

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ**  
**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ**  
Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю  
Кафедра біотехнології і мікробіології

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

« \_\_\_ » \_\_\_\_\_ 20\_\_ р.

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

« \_\_\_ » \_\_\_\_\_ 20\_\_ р.

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА**  
**НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА**

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

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

на тему: «Культивування *Streptomyces peucetius* для одержання доксорубіцину»

Виконав: здобувач 4 курсу, групи 1

Кукурудза Дмитро Васильович

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Керівник Тетеріна Світлана Миколаївна

(прізвище, ім'я та по батькові повністю)

(підпис)

Консультанти

\_\_\_\_\_ (ім'я та прізвище)

\_\_\_\_\_ (підпис)

\_\_\_\_\_ (ім'я та прізвище)

\_\_\_\_\_ (підпис)

\_\_\_\_\_ (ім'я та прізвище)

\_\_\_\_\_ (підпис)

Рецензент

\_\_\_\_\_ (ім'я та прізвище)

\_\_\_\_\_ (підпис)

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

Здобувач \_\_\_\_\_

(підпис)

Київ – 2022 р.

# НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

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

(назва)

## ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і  
мікробіології

Віктор СТАБНІКОВ

“ 04 ” квітня 20 22 року

## З А В Д А Н Н Я НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

КУКУРУДЗИ Дмитра Васильовича

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи «Культивування *Streptomyces peucetius* для одержання  
доксорубіцину»

керівник роботи ТЕТЕРІНА Світлана Миколаївна, доц., к.т.н.,  
( прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

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

2. Строк подання здобувачем роботи 03.06.2022

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Streptomyces peucetius*,  
цільовий продукт: доксорубіцин, об'єм ферментера 5 м<sup>3</sup>, коефіцієнт заповнення  
0,5-0,65

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

5. Перелік графічного матеріалу

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

## 6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 04 квітня 2022 року

### КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Характеристика цільового продукту	04.04.2022 – 08.04.2022	
2	Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	09.04.2022 – 13.04.2022	
3	Техніко-економічне обґрунтування	14.04.2022 – 20.04.2022	
4	Біосинтез цільового продукту	21.04.2022 – 26.04.2022	
5	Обґрунтування вибору технологічної схеми	27.04.2022 – 03.05.2022	
6	Специфікація обладнання	04.05.2022 – 13.05.2022	
7	Опис технологічної схеми біосинтезу доксорубіцину	14.05.2022 – 19.05.2022	
8	Контроль виробництва	20.05.2022 – 25.05.2022	
9	Оформлення пояснювальної записки	26.05.2022 – 01.06.2022	
10	Виконання графічної частини проекту	26.05.2022 – 01.06.2022	

Здобувач \_\_\_\_\_  
(підпис)

Керівник роботи \_\_\_\_\_  
(підпис)

Дмитро КУКУРУДЗА  
(ім'я та прізвище)

Світлана ТЕТЕРІНА  
(ім'я та прізвище)

## РЕФЕРАТ

Дипломний проект присвячений розробці технологічної та апаратурної схем біосинтезу антибіотику доксорубіцину із використанням штаму бактерій *Streptomyces peucetius* 33-24 який синтезує 1100 мг/л даного антибіотику. Доксорубіцин використовується при лікуванні онкологічних захворювань.

Розрахована потужність виробництва складає 127855 л доксорубіцину за рік. Технологічна схема біосинтезу доксорубіцину включає допоміжні роботи (приготування титрувальних розчинів соляної кислоти та натрію гідроксиду, приготування і стерилізація піногаснику, підготовка і стерилізація поживних середовищ) та технологічний процес (три стадії вирощування посівного матеріалу (у колбах на качалках, в інокуляторах об'ємом 60 та 600 л ) та біосинтез у ферментері об'ємом 5 м<sup>3</sup> зі змінним коефіцієнтом заповнення (початковий – 0,6, а кінцевий – 0,65)).

Дипломний проект складається зі вступу, восьми розділів, списку використаної літератури (68 найменувань), технологічної (формат А1, 1 аркуш) та апаратурної (формат А1, 1 аркуш) схем. Загальний обсяг роботи – 96 сторінок, 15 таблиць, 10 рисунків.

**Ключові слова:** доксорубіцин, *Streptomyces peucetius* 33-24, біосинтез, протипухлинний антиобітик, технологічна схема, апаратурна схема.

## ЗМІСТ

<b>РЕФЕРАТ</b> .....	3
<b>ВСТУП</b> .....	6
<b>РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ</b> .....	8
1.1. Загальна інформація.....	8
<b>РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА</b> ...	14
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування .....	14
2.2. Мутація штаму .....	15
2.3. Розрахунок складу поживного середовища .....	21
2.4. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента .....	22
2.5. Таксономічний статус .....	23
<b>РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ</b> .....	25
3.1. Потреби населення України у доксорубіцині для лікування злоякісних пухлин.....	25
3.2. Розрахунок потужності виробництва.....	30
3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера для біосинтезу антибіотика доксорубіцину .....	32
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для біосинтезу антибіотика доксорубіцину <i>Streptomyces peucetius</i> 33-24.....	34
<b>РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ</b> .....	37
<b>РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ СТАДІЙ ВИРОБНИЦТВА</b> ....	45
5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу .....	45
5.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера.....	45
5.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря.....	47
5.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів.....	48
5.1.4. Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища.....	49
<b>РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ</b> .....	58

<b>РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ ДОКСОРУБІЦИНУ .....</b>	<b>64</b>
<b>РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА.....</b>	<b>77</b>
8.1. Мікробіологічний контроль .....	77
8.2. Визначення концентрації біомаси бактерій .....	79
8.3. Визначення концентрації доксорубіцину .....	80
8.4. Визначення концентрації джерела Карбону .....	80
8.5. Визначення концентрації джерела Нітрогену.....	81
8.6. Карта постадійного контролю .....	83
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....</b>	<b>90</b>

## ВСТУП

Нині проблема раку є однією з найактуальніших соціальних і медичних проблем людства. Щорічно у світі діагностується понад 12,3 млн нових випадків злоякісних пухлин і 7,6 млн випадків смерті від них. Злоякісні пухлини посідають друге рангове місце у структурі смертності населення планети. Показник захворюваності щорічно зростає на 5—10 %. Оскільки рак спричинюється переважно зовнішніми чинниками, показники захворюваності у різних регіонах і країнах суттєво різняться. Це пояснюється відмінністю природних умов і рівня забруднення навколишнього середовища, особливостями харчування і способу життя та тривалістю життя мешканців. За останні 100 років за показником захворюваності і смертності онкопатологія перемістилася з десятого місця на друге. За прогнозами ВООЗ, до 2030 р. онкопатологія вийде на перше місце, а за даними Американської асоціації госпіталів, це станеться вже через 5 років.

Для лікування хворих на рак сучасна медицина використовує хірургічний метод, променеву терапію, медикаментозне лікування. Оскільки протягом останніх 20 років минулого століття відбувся значний прогрес у розумінні молекулярної біології злоякісного росту, з'явилися нові біотехнології і нові ліки, співвідношення методів лікування онкологічної патології кардинально змінилося [1].

Протипухлинні засоби – це лікарські засоби, які здатні пригнічувати проліферацію злоякісних клітин на різних стадіях їхнього поділу. Серед протипухлинних засобів важливе місце посідають антибіотики, які поряд з протимікробною активністю виявляють цