глюкоза	54		
1.3	CaCl <sub>2</sub>	0,54		

1.4	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	4,5		
1.5	Натрій едетат	0,9		
1.6	NZ-амін типу А	7,2		
1.7	Геліта Сол П	52,56		
1.8	Полігліколь P2000	0,36		
1.9	Вода	1667,34		
1.10	<b>Всього:</b>	1800	<b>Всього:</b>	1800
2	<b>СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА В АВТОКЛАВІ</b>			
2.1	Нестерильне ПС	1800	Стерильне ПС	1800
2.2	<b>Всього:</b>	<b>1800</b>	<b>Всього:</b>	<b>1800</b>
3	<b>ОТРИМАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ ПІД ЧАС КУЛЬТИВУВАННЯ В КОЛБАХ НА КАЧАЛКАХ (мл)</b>			
3,1	Стерильне ПС	1800	Посівний матеріал	2000
3,2	Посівний матеріал	200		
3.3	<b>Всього:</b>	<b>2000</b>	<b>Всього</b>	<b>2000</b>
4	<b>ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ІНОКУЛЯТОРА НА 24 Л(г,мл)</b>			

4.1	Бурякова меляса	138.6	Нестерильне ПС	19,2
4.2	глюкоза	593.9		
4.3	CaCl <sub>2</sub>	5.9		
4.4	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	49.5		
4.5	Натрій едетат	9.9		
4.6	NZ-амін типу А	79.2		
4.7	Геліта Сол П	598		
4.8	Полігліколь Р2000	4		
4.9	конденсат	0		
4.10	Вода	14.38		
4.11	<b>Всього:</b>	<b>15.84</b>	<b>Всього:</b>	<b>19,2</b>
5	<b>СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ІНОКУЛЯТОРА НА 27.25 Л (л)</b>			
5.1	Нестерильне ПС	15.84	Стерильне поживне середовище	19.8
5.2	Конденсат	3,96		
5.3	<b>Всього:</b>	<b>19.8</b>	<b>Всього:</b>	<b>19.8</b>
6				

<b>ОТРИМАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ В ІНОКУЛЯТОРІ НА 30 Л (л)</b>								
6.1	Стерильне ПС	19.8			Посівний матеріал			21.8
6.2	Посівний матеріал з колб на качалках	2						
6.4	<b>Всього:</b>	<b>21.8</b>			<b>Всього:</b>			<b>21.8</b>
7	<b>ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ КАПРЕОМІЦИНУ (г,л)</b>							
	Бурякова меляса	763,7	Нестерильне ПС	87,28	Бурякова меляса	763,7	Нестерильне ПС	87,28
	глюкоза	3273,1			глюкоза	3273,1		
	CaCl <sub>2</sub>	32,7			CaCl <sub>2</sub>	32,7		
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	272,8			MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	272,8		
	Натрій едетат	54,55			Натрій едетат	54,55		
	NZ-амін типу А	436,4			NZ-амін типу А	436,4		

	Геліта Сол П	3185,85			Геліта Сол П	3185,85		
	Полігліколь Р2000	21,8			Полігліколь Р2000	21,8		
	Вода	79.24			Вода	79.24		
	<b>Всього</b>	<b>87280</b>	<b>Всього</b>	<b>87280</b>	<b>Всього:</b>	<b>87280</b>	<b>Всього</b>	<b>87280</b>
<b>СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ КАПРЕОМЦІНУ(кг,л)</b>								
	Нестерильне ПС	87,28	Стерильне ПС	109,1	Нестерильне ПС	87,28	Стерильне ПС	109,1
	Конденсат	21,82			Конденсат	21,82		
	<b>Всього:</b>		<b>109,1</b>		<b>Всього:</b>		<b>109,1</b>	
	<b>Разом:</b>				<b>218,2</b>			
<b>ОТРИМАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ КАПРЕОМЦІНУ (кг,л)</b>								
	Стерильне поживне	109,1	Посівний матеріал	120	Стерильне поживне середовище	109,1	Посівний матеріал	120

	середо вище							
	Посівн ий матеріа л інокуля тора	10,9			Посівни й матеріал інокулят ора	10,9		
	<b>Всього</b> :	<b>120</b>	<b>Всього</b> :	<b>120</b>	<b>Всього:</b>	<b>120</b>	<b>Всього</b> :	<b>120</b>
	<b>Разом:</b>	<b>240</b>		<b>Разом:</b>	<b>240</b>			

## Розрахунок технологічного обладнання

*Розрахунок кількості виробничих ферментерів*

Приблизний загальний геометричний об'єм ферментерів при заданому  
 $K_{зф}=0,8 \text{ м}^3$

$$V_{фг}=V_{ф}/K_{зф}=0,27/0,8=0,3 \text{ м}^3$$

Вибираємо з Таблицялиці (додаток 4) найближчий за об'ємом ферментер,  $\text{м}^3$ .  
 Обираємо 2 ферментера, котрі будуть працювати паралельно об'ємом  $0,16 \text{ м}^3$ .

$$V_{фг}=0,16 \text{ м}^3$$

Кількість виробничих ферментерів при заданому  $K_{з}$ , од.

$$N_{фр} = V_{фг}/V_{фг}=0,24/0,16 = 1,5 - \text{приймаємо } 2$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення вибраних з Таблицялиці ферментерів,  
 частка,  $K_{зф}$

$$K_{зф} = V_{ф}/V_{фг} \cdot N_{фг}=0,24/0,16 \cdot 2=0,8.$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення не перевищує заданих меж (0,7-0,8) приймаємо до установки кількість ферментерів  $N_{фт} + 1$  запасний.

### *Розрахунок кількості посівних апаратів*

Уточнюючий розрахунок кількості посівних апаратів і інокуляторів

*Уточнюючий розрахунок посівного апарату 2 стадії приготування ПМ( кількість ПМ і середовища 21,8 л)*

Приблизний загальний геометричний об'єм інокулятора при заданому  $K_3=0,8$ ;

$$V_{гін} = V_{ін}/K_3 = 0,022/0,8 = 0,027 \text{ м}^3.$$

Як обираємо промисловий ферментер компанії: "БІО-РУС»  $V_{ін}=30$  л

Кількість інокуляторів при заданому  $K_{зін}$ .

$$N_{інр} = V_{гін}/V_{нін} = 0,024/0,03 = 0,73 - \text{приймаємо}$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_{зін} = V_{ін}/(V_{нін}N_{інр}) = 0,024 / (0,03 \times 1) = 0,8$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення не перевищує задані межі (0,7-0,8) приймаємо до установки інокуляторів  $N_{інр} + 1$  запасний.

### *Розрахунок кількості качалочних колб*

Приблизний загальний необхідний об'єм качалочних колб при заданому  $K_{кол}=0,2$

Об'єм 1 качалочної колби

$$V_{колб} = 0,750 \text{ л}$$

Кількість колб для отримання посівного матеріалу становитиме, од:

$$V_{гколб} = V_{гколб}/K_{нколб} = 2000/0,2 = 10000 \text{ мл}$$

$$N_{колб} = V_{гколб}/V_{нколб} = 10000/750 = 13,3 = 14 \text{ колби}$$

*Уточнюючий розрахунок кількості реакторів-змішувачів для приготування середовища для виробничого біосинтезу в ферментері*

*Уточнюючий розрахунок реактора для приготування композиції А.*

Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для приготування та стерилізації композиції А. Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому  $K_{зб} = 0,7 \dots 0,9$ :

$V_{Апа} = V_A / K_{зб} = 8074 / 0,8 = 10,092$  л, обираємо реактор змішувач місткістю 5 л

Кількість реакторів при заданому  $K_{зб}$  становить :

$N_p = V_{Апа} / V_{рст} = 0,008 / 0,005 = 1,6$  – приймаємо 2 . Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора :

$$K_{зр} = V_{Апа} / (V_{рст} \times N_p) = 8,074 / 10 = 0,8$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення лежить в межах (0,7 – 0,9), приймаємо до установки кількість реакторів для приготування композиції А – 1 + 1 запасний (2 шт.).

*Уточнюючий розрахунок реакторів-змішувачів для приготування композиції А і Б для ферментера з кількістю поживного середовища 21,8 л.*

*Композиція А*

Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для приготування та стерилізації композиції А. Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому  $K_{зб} = 0,7 \dots 0,9$ :

$$V_{Апа} = V_A / K_{зб} = 0,888 / 0,8 = 1,1$$
 л.

обираємо реактор змішувач типу СРен на об'ємом 630 л [38].

Кількість реакторів при заданому  $K_{зб}$  становить:

$N_p = V_{Апа} / V_{рст} = 888 / 1000 = 0,88$  – приймаємо 1. Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора:

$$K_{зр} = V_{Апа} / (V_{рст} \times N_p) = 888 / (1000 \times 1) = 0,88$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення лежить в заданих межах (0,7 – 0,9), приймаємо до установки кількість реакторів для приготування композиції А – 1 + 1 запасний (2 шт.).

#### *Композиція Б*

Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для приготування та стерилізації композиції Б. Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому  $K_{зб} = 0,6 \dots 0,9$ :

$$V_{\text{Апа}} = V_{\text{А}}/K_{зб} = 7,288/0,8 = 9,1 \text{ л.}$$

обираємо реактор змішувач типу на 4,5 л [39].

Кількість реакторів при заданому  $K_{зб}$  становить:

$N_p = V_{\text{Апа}}/V_{\text{рст}} = 7,288/4,6 = 1,6$  – приймаємо. Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора

$$K_{зр} = V_{\text{Апа}}/(V_{\text{рст}} \times N_p) = 7,288/(4,5 \times 2) = 0,8$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення лежить в заданих межах (0,6 – 0,9), приймаємо до установки кількість реакторів для приготування композиції А – 1 + 1 запасний (2 шт.).

#### *Композиція Б*

Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для приготування та стерилізації композиції А. Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому  $K_{зб} = 0,7 \dots 0,9$ :

$$V_{\text{Апа}} = V_{\text{А}}/K_{зб} = 804/0,8 = 1,005 \text{ л.}$$

обираємо лабораторний реактор змішувач фірми «Wise Master» об'ємом 1 л.

Кількість реакторів при заданому  $K_{зб}$  становить:

$N_p = V_{\text{Апа}}/V_{\text{рст}} = 804/1000=0,8$  – приймаємо 1 . Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора

$$K_{\text{зр}} = V_{\text{Апа}}/(V_{\text{рст}} \times N_p) = 804/(1000 \times 1)=0,804$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення злегка не дотягує до оптимальних значень (0,7 – 0,9),, проте найменший наявний збірник 20 л буде дещо малий тож обираємо найближчий більший – на 50 л в заданих межах (0,7 – 0,9), приймаємо до установки кількість реакторів для приготування композиції А – 1 + 1 запасний (2 шт.)

## РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Специфікація обладнання наведеного на технологічній схемі розписана у Таблицялиці 6.1.

*Таблиця 6.1*

Специфікація обладнання для апаратурної схеми ділянки виробничого біосинтезу капреоміцину

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика( виробник)
1	2	3	4
	Станція безрозбірної мийки типу СІР	1	Комплексна СІР станція на дві ємності до л компанії «[40].
<b>P22,P24</b>	Реактор для приготування розчину композиції для ферментера-інокулятора на 10 л	2	Реактор на 10 л з нж сталі для розчинів місткістю. ТОВ «Perri videx». [41].
<b>P26,P28</b>	Реактор для приготування розчину композиції для ферментера-інокулятора а на 100 л	4	Реактор на 100 л з нж сталі фармацевтичний для розчинів місткістю. ТОВ «Промвін

					<b>НУХТ БТЕК 04.03.07 КР ПЗ</b>						
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата							
Розроб.	Устименко С.О				<b>РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання</b>			Літ.	Арк.	Акрушів	
Консульт									2	2567	
Керівник	Слободян О.П.							<b>Кафедра БТМ</b>			
Н. Контр.											
Зав каф	Пирог Т.П.										

<b>Фр45, Фр46</b>	Ферментер виробничий	2	Ферментер 0,16 м <sup>3</sup> з нж сталі з турбінною мішалкою закритого типу фірма виробник « Біотехно» [42]
<b>Ф38, Ф40, Ф42, Ф44</b>	Фільтри індивідуальної очистки азота	3	Фільтр з вуглеводистої сталі Макс тиск 250 бар [43]
<b>Н2, Н5</b>	Відцентрований насос без сальникового типу з магнітною муфтою	4	Герметичні хімічні насоси з магнітною муфтою серії DB фірми «ascorpumps» [44]
<b>Н4, Н6</b>	Шнековий насос		Шнековий насос Bellin Продуктивність 260 м <sup>3</sup> /год Макс тиск 30 бар[45]
<b>Д23, Д25, Д27</b>	Дозатори об'ємно вагові	6	Дозатори фірми «АСВІК ЦЕНТР» ДВП-2
<b>Р1,Р4</b>	реактор-змішувач об'ємом 320 л.	2	реактор компанії «Біотехно» з нж сталі з турбінною мішалкою

			закритого типу. Потужність реактора становить 0,75 кВт, частота обертів 25-1500 об/хв..4
<b>НФ6</b>	Установка нанофільтрації	<b>1</b>	Продуктивність - 90 л / год Кількість ступенів фільтрації - 4 Габаритні розміри 231x118x690 мм Робочий ресурс 45000 л установку виробника «Макіт напо». діаметр пор 668кДа
<b>ННЗ</b>	<b>НУТЧ-фільтр</b>	<b>1</b>	внутрішній діаметр корпусу, мм 1450 Потужність 15 Кв Матеріал нж сталь Робочий об'єм, л 1600 Виробник «Промвіт»
<b>ЛС7</b>	<b>Ліофільна сушарка</b>	<b>1</b>	Ємність конденсора 4 л. Мін температура - 44° С. Потужність 2,04 кВт.

			Ліофільна сублімаційна сушарку <b>ВІО- RUS</b>
<b>ВМ8</b>	<b>Вібраційний кульовий млин</b>	1	Початковий розмір часток * $\leq$ 6 мм  Кінцева тонкість * $\sim$ 10 мкм  Розмір завантаження / корисний об'єм * макс. 2 x 10 мл  Кількість розмельних місць 2  Матеріал розмельних гарнітури загартована сталь, нержавіюча сталь, карбід вольфраму, агат, оксид цирконію, ПТФЕ  Виробник «RETSCH»[46]
<b>ЗП9</b>	<b>Звуковий просіювач</b>	1	Матеріал загартована сталь, нержавіюча сталь, карбід

			<p>вольфраму, агат, оксид цирконію, ПТФЕ</p> <p>Матеріал пластини сита нікель</p> <p>Час обробки до 119 хв</p> <p>Діапазон просіювання від 5 мкм до 20 мм</p> <p>Виробник «Endecotts»</p> <p>[47]</p>
<b>ФС</b>	<b>Фасувальна система для фасування препарату у первинну і вторинну упаковки</b>	1	<p><i>Фасувальний апарат у флакони:</i></p> <p>Об'єм наповнення 10-5000г</p> <p>Матеріал нержавіюча сталь</p> <p>Швидкість наповнення 20-40 флаконів/хв.[48]</p> <p><i>Фасувальний апарат у коробки</i></p> <p>Продуктивність до 100 уп/хв.</p> <p>Потужність 380/220 В, 60/50 Гц, одна фаза</p>

			Матеріал нержавіюча сталь [49]
<b>P1,P4</b>	реактор-змішувач об'ємом 320 л.	<b>2</b>	реактор компанії «Біотехно» з нж сталі з турбінною мішалкою закритого типу. Потужність реактора становить 0,75 кВт, частота обертів 25-1500 об/хв..4

## РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

### ДР 1. Санітарна підготовка виробництва.

#### ДР 1.1. Підготовка персоналу

Персонал, що входить у виробниче приміщення, повинен бути одягненим у спеціальний одяг, який відповідає виконуваний виробничій операції. Технологічний одяг персоналу має відповідати класу чистоти тієї зони, в якій він працює, тобто максимально захищати продукт виробництва від частинок, що виділяються людиною.

#### ДР1.2 Приготування миючих та дезінфікуючих розчинів

Для дезінфекції та миття поверхонь приміщення використовують 0,1 % розчин Лізоформін 3000, для щоденного прибирання необхідно 10 л натомість для генерального необхідно та 35 л робочого розчину.

#### ДР 1.2.1 Приготування розчину Лізоформін 3000

У реакційну ємність об'ємом 70 л вносять зважений на технічних вагах сухий концентрат каустичної соди у кількості 100 г і доливають 9,9 л питної води, вмикають перемішуючий пристрій та одержують робочий розчин до застосування. Для генерального прибирання кількість концентрату та води відповідно становлять: 350г та 34,65 л.

#### ДР 1.3. Підготовка приміщень.

#### ДР 1.3.1. Генеральне прибирання

Генеральне прибирання проводиться 1 раз на місяць .( для класичної мийки витрата робочого розчину Лізоформін 3000 становить 35 л робочого розчину( від ДР 1.2.1).

#### ДР 1.3.2. Щотижневе прибирання виробничих приміщень.

Щоденне прибирання. Мийка здійснюється за допомогою розчину 0.1 % розчину засобу Лізоформін 3000 у кількості 10 л ( від ДР 1.2.1). мийка проводиться 1 раз на добу.

					<b>НУХТ БТЕК 04.03.07 КР ПЗ</b>			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Устименко С.О.			<b>РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми</b>	Літ.	Арк.	Акрушів
Консульт							1	13 <sup>73</sup>
Керівник		Слободян О.П.				<b>Кафедра БТМ</b>		
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог. Т.П.						

Перед початком роботи персонал повинен пройти санітарно-гігієнічну підготовку, а саме миття рук туалетним або господарським милом та дезінфекцію 75 %-им етиловим спиртом або засобом для дезінфекції «Маносепт». Також обов'язковим є наявність медичного халату та шапочки.

#### *ДР 1.4 Підготовка обладнання та комунікацій*

##### *ДР 1.4.1 Миття*

Миття та обладнання буде проводитися вручну. Мийка проводиться мийно-дезінфекційним засобом «Біомой» ( його робочим розчином). Кількість 0,3% робочого розчину становить 6667 л. Температура миття 80 °С

##### *ДР 1.4.2 Технічний огляд*

Обладнання проходить такі етапи: Загальний технічний огляд, перевірка на герметичність, пробний пуск, настройка параметрів

##### *ДР 1.4.3 Дезинфекція та ополіскування*

Обладнання ополіскують при температурі 20 °С водою питною. Ополіскування проводять через СІР-головки.

##### *ДР 1.4.4 Перевірка на герметичність*

Дана стадія стосується в першу чергу основного ферментера та інокуляторів. Для цього у апарат на якому герметично затягнута вся арматура подається аераційне повітря до набору надлишкового тиску у 0,1-0,2-МПа, Перекривають прохід повітря, та фіксують показання манометра на протязі 40-60 хв. Якщо падіння тиску не перевищує 0,01 МПа – апарат є герметичним. Якщо дане значення перепаду тиску перевищує 0,01 МПа проводять перевірку і знаходять місце розгерметизації методом омилення апарата( його опорних з'єднань), оскільки ферментер є невеликого об'єму? а цей метод є дуже простим і дешевим.

Апарат і місця з'єднань деталей апарата перевіряють за допомогою галогеношукача перед цим пускаючи галоген вмісний газ у апарат підтиском.

##### *ДР 1.4.5 Стерилізація*

Стерилізація проводиться подачею гострої пари у апарат за температури 135 °С, упродовж 1 години.

## **ДР 2 Приготування та стерилізація поживного середовища**

### *ДР 2.1 Приготування розчину меляси і його стерилізації*

Її освітлюють, тобто розбавляють водою і обробляють певними речовинами. При розведенні меляси зменшується її в'язкість, в результаті чого збільшується швидкість осадження механічних домішок. При додаванні в розведену мелясу сірчаної кислоти, руйнується гідратна оболонка колоїдних частинок, що призводить до їх коагуляції (злипання, укрупнення) з подальшою седиментацією (осадженням).

## **ДР 3. Приготування та стерилізація допоміжних розчинів**

### *ДР 3.1 Приготування і стерилізація піногасника*

Необхідна кількість піногасника “Structol” на основі рослинних жирів на 3 стадії становить від 0.01 до 2%, приймаємо 0,03%. Отже, потреба піногасника становить 79 г (Для першої стадії 7 г і для другої 72 г). На технічних вагах зважують 79 г піногасника, наважку переносять у ємність: у колбу на 400(колбу) мл вносять 79 грамів. Стерилізують в автоклаві при температурі 131 о С 30 хв.

### *ДР 3.2. Підготовка промивної суміші*

Промивну суміш готують для подальшого використання. Вона складає 100 мл промивної води + 200 мл 0,5М розчину соляної кислоти на 1 л культуральної рідини.

## **ДР 4. Приготування і стерилізація поживного середовища**

### *ДР 4.1 Приготування і стерилізація поживного середовища для вирозування інокуляту в колбах на качалках об'ємом 1800 мл*

Для вирощування інокуляту необхідно приготувати 675 мл поживного середовища яке складається з Глюкози, NZ-амін типу А, CaCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O , Геліта Сол П, Бурякова меляса, Натрій едетат, Полігліколь Р2000 з рН оптимумом 7-8.

Склад композицій для стерилізації поживного середовища у колбах на качалках 1800 мл

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 1800 мл середовища, г (мл)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Бурякова меляса	7	12,6	А	66,6
Глюкоза	30	54		
CaCl <sub>2</sub>	0,3	0,54		
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2,5	4,5	Б	5,94
Натрій едетат	0,5	0,9		
NZ-амін типу А	4	7,2		
Геліта Сол П	29,2	52,56	Б	60,12
Полігліколь Р2000	0,2	0,36		
Вода		1667,34		1667,34
Разом:	73,7	1800		

#### *ДР 4.1.1 Приготування і стерилізація композиції А*

Композицію А, що складається з глюкози і бурякової меляси вносять у колбу. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 130 °С упродовж 20 хв.

#### *ДР 4.1.2 Приготування і стерилізація композиції Б*

У колби додають композицію Б, вона складається з пептонних гідролізатів NZ-амін типу А, Геліта Сол II і також має полігліколь. Стерилізують дану композицію за температури 120°С тривалістю 20-30 хв.

#### *ДР 4.1.3 Приготування і стерилізація композиції В*

Вносять у колбу  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , натрій едетат. Солі кристалогідрату магній сульфату і кальцій хлориду дають малорозчинний  $\text{CaSO}_4$ , але натрій едетат робить нерозчинні солі розчинними, тому їх і об'єднано в одну композицію. Стерилізують за температури 131°С тривалістю 40-60 хв.

*ДР 4.1.4 Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 27,25л.*

На даному етапі композиції стерилізують за відповідними режимами стерилізації і враховують розрахунок об'єму в 27,25 л. Композиція складає 21,8 л.

*Таблиця 7.2*

композицій для стерилізації поживного середовища у кількості 7,36л для малого інокулятора

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 21,8	Композиція	Об'єм композиції, V, л
--------------------------------	------------	---------------------------------	------------	------------------------

		середовища, кг (л)		
Бурякова меляса	7	138.6	А	0,888
Глюкоза	30	593.9		
CaCl <sub>2</sub>	0,3	5.9	В	0,079
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2,5	49.5		
Натрій едетат	0,5	9.9		
NZ-амін типу А	4	79.2	Б	0,804
Геліта Сол П	29,2	598		
Полігліколь Р2000	0,2	4		
Конденсат		3.96		3.96
Вода		14.38		14.38
Разом:	73,7	21.8		

#### *ДР 4.2.1 Приготування і стерилізація композиції А*

Стерилізують композицію А, що складається з глюкози і бурякової меляси вносять у колбу. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 130 °С упродовж 20 хв.

#### *ДР 4.2.2 Приготування і стерилізація композиції Б*

На цьому етапі відбувається стерилізація композиції Б. У колби додають пептонні гідролізати NZ-амін типу А, Геліта Сол П і полігліколь. Стерилізують за температури 120°C тривалістю 20-30 хв.

*ДР 4.2.3 Приготування і стерилізація композиції В*

Вносьть у колбу CaCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, натрій едетат. Композиція хлориду кальцію і кристалогідрату магнію сульфату дають малорозчинну сіль, але динатрієва сіль (натрій едетат) робить нерозчинні солі розчинними. Стерилізують за температури 131°C тривалістю 40-60 хв.

*ДР 4.3 Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 240 л.*

Враховуючи, що коефіцієнт заповнення 0,8 кількість компонентів поживного середовища розраховують на 218,2 л. Композиції для двох ферментерів складають 109 л.

*Таблиця 7.3*

Склад композицій для стерилізації поживного середовища у кількості 218,2 л для малого інокулятора

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 73,73л середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Бурякова м'яса	7	0,515	А	2,725
Глюкоза	30	2,21		

CaCl <sub>2</sub>	0,3	0,022	В	0,243
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2,5	0,184		
Натрій едетат	0,5	0,037		
NZ-амін типу А	4	0,294	Б	2,458
Геліта Сол II	29,2	2,15		
Полігліколь Р2000	0,2	0,014		
Конденсат		14,74		14,74
Вода		53,7		53,7
Разом:	73,7	73,73		

#### *ДР 4.3.1 Приготування і стерилізація композиції А*

Беруть глюкозу і бурякову мелясу вносять у колбу. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 130 °С упродовж 20 хв.

#### *ДР 4.3.2 Приготування і стерилізація композиції Б*

У колби додають пептонні гідролізати NZ-амін типу А, Геліта Сол II і полігліколь. Стерилізують за температури 120°С тривалістю 20-30 хв.

#### *ДР 4.3.3 Приготування і стерилізація композиції В*

Вносять у колбу CaCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, натрій едетат. Стерилізують за температури 131°С тривалістю 40-60 хв.

## **ТП 5 Підготовка посівного матеріалу.**

### *ТП5.1 Підтримування колекційної культури*

Колекційну культуру *Streptomyces capreolus* NRRL2773 зберігають у пробірках зі скошеним агаром. Пересіви здійснюють кожні 3–4 місяці. Всі роботи з колекційною культурою проводяться строго в асептичних умовах.

### *ТП5.2 Вирощування робочої культури на агаризованому середовищі.*

Музейну культуру з пробірок зі скошеним агаром відновлюють пересіваючи на чашки Петрі з агаризованим середовищем, що притаманне саме для цього продуцента, і вирощують протягом 76 год за температури 27-29°C.

### *ТП5.3 Вирощування культури в колбах на качалках.*

Для вирощування рідкого посівного матеріалу у колбу об'ємом 1 л із 256 мл розчину композиції А (від ДР 2.1.1) в асептичних умовах вносять 44 мл розчину композиції Б (від ДР 2.1.2) та 100 мл розчину композиції В (від ДР 2.1.3). Перемішують і розливають по 100 мл в чотири стерильні качалочні колби об'ємом 750 мл.

### *ТП5.4 Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 0,03 м<sup>3</sup>.*

Для вирощування рідкого посівного матеріалу у колбу об'ємом 1 л із 256 мл розчину композиції А (від ДР 4.2.1) в асептичних умовах вносять 44 мл розчину композиції Б (від ДР 4.2.2) та 100 мл розчину композиції В (від ДР4.2.3). Перемішують і розливають по 100 мл в чотири стерильні качалочні колби об'ємом 750 мл. Вносять одну з трьох частин стерильного піногасника від ДР1.1.1

### *ТП5.5 Вирощування в інокуляторі об'ємом 0,3 м<sup>3</sup>.*

Для вирощування рідкого посівного матеріалу у колбу об'ємом 1 л із розчину композиції А (від ДР 2.3.1) в асептичних умовах вносять розчину композиції Б (від ДР 2.3.2) та розчину композиції В (від ДР 2.3.3). Перемішують і розливають по 100 мл в чотири стерильні качалочні колби об'ємом 750 мл. Піногасник від ДР 1.1.1 вносять під час вирощування.

## **ТП 6 Біосинтез**

### *ТП 6.1 Виробниче культивування у ферментері об'ємом 5 м<sup>3</sup>.*

Виробниче культивування проводять у 2 ферментерах на 0,16 м<sup>3</sup>, які працюватимуть паралельно. У попередньо простерилізований ферментер вносять посівний матеріал (від ТП 1.5), композицію А (від ДР 4.5.1), композицію Б (від ДР 4.5.2) композицію В (від ДР 4.5.3). В процесі ферментації через трубу подають суперпарамагнітні мікросфери, вони зменшують зворотний зв'язок із продукуванням бактерій і тим самим значно підвищують вихід капреоміцину. Інокують тривалістю 168 год за температури 27-29°C, з рН оптимумом 7-8, при обертанні 300 об/хв.

## **ТП 7. Виділення антибіотика капреоміцин**

### *ТП 7.1 Додавання парамагнітних мікросфер*

Порошок суперпарамагнітних мікросфер оксиду заліза з діаметром часток 30 мкм кількістю 30 г на 1 л культуральної рідини додають у культуральну рідину, перемішують протягом 2 годин. Так отримуємо речовину з високим ступенем чистоти.

### *ТП 7.2 Додавання промивної суміші*

У середовище додають промивну суміш (ДР 2.1) для видалення мікросфер і відправляють на подальше освітлення. Суперпарамагнітні мікросфери мають переваги переробки, повторного використання.

### *ТП 7.3 Освітлення розчину*

У культуральну рідину додають активоване вугілля кількістю 0,5-1г на 1 л для освітлення розчину.

## **ТП 8. Фільтрування розчину**

### *ТП 8.1 Фільтрація на НУТЧ-фільтрі.*

Після того як розчин освітлили за допомогою активованого вугілля нам потрібно його відфільтрувати разом з суперпарамагнітними мікросферами. Для цього використовуються спеціальні нутч-фільтри, в яких процес фільтрування прискорюється за рахунок примусового збільшення різниці тисків над і під фільтрує перегородкою. У нутч-фільтрі надлишковий тиск створюється над шаром фільтрованої рідини. [50]

## **ТП 9. Очищення антибіотика капреоміцин;**

### *ТП 9.1 Очищення на установці нанофільтрації*

Освітлений розчин далі очищують на установці нанофільтрації. Для відділення розчинених речовин з молекулярними масами від декількох сотень до декількох тисяч використовується процес, проміжний між ультрафільтрацією і зворотнім осмосом, який називають нанофільтрацією [51]

## **ТП 10. Виготовлення порошку.**

### *ТП 10.1 Ліофілізація*

Концентрат, що утворився сушать у ліофільній сушці. Принцип методу ліофільної сушки з одного боку досить простий: заморожується препарат (який необхідно висушити), поміщається у вакуумну камеру, відбувається сублімація розчинника. Але з іншого боку, ліофільна сушка трудомісткий процес: підготовка препарату до сушіння повинна бути ретельною, для повного висихання потрібно високий вакуум, сам процес досить тривалий і вимагає великих енерговитрат.

В нашому випадку антибіотик у піддонах вносять у ліофільну сушарку. Через невеликий обсяг для виготовлення препарату можна використати 1 піддон.

### *ТП 10.2 Грануляція порошка*

Після процесу ліофілізації утворену речовину необхідно перетворити у задану форму, а саме у порошок.

**Подрібнення** - це процес зменшення розмірів часток твердих ЛЗ за допомогою різних пристосувань. Вибір методу подрібнення залежить як від природи речовини, що подрібнюється, так і від необхідності розміру часток одержуваного порошку. В нашому випадку ми обираємо подрібнення за допомогою лабораторного вібраційного млина. Вібраційний кульовий млин ММ 400 це компактний універсальний лабораторний прилад, який був розроблений спеціально для сухого подрібнення невеликих кількостей речовини з кінцевою тонкістю 5 мкм.

### *ТП 10.3 Просіювання*

Ця стадія потрібна для того щоб простежити ступінь дроблення. Для цього можемо застосовувати звуковий просювач. Це високоточний пристрій призначений для швидкої класифікації широкого діапазону сухих частинок і порошків тонкого мікронного діапазону. Дане лабораторне обладнання успішно класифікує зразки аж до 5 мікрон(що є необхідною умовою просіювача) протягом не більше однієї хвилини, а в деяких випадках навіть швидше, зі стійкою відтворюваністю результатів. В цьому приладі використовують нікелеві пластини, виготовлені методом гальванопластики, рекомендується 1 сито на стопку.

## **ТП 11. Фасування, маркування**

### *ТП 11.1 Фасування у флакони*

Після подрібнення антибіотику його фасують у флакони. Попередньо подрібнений і просіяний порошок переносять у бункер фасувального апарату. Дозування налаштовують на заповнення флакону на 1000 мг/1г. Було обрано автоматичний фасувальний апарат SS316. Даний прилад використовується саме для фасування порошків. Перевагою цього приладу є те, що за відсутності флакона операція наповнення не виконується.

### *ТП 11.2. Фасування у вторинну тару*

Автоматична картонажна машина горизонтального типу при роботі здійснює автоматичне відкриття картонних коробок, їх подальше наповнювання флаконами,

розміщення усередині інструкцій до антибіотику капреоміцин, за бажанням нанесення коду і подальше закриття.

### *ТП 11.3. Маркування*

Інформація на маркуванні і в інструкції по застосуванню медичного виробу повинна бути представлена українською мовою відповідно до Закону України «Про засади державної мовної політики», але додатково може включати і інші мови. Нанесення національного знака відповідності, вказівка найменування та адреси уповноваженого представника виробника в Україні - важливі нововведення щодо маркування виробів, які пройшли оцінку відповідності. Опис знака відповідності затверджено ПКМУ № 1184 від 30.12.2015, в той же час, Технічні регламенти уточнюють вимоги до розмірів знака. Якщо оцінка відповідності проводилася з залученням призначеного органу, то його номер необхідно вказується поруч зі знаком.

## **ЗВ 12. Знешкодження відходів**

Відпрацьовані робочі розчини мийних, мийно – дезінфікуючі засоби та воду знешкоджують.

### *ЗВ 12.1. Знешкодження рідких відходів*

Розчини миючих та дезінфікуючих засобів від ДР 1.2.1, ДР 1.2.2, ДР знешкоджують в аеротенках очисних споруд.

Відпрацьована вода надходить у спеціальні збірники, де відбувається її очищення фізичним методом, а саме відстоюванням. Забруднюючі речовини під дією сил тяжіння випадають в осад або зливають на поверхню, а очищена вода потрапляє у міську каналізацію.

## РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

Найвищий рівень біосинтезу капреоміцину (6 г/л) досягається, за умови росту *Streptomyces capreolus* NRRL2773 протягом 164 год на сереовищі, що містить два пептонні гідролізати і джереом вуглецю є глюкоза, і має наступний склад[1]:

Глюкоза- 30 г/л

NZ-амін типу А 4.0 г/л

CaCl<sub>2</sub> 0,3 г/л

MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2,5г/л

Геліта Сол П 29,2 г/л

Бурякова меляса 7.0 г/л

Натрій едетат 0,5г/л

Полігліколь Р2000 0,2 г/л

					НУХТ БТЕК 04.03.07 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Устименко С.О.			РОЗДІЛ 1. Контроль виробництва	Літ.	Арк.	Акрушів
Консульт							1	7
Керівник		Слободян О.П.				Кафедра БТМ		
Н. Контр.						86		
Затверд.		Пирог. Т.П.						

## 8.1.Карта контрольних точок виробництва капреоміцину

Таблиця 8.1

Карта контрольних точок виробництва капреоміцину

<i>Номер контрольної точки та назва стадії</i>	<i>Об'єкт контролю та показник, що визначається</i>	<i>Засоби та методи контролю</i>	<i>Періодичність перевірки та відбору проб</i>	<i>Нормативні значення показника</i>
<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
Кх 1.2 <i>Приготування миючих та дезинфікуючих засбів</i>	<b>Лізоформін 3000</b>	<b>Фізичний метод</b>		
Км 1.3 <i>Підготовка приміщень</i>	<b>Генеральне прибирання</b> Стерильність	мікробіологічний контроль	мікробіологічний контроль після стерилізації	КУО < 800/см <sup>2</sup>
Км 1.3 <i>Підготовка обладнання та комунікацій</i>	<b>Щотижневе прибирання</b> Стерильність	мікробіологічний контроль	мікробіологічний контроль після стерилізації.	КУО < 300/см <sup>2</sup>
Кт 1.4 <i>Підготовка обладнання та комунікацій</i>	<b>Миття</b> Температура, стерильність	Термометр, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t=70-80°C; Відсутність мікробіоти

Км 1.4 <i>Підготовка обладнання та комунікацій</i>	<b>Дезінфекція та ополіскування</b> Стерильність Термоментр	мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації.	КУО < 800/см <sup>2</sup>
Кт 1.4 <i>Підготовка обладнання та комунікацій</i>	<b>Стерилізація</b> Температура, час, стерильність	Термоментр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	Т=1 год; t=125-130°C; Відсутність мікробіоти
Кх, Км 2.1 <i>Приготування розчину меляси</i>	<b>Меляса</b> Температура, час, стерильність	Термоментр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	Т=1 год; t=110°C; Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.1 <i>Приготування і стерилізація піногасника</i>	<b>Піногасник</b> Температура, час, стерильність	Термоментр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації,	Т=30 хв; t=131°C;

			мікробіологічний контроль після стерилізації	Відсутність мікробіоти
<i>Кх 3.2</i> <i>Підготовка промивної суміші</i>	<b>Концентрація промивної суміші у середовищі</b>	Хімічний метод	Під час проведення маніпуляції	100 мл промив води + 200 мл 0,5М розчину соляної к-ти/ 1 л культуральної рідини.
Кт, Км 4.1 <i>Приготування і стерилізація поживного середовища для вирозування інокуляту в колбах на качалках</i>	<b>Композиція А</b> Температура, час, стерильність	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	τ=20 хв; t=130°C; Відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1 <i>Приготування і стерилізація композиції Б</i>	<b>Композиція Б</b> Температура, час, стерильність	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	τ=30 хв; t=120°C; Відсутність мікробіоти

<p>Кт, Км 4.1</p> <p><i>Приготування і стерилізація композиції В</i></p>	<p><b>Композиція В</b></p> <p>Температура, час, стерильність</p>	<p>Термометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p><math>T=40</math> хв;  <math>t=131^{\circ}\text{C}</math>;  Відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт, Км 4.2</p> <p><i>Приготування і стерилізація поживного середовища для інокулятора об'ємом 21,8 л</i></p>	<p><b>Композиція А</b></p> <p>Температура, час, стерильність</p>	<p>Термометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p><math>T=20</math> хв;  <math>t=130^{\circ}\text{C}</math>;  Відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт, Км 4.2</p> <p><i>Приготування і стерилізація поживного середовища для інокулятора об'ємом 21,8 л</i></p>	<p><b>Композиція Б</b></p> <p>Температура, час, стерильність</p>	<p>Термометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p><math>T=30</math> хв;  <math>t=120^{\circ}\text{C}</math>;  Відсутність мікробіоти</p>

Кт, Км 4.2 <i>Приготування і стерилізація поживного середовища для інокулятора об'ємом 21,8 л</i>	<b>Композиція В</b> Температура, час, стерильність	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$T=40$ хв; $t=131^{\circ}\text{C}$ ; Відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.4 <i>Приготування і стерилізація поживного середовища для робочих ферментерів об'ємом 160 л</i>	<b>Композиція А</b> Температура, час, стерильність	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$T=20$ хв; $t=130^{\circ}\text{C}$ ; Відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.4 <i>Приготування і стерилізація пс для робочих ферментерів об'ємом 160 л</i>	<b>Композиція Б</b> Температура, час, стерильність	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$T=30$ хв; $t=120^{\circ}\text{C}$ ; Відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.4 <i>Приготування і стерилізація пс для робочих ферментерів об'ємом 160 л</i>	<b>Композиція В</b> Температура, час, стерильність	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль	$T=40$ хв; $t=131^{\circ}\text{C}$ ; Відсутність мікробіоти

			після стерилізації	
Кт, Км 3.2 <i>Вирощування робочої культури на агаризованому середовищі.</i>	<b>Колекційна культура <i>Streptomyces capreolus</i> NRRL2773</b> Морфологічна однорідність, відсутність сторонньої мікробіоти, відсутність неконтрольованої мутації	Термометр, годинник, камера Горяєва мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль проводять кожні 8 годин до настання активної споруляції культури	$T=76$ год; $t=27-29^{\circ}\text{C}$ ; Відсутність мікробіоти; Спор/мл
Кт, Км 3.3 <i>Вирощування культури в колбах на качалках.</i>	<b>Посівний матеріал</b> Температура, тривалість, частота обертів качалки, мікробіологічна чистота культури	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично протягом всього часу вирощування, мікроскопіювання- кожні 8 годин	$T=24$ год; $t=27-29^{\circ}\text{C}$ ; $\omega=250$ об/хв; Відсутність мікробіоти;
Кт, Км 3.4 <i>Вирощування культури в</i>	<b>Посівний матеріал</b> Температура, тривалість, частота обертів	Термометр, годинник, мікроскоп	Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуютьс	$T=24$ год; $t=27-29^{\circ}\text{C}$ ; $\omega=250$ об/хв;

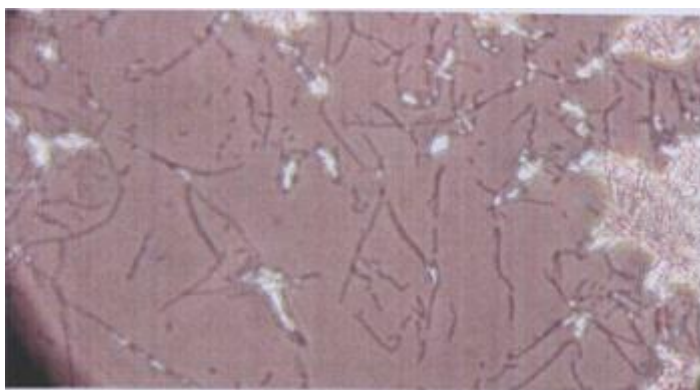
<i>інокуляторі об'ємом 21,8 л</i>	мішалки, мікробіологічна чистота культури; Морфологічна відповідність мікроорганізмів		я автоматично протягом всього часу вирощування, мікроскопіюв ання- кожні 8 годин	Відсутніст ь мікробіоти ;
Кт, Кх, Км 4.1 <i>Виробниче культивування у ферментерах об'ємом 0,24 м<sup>3</sup>.</i>	Температура, тривалість, частота обертів мішалки, мікробіологічна чистота культури; рівень рН, рівень піни Морфологічна відповідність мікроорганізмів, концентрація капреоміцину	Термометр, годинник, датчик рН, дітчик піноутворення мікроскоп	Температура, рівень рН, рівень піни, швидкість обертання контролюють ся і підтримуютьс я автоматично протягом всього часу вирощування, мікроскопіюв ання- кожні 8 годин	τ=168 год; t=27-29°C; ω=300 об/хв; рН=7-8 Відсутніст ь сторонньої мікробіоти ;
<i>Кт 3.1 Додавання суперпарамаг- нітних мікросфер</i>	<b>Тривалість</b> <b>Шв</b> <b>перемішування</b> <b>мішалки</b>	Годинник,	Тривалість  Шв перемішуванн я мішалки	τ=2 год; ω=60 об/хв;
<i>Кх 3.2 Додав промивної суміщі</i>	<b>Концентрація</b> <b>промивної</b> <b>суміщі</b> у <b>середовищі</b>	Хімічний метод	Під час проведення маніпуляції	С= 300мл/1л культураль ної рідини

<i>Кт 3.3</i> <i>Освітлення рідини</i>	<b>Концентрація</b> <b>Трив переміш</b>	Хімічний метод, годинник		C=0,5-1 г/ л середовищ а
<i>Кт 4.1</i> <i>Фільтрування на НУТЧ- фільтрі</i>	<b>Тиск -1бар</b>	Монометр	Монометр	Тиск=- 1бар
<i>Кт 5.1</i> <i>Очищення на установці нанофільтрації</i>	<b>Діаметр пор</b>			d =669кДа
<i>Кт 6.1</i> <i>ліофілізація</i>	<b>Температура сушіння, тривалість</b>	Термометр, годинник	Під час Процесу	T=60 год t°=-35° t°=40° C
<i>Кт 6.2</i> <i>Грануляція порошку</i>	<b>Діаметр часток</b>	Просіювач	Після процесу подрібнення	d=5 мкм
<i>Кт 7.1</i> <i>Фасування у флакони</i>	<b>Кількість препарату</b>	Поверхневий огляд	Під час процесу	V=1000 мг

<i>Кт 7.1</i> <i>Фасування в упаковку</i>	<b>Кількість флаконів у упаковці</b>	Поверхневий огляд	Під час процесу	1 флакон/упаковка
<i>Кт 7.2</i> <i>Маркування</i>	<b>Якість і правильність нанесення етикетки</b>	Поверхневий огляд	Під час процесу	Відповідність до норм маркування

## 8.2. Мікробіологічний контроль

Мікробіологічний контроль здійснюється розсівом на чашки Петрі з агаризованими середовищами і мікроскопуванням. Культуральну рідину розсівають петлею до ізольованих колоній на чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром (МПА) для виявлення бактерій. Для мікроскопування використовують препарати «роздавлена крапля». Препарат «роздавлена крапля» готують на знежиреному предметному склі, на яке наносять маленьку краплю культуральної рідини, накривають накривним скельцем і розглядають з об'єктивом 40х, а також мікроскопують препарат з імерсійною системою.[2]



*Рис.8.1 Характер росту Streptomyces capreolus*

На чашках Петрі *Streptomyces capreolus* характерний порошкоподібний вигляд, без споруляції, міцелій сильно фрагментований.[1]

*Підготовка чашок Петрі.* У попередньо простерилізованій в сухо жаровій шафі чашки Петрі розливають по 20-30 мл розплавлені в киплячій водяній бані агаризовані середовища МПА. Чашки залишають на рівній поверхні для рівномірного застигання агару і витримують протягом 2-3 діб при температурі 30°C кришками до низу.



*Рис.8.2 Характеристика Streptomyces capreolus на агаризованих середовищах Приготування розведень.* Серію розведень посівного матеріалу і культуральної рідини з капреоміцином готують для отримання ізольованих колоній на поверхні агаризованого середовища. Відібрану пробу досліджуваної суспензії об'ємом 1 мл стерильною піпеткою вносять у пробірку, яка містить 9 мл стерильної водопровідної води, ретельно перемішують. З отриманого розведення відбирають 1 мл і переносять у наступну пробірку з 10 мл стерильної водопровідної води. Аналогічно проводять наступні розведення. Кількість розведень залежить від припустимої кількості мікроорганізмів у досліджуваній суспензії.

### **8.3. Концентрація цільового продукту (капреоміцину)**

Кількісне визначення концентрації капреоміцину за допомогою біологічних методів базується на порівнянні ступенів пригнічення росту чутливих мікроорганізмів (тест-культур) у результаті дії антибіотика, який випробовується, і розчину антибіотика капреоміцину стандартного зразка з відомими концентраціями.

*Визначення оптичної густини.* Для визначення кількості біомаси капреоміцину готують розведення клітинної суспензії необхідної концентрації і вимірюють коефіцієнт поглинання зразка при довжині хвилі 550 нм. Отриманні визначення перераховують на суху біомасу за допомогою калібрувального графіку.

*Метод дифузії.* Даний метод передбачає використання відповідного поживного середовища, яке притаманне саме для капреоміцину, яке містить тест-культуру, стерильних циліндрів, до яких вносять випробовуваний зразок антибіотика, і розчин стандартного зразка з відомими концентраціями.

Для приготування середовища з тест-культурою бактеріологічною петлею відбирають клітини *Bacillus subtilis* ATCC 6633 з пробірок зі скошеним агаром і переносять до колб об'ємом 250 мл з 50 мл середовища №7 з додавання 1% глюкози. Культивування проводять за температури 29°C у колбах на качалках при обертанні 170 об/хв. У чашки Петрі, котрі містять 10 мл застиглого середовища №7 з додавання 1% глюкози, встановлюють стерильні фарфорові або з нержавіючої сталі циліндри і розливають по 15 мл середовища з тест культурою. Паралельно готують розчини стандартного зразка з відомими концентраціями капреоміцину. У всі циліндри або лунки вносять рівні об'єми розчинів. Досліди необхідно ставити щонайменше у триразовій повторності.

*Турбідиметричний метод.* У відповідне поживне середовище вносять суспензію вибраних мікроорганізмів, чутливість яких до випробовуваного антибіотика така, що забезпечує достатньо сильне пригнічення їх росту за умов проведення випробування. Використовують певну кількість суспензії, яка підбирається таким чином, щоб одержати легко вимірювану каламутність після закінчення інкубаційного періоду тривалістю близько 4 год.

Готують розчини стандартного зразка з відомими концентраціями і розчини випробовуваного антибіотика. Всі досліди проводять у трикратній повторності. Рівні об'єми кожного з розчинів вносять в однакові пробірки і додають у кожен пробірку рівні об'єми інокульованого середовища (наприклад, 1 мл розчину і 9 мл середовища). Паралельно готують дві контрольні пробірки з інокульованим середовищем, що не містить антибіотика. В одну з них одразу вносять 0,5 мл

формальдегіду. Ці пробірки використовують для настроювання оптичного приладу, за допомогою якого проводять вимірювання. Усі пробірки розташовують у водяній бані або іншій пристрій, що дозволяє швидко довести пробірки до необхідної температури інкубації. Пробірки витримують при цій температурі від 3 до 4 год., забезпечуючи однорідність температури і рівний час інкубації для кожної пробірки.

Після закінчення періоду інкубації зупиняють ріст мікроорганізмів, додаючи в кожна з пробірок 0,5 мл формальдегіду, або шляхом теплової обробки і за допомогою оптичного приладу вимірюють каламутність вмісту пробірок. Розраховують активність, використовуючи відповідні статистичні методи.

*Технологія фарбування за Грамом.* Оскільки *Streptomyces carreolus* є грампозитивним мікроорганізмом проводять фарбування за Грамом для того щоб визначити чистоту культури. Данний етап проводять разом із мікроскопією. Це емпірично виведений метод розрізнення бактерій за допомогою фарбування їх певним методом на дві великі групи: Грам-позитивні і Грам-негативні), що розрізняються хімічними та фізичними властивостями їх клітинної стінки.

### **Визначення концентрації біомаси**

*Визначення кількості абсолютної сухої біомаси.* У сухожаровій шафі висушують алюмінієву зважувальну чашу і визначають її масу. Відцентрифуговані клітини двічі промивають дистильованою водою і знову центрифугують на 5000 обертах/хв протягом 20 хв. Надосадову рідину видаляють і переносять масу клітин на зважувальну чашу. Біомасу, яка залишилася на стінках колби для центрифугування, змивають 1-2 мл дистильованої води і зливають у чашу. Чашу з біомасою поміщають у сухожарову шафу і висушують, до постійної маси при 80°C. Процес сушіння у середньому займає 6-24 год залежно від температури сухожарової шафи і густини біомаси. Після висушування розраховують різницю у масі і виражають кількість сухої біомаси у г/л.[52]

### **Визначення концентрації джерела вуглецю(глюкоза)**

Метод визначення глюкози.

Відбирають пробу культуральної рідини у кількості 20 мл, пробу розводять у 5 разів додаючи 80 мл дистильованої води. Далі розведену пробу центрифугують протягом 40-50 хвилин при 7000-8000 обертів на хвилину. Після цього надосадову рідину з центрифужних пробірок зливають та фільтрують на паперовому фільтрі. Фільтрат у кількості 45,5 мл переносять у колбу та додають 4,5 мл буферного розчину. Відбирають 20 мл фільтрату та переносять у пробірку великого об'єму. До пробірки вносять 10 мл 1-2% розчину комплексного амілолітичного ферментного препарату. Пробірки ставлять у термостат при параметрах 30 °C на 50-60 хвилин. За цей час весь декстрин має гідролізувати до глюкози та низької кількості мальтози. Після завершення часу у пробірку вносять 5-10 мл 0,3 М розчину трихлороцтової кислоти[35].

Після цього розчин фільтрують та переносять певний об'єм проби, у мірну колбу, таким чином, щоб розвести пробу у 250-1000 разів, далі від розведеного розчину відбирають 5-10 мл і переносять у 20 мл 20 мМ буферного розчину системи:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  —  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  з рН 7.2. До даної системи додають глюкозооксидазу іммобілізовану на полімері ЕДТ (20 мМ фосфатному буфері, рН 6,2, яка складалася з 10–2 М 3,4-ети-лендіокситіофену, 10–3 М поліетиленгліколю та 30 мг/мл розчину ГОД) у вигляді суспензії.

Вимірювання концентрації глюкози здійснюється за допомогою амперометричного перетворювального приладу, що складається з традиційної триелектродної системи, в якій друкований електрод SensLab (SensLab GmbH, Leipzig, Німеччина) поєднав у собі всі три електроди: платиновий робочий, допоміжний та електрод порівняння. Платинові друковані електроди SensLab досліджували на відтворюваність та працездатність у діапазоні потенціалу від 0 до +600 мВ. Вимірювання проводять опусканням датчика амперометричного приладу у розчин-систему з глюкозооксидазою та підготовленою культуральною рідиною.

Величина, що вимірюється- це сила струму, що визначається у нА. Концентрацію глюкози визначають за градуовальним графіком залежності сили струму ( нА) і концентрації глюкози ( мМ). Одержане значення концентрації спочатку

перемножують на ступінь розведення а потім переводять концентрацію з мл в г у певному об'ємі чи г/л[53].

### **Вологість.**

Вологу вимірюють за допомогою метода висушування. Для цього беруть дві наважки по 3-5 г. Одну наважку відправляють у апарат Чижової на декілька хвилин. Потім її дістають, охолоджують в зважують. Масову частку вологи  $W$ , %, розраховують за формулою

### **Біологічна активність антибіотика.**

Вираження величин біологічної активності антибіотиків звичайно здійснюється в умовних одиницях, що містяться в 1 моль розчину (од/моль) або в 1 мг препарату (од/мг). За одиницю біологічної активності приймають мінімальну кількість антибіотика, здатну пригнітити розвиток або затримати ріст певного числа клітин стандартного штаму тест-мікробів в одиниці об'єму живильного середовища.

### **Біологічний контроль.**

Біологічний контроль ставить завданням з'ясування стерильності готового препарату. Для цього використовують два методи:

1) Пов'язаний з інактивацією антибіотика й висівом його у відповідне поживне середовище. Біологічний контроль проводиться таким чином. У пробірки, що містять середовище Левенштейна-Йенсена, вносять капреоміцин у кількості, здатній повністю інактивувати мікобактерію туберкульозу. Пробірки витримують 2-3 доби при температурі  $37^{\circ}\text{C}$  для контролю стерильності антибіотика. Потім пробірки розділяють на 2 групи. Одну витримують при  $37^{\circ}\text{C}$ , а іншу - при  $24^{\circ}\text{C}$  протягом 5 діб. Ведуть щоденне спостереження за можливим розвитком мікроорганізмів.

2) Визначається тим, що для більшості антибіотиків немає біологічних інактиваторів їх біоактивності. Тому у досліджуваних препаратів виявляють наявність стійких до них форм мікроорганізмів, а також визначають можливу

присутність чутливої мікрофлори. Для визначення можливої присутності чутливої мікрофлори розчин антибіотику пропускають через мембранні фільтри з діаметром пор не більше 0,75 мкм.

#### **8.4. Концентрація цільового продукту (капреоміцину)**

Кількісне визначення концентрації капреоміцину за допомогою біологічних методів базується на порівнянні ступенів пригнічення росту чутливих мікроорганізмів (тест-культур) у результаті дії антибіотику, який випробовується, і розчину антибіотику капреоміцину стандартного зразка з відомими концентраціями.

*Визначення оптичної густини.* Для визначення кількості біомаси капреоміцину готують розведення клітинної суспензії необхідної концентрації і вимірюють коефіцієнт поглинання зразка при довжині хвилі 550 нм. Отриманні визначення перераховують на суху біомасу за допомогою калібрувального графіку.

*Метод дифузії.* Даний метод передбачає використання відповідного поживного середовища, яке притаманне саме для капреоміцину, яке містить тест-культуру, стерильних циліндрів, до яких вносять випробовуваний зразок антибіотику, і розчин стандартного зразка з відомими концентраціями.

Для приготування середовища з тест-культурою бактеріологічною петлею відбирають клітини *Bacillus subtilis* ATCC 6633 з пробірок зі скошеним агаром і переносять до колб об'ємом 250 мл з 50 мл середовища №7 з додавання 1% глюкози. Культивування проводять за температури 29°C у колбах на качалках при обертанні 170 об/хв. У чашки Петрі, котрі містять 10 мл застиглому середовища №7 з додавання 1% глюкози, встановлюють стерильні фарфорові або з нержавіючої сталі циліндри і розливають по 15 мл середовища з тест культурою. Паралельно готують розчини стандартного зразка з відомими концентраціями капреоміцину. У всі циліндри або лунки вносять рівні об'єми розчинів. Досліди необхідно ставити щонайменше у триразовій повторності.

*Турбідиметричний метод.* У відповідне поживне середовище вносять суспензію вибраних мікроорганізмів, чутливість яких до випробовуваного

антибіотика така, що забезпечує достатньо сильне пригнічення їх росту за умов проведення випробування. Використовують певну кількість суспензії, яка підбирається таким чином, щоб одержати легко вимірювану каламутність після закінчення інкубаційного періоду тривалістю близько 4 год.

Готують розчини стандартного зразка з відомими концентраціями і розчини випробовуваного антибіотика. Всі досліді проводять у трикратній повторності. Рівні об'єми кожного з розчинів вносять в однакові пробірки і додають у кожен пробірку рівні об'єми інокульованого середовища (наприклад, 1 мл розчину і 9 мл середовища). Паралельно готують дві контрольні пробірки з інокульованим середовищем, що не містить антибіотика. В одну з них одразу вносять 0,5 мл формальдегіду. Ці пробірки використовують для настроювання оптичного приладу, за допомогою якого проводять вимірювання. Усі пробірки розташовують у водяній бані або іншій пристрій, що дозволяє швидко довести пробірки до необхідної температури інкубації. Пробірки витримують при цій температурі від 3 до 4 год., забезпечуючи однорідність температури і рівний час інкубації для кожної пробірки.

Після закінчення періоду інкубації зупиняють ріст мікроорганізмів, додаючи в кожен з пробірок 0,5 мл формальдегіду, або шляхом теплової обробки і за допомогою оптичного приладу вимірюють каламутність вмісту пробірок. Розраховують активність, використовуючи відповідні статистичні методи.

*Технологія фарбування за Грамом.* Оскільки *Streptomyces capreolus* є грампозитивним мікроорганізмом проводять фарбування за Грамом для того щоб визначити чистоту культури. Данний етап проводять разом із мікроскопією. Це емпірично виведений метод розрізнення бактерій за допомогою фарбування їх певним методом на дві великі групи: Грам-позитивні і Грам-негативні), що розрізняються хімічними та фізичними властивостями їх клітинної стінки.

## РОЗДІЛ 9. АВТОМАТИЗАЦІЯ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЦТВА

Автоматизації підлягає ділянка нанофільтрації та вказана в Таблиці 9.1.

*Таблиця. 9.1*

Структура ділянки виробництва, що підлягає автоматизації

№	Ділянка виробництва	Об'єкт автоматизації	Показники, що піддаються автоматизованому контролю та керуванню	Засоби автоматизації
3	Нанофільтраційна установка	Збірник проміжного продукту	Рівень рідини в апараті,	Контроль, сигналізація.
		Насос	Ввімкнення /вимкнення	Регулювання
		Нанофільтраційний-модуль.	Тиск на вході/виході модуля	Контроль, регулювання.

### 9.1 Поставлення завдання на розробку системи автоматизації НФ-установки.

НФ-модуль представляє собою комплекс, що складається зі збірника фільтрату та продукту, НФ-модулю та насоса. Основні параметри це тиск та рівень рідини в збірнику. Детальний опис параметрів описано у Таблиці 9.2.

*Таблиця 9.2*

Завдання на розробку системи автоматизації( параметри)

Параметр, місце відбору імпульсу	Значення параметру допустимі відхилення	Система автоматизації		
		Вид системи автоматизації	Характер контролю, регулювання, управління	Додаткові вимоги
Рівень рідини в апараті,(L)	Заданий рівень	Контроль, сигналізація	Моніторинг	Керування аналоговим пневматичним клапаном
			Підтримання на заданому рівні	

			Сигналізація при значному відхиленні (світлова)	(подачі води у збірник)
Ввімкнення /вимкнення насоса	Не регулюється	Контроль, управління	Покази (об/хв)	Керування двигуном (аналогове)
			Пуск/стоп	
Тиск на вході/виході модуля (P)	Вхід =2-3 атм	Контроль, регулювання	Моніторинг	Вимірювання та підтримання на заданому рівні за допомогою обертів двигуна.
			Сигналізація (світлова)	

## 9.2. Опис функціональної схеми автоматизації

**Контур 1.** Рівень рідини в збірнику вимірюється ємнісним датчиком з електропередачою сигналу (поз. 1а). Дискретний сигнал від датчика подається на ПЛК і приводить у дію виконуючий механізм - автоматичним клапаном (поз. 1в). Уніфікований сигнал до ВМ надходить з панелі керування (поз. 1б). При зменшенні об'єму рідини в збірнику подається вода через автоматичний клапан та рівень вирівнюється.

**Контур 2.** Насос який подає продукт (М), що приводиться в дію за допомогою виконавчого механізму: електромотора насоса з аналоговим магнітним перетворювачем для зміни швидкості (поз. 2б). Насос приводиться у дію магнітним пускачем КМ1. Уніфікований сигнал швидкості подачі продукту до ВМ надходить з електро-динамоперетворювача (поз. 2в). Паралельно дані фіксуються на ПК і при значних відхиленнях від заданих сигналізують оператора (технолога) для подальших технологічних дій.

**Контур 3.** Тиск на вході в УФ-модуль вимірюється постійно за допомогою уніфікованого аналогового перетворювача тиску виготовленого на

основі чутливої частини деформаційного манометра (поз. 3а). параметер(тиск) від датчика у вигляді уніфікованих аналогових сигналів надходить до нормуючого перетворювача( 3б) і перетворюється в уніфікований електричний сигнал. Останній йде до ПЛК, конвертується у цифровий сигнал, що відображається на моніторі.

**Контур 4.** Тиск на виході з УФ-модуля вимірюється постійно за допомогою уніфікованого аналогового перетворювача тиску виготовленого на основі чутливої частини деформаційного манометра (поз. 4а). параметер(тиск) від датчика у вигляді уніфікованих аналогових сигналів надходить до нормуючого перетворювача( 4б) і перетворюється в уніфікований електричний сигнал. Останній йде до ПЛК, конвертується у цифровий сигнал, що відображається на моніторі. В залежності від перепаду тиску регулюється швидкість роботи двигуна через аналоговий частотний перетворювач 4в.

### 9.3. Специфікація засобів автоматизації

Специфікація засобів автоматизації вказана в Таблиці 9.3.

Таблиця 9.3

Специфікація засобів автоматизації

Позиція	Параметр	Місце установки	Найменування характеристика приладу	Тип моделі	Завод виготовлювач
16	Рівень	По місцю	Блок ручного управління імпульсними виконавчими механізмами, вхід – імпульсний, вихід – імпульсний, перехід ручний/автоматичний режим	БРУ5	ТОВ «Мікрол» Україна

1в	Рівень	По місцю	Насос перистальтичний дозуючий з магнітним перетворювачем: дозування 0,1-9990 мл, швидкість 0,1-100 об/хв	BT100- 1F/	ТОВ «НОФЛИ ПАК»
2б	Оберти двигуна	По місцю	Перетворювач частотний діапазоном потужності 1х220В: 0.2кВт — 2.2кВт, вихідний струм 3х0...220В.	NE-S1	Hitachi Industrial Equipmen t Systems Co.,Ltd
3а	Тиск	На вході в модуль	Датчик тиску аналоговий електронний з діапазоном вимірювання 0-16 бар±1% , універсальний сигнал 4-20 мА.	LEO 779692	LEO
4а	Тиск	На виході з модуля	Універсальний перетворювач аналогового сигналу в цифровий	E848M	ООО ATD- Kompleks ,

## Список використаної літератури

1. Нормативно-директивні документи МОЗ України"  
<http://mozdocs.kiev.ua/likiview.php?id=32>.....
2. Віртуальна бібліографічна довідка/ Об'єднана довідкова служба бібліотек України [http://www.uintai.kiev.ua/viewpage.php?page\\_id=300](http://www.uintai.kiev.ua/viewpage.php?page_id=300)
3. Виділення капреоміцину// Патент Південна Корея № KR100385152B1 2016  
[/https://patents.google.com/patent/KR100385152B1/en](https://patents.google.com/patent/KR100385152B1/en)
4. Identification of the Biosynthetic Gene Cluster and an Additional Gene for Resistance to the Antituberculosis Drug Capreomycin [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1932801/>
5. Інтернет- ресурс <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00314>.....
6. Інтернет- ресурс <http://mozdocs.kiev.ua/likiview.php?id=3236>.....
7. Інтернет-ресурс<https://www.lsgeotar.ru/kapreomitsin-11479.html#protivopokazaniya>.....
8. Michelle louise lea bsc(hons). a physiological study of streptomyces capreolus and factors governing growth and capreomycin biosynthesis / michelle louise lea bsc(hons). – liverpool john moores university school of biomole, 2007.....
9. Інтернет-ресурс<https://www.lsgeotar.ru/kapreomitsin-11479.html#protivopokazaniya>.....
10. Гетерологічне виробництво капреоміцину і генерування нових похідних капреоміцину за допомогою метаблицологічної інженерії. Патент WO2008141190A1
11. Патент CN105506042A Method for producing capreomicyn by fermentation/.
12. Інтернет- ресурс <https://prom.ua/Glyukoza.html>
13. Інтернет- ресурс <https://www.systopt.com.ua/pepton-fermentatyvnyj/>
14. Інтернет- ресурс <https://www.chemicalbook.com/Price/Sodium-edetate.htm>
15. Інтернет- ресурс <https://prom.ua/Cacl2.html>
16. Інтернет- ресурс <https://prom.ua/Mgso4-7h2o.html>

17. Інтернет- ресурс <https://www.systopt.com.ua/pepton-fermentatyvnyj/>
18. Інтернет- ресурс <https://prom.ua/Poliglikoli.html>
19. Інтернет- ресурс <https://flagma.ua/melyasa-so8748198-1.html>
20. Інтернет- ресурс <https://russian.alibaba.com/g/yeast-extract-price.html>
21. Інтернет- ресурс <https://prom.ua/Solodovye-ekstrakty.html>
22. Інтернет- ресурс <https://www.systopt.com.ua/ru/pepton-fermentatyvnyj-2/>
23. Інтернет- ресурс <https://prom.ua/Glyukoza.html>
24. Інтернет- ресурс <https://www.covalent.com.ua/ru/shop/sucrose/>
25. Інтернет- ресурс <https://prom.ua/Agar-agar.html>
26. Інтернет- ресурс <https://zoovetpostavka.com.ua/p304137906-apramitsina-sulfat-500g.html>
27. Інтернет- ресурс <https://bolen.com.ua/kapreomicin-liofilizat-dlja-rastvora-dlja-in-ekcij-po-1-0-g-in-bulk-v-flakonah-50.html>.....
28. Нормативно-директивні документи МОЗ України" <http://mozdocs.kiev.ua/likiview.php?id=32>.....
29. Віртуальна бібліографічна довідка/ Об'єднана довідкова служба бібліотек України [http://www.uintai.kiev.ua/viewpage.php?page\\_id=300](http://www.uintai.kiev.ua/viewpage.php?page_id=300)
30. ОАО «Кієвмедпрепарат» получило регистрационное свидетельство на препарат капреомицин/ Інтернет-ресурс <http://www.arterium.ua/ru>
31. [http://prombiotech.kpi.ua/materials/Atestroboty2015/bakalavr\\_2018/Skorobohatko\\_O\\_S..PDF](http://prombiotech.kpi.ua/materials/Atestroboty2015/bakalavr_2018/Skorobohatko_O_S..PDF)
32. Інтернет-ресурс <https://uk.unionpedia.org/Мікроаерофіли>
33. *David J. Beale, § Nainesh B. Godhani, Paul D. Morrison, Ian H. Harding, . Untargeted Metabolic Profiling of Winery-Derived Biomass Waste Degradation by Penicillium chrysogenum//-. ' . Australia S Supporting Information-2015. – , N 10. Vol 23 – . P . 1145-1148*
34. Виділення капреомицину// Патент Південна Корея № KR100385152B1 2016 [/https://patents.google.com/patent/KR100385152B1/en](https://patents.google.com/patent/KR100385152B1/en)
35. «G&T Polymer Technologies. Суперпарамагнітні мікросфери [Електронний ресурс] / «G&T Polymer Technologies. – 2015. – Режим доступу до ресурсу:

<http://gtpt.ru/tekhnicheskaya-literatura/polimernye-mikrosfery/magnitnye-polimernye-mikrosfery/>.

36. Дорохова Е.М., Прохорова Г.В. Аналітична хімія. Фізико-хімічні методи аналізу. — М., 1991; Фритц Дж., Гьерде Д., Поланд К. Ионная хроматография. — М., 1984
37. Виділення капреоміцину// Патент Китай №CN105504023А 2016 / <https://patents.google.com/patent/KR100385152B1/en>
38. Реактор хімічний на 160 л Електронний ресурс: [ режим доступу] : <https://azovchemservice.prom.ua/p227299353-emalirovannyj-reaktor-himicheskij.html>
39. Реактор хімічний на 63 л Електронний ресурс: [ режим доступу] : <https://prom.ua/p1047766861-reaktor-rsm-dlya.html>
40. СІР-станція на 2 реактори Електронний ресурс: [ режим доступу] <https://octavis.group/p942539482-sip-mojka.html>
41. Реактор на 10 л Електронний ресурс: [ режим доступу] <https://perryvidex.prom.ua/p900516674-reaktor-nerzhaveyuschej-stali.html>
42. Реактор хімічний на 160 л Електронний ресурс: [ режим доступу] : <https://azovchemservice.prom.ua/p227299353-emalirovannyj-reaktor-himicheskij.html>
43. Фільтр індивідуальної очистки для азота Електронний ресурс: [ режим доступу] [https://newfilter.com.ua/ru/filtri\\_gaza/filtratsiya-azota.html](https://newfilter.com.ua/ru/filtri_gaza/filtratsiya-azota.html)
44. Відцентрований насос без сальникового типу з магнітною муфтою Електронний ресурс: [ режим доступу] [https://ascopumps.com.ua/ua/pumps/tsentrobeznhnye/s\\_magnitnoj\\_muftoj/serii\\_db.html](https://ascopumps.com.ua/ua/pumps/tsentrobeznhnye/s_magnitnoj_muftoj/serii_db.html)
45. Шнековий гвинтовий насос Електронний ресурс: [ режим доступу] <https://dalgakiran.ua/uk/products/gvyntovi-nasosy-shnekovi>

46. Вібраційний кульовий млин Електронний ресурс: [ режим доступу] <https://www.retsch.ru/ru/products/milling/ball-mills/mixer-mill-mm-400/function-features/>
47. Звуковий просіювач Електронний ресурс: [ режим доступу] <https://rvs-ltd.ru/zvukovoj-proseivatel-sonic-sifter.html>
48. Фасувальний апарат у флакони Електронний ресурс: [ режим доступу] <http://m.ua.dahepacking.com/bottle-filling-machine/automatic-dry-powder-injectable-powder.html>
49. Фасувальний апарат у коробки Електронний ресурс: [ режим доступу] <http://www.industrial.com.ua/ru/catalog/1f7828130d94226f79ddc0c003d80a27/193>
50. НУТЧ-фільтр [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: [https://promvit.com.ua/nutch-filtr/?gclid=CjwKCAjw7e\\_0BRB7EiwAIH-goCyK2liw77SOCMsBZRb1IbBhfldwBdBWx7G9dfhagx1bxv4AeYfnZRoCkNMQA\\_vD\\_BwE](https://promvit.com.ua/nutch-filtr/?gclid=CjwKCAjw7e_0BRB7EiwAIH-goCyK2liw77SOCMsBZRb1IbBhfldwBdBWx7G9dfhagx1bxv4AeYfnZRoCkNMQA_vD_BwE).
51. Методи виділення і очищення цільових продуктів в процесі культивування мікроорганізмів [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: <http://um.co.ua/10/10-12/10-126810.html>.
52. Дорохова Е.М., Прохорова Г.В. Аналітична хімія. Фізико-хімічні методи аналізу. — М., 1991; Фритц Дж., Гьерде Д., Поланд К. Ионная хроматография. — М., 1984
53. Визначення концентрації біомаси [Електронний ресурс]. Режим доступу : <http://www.agro-mash.ru/avtoklav.html>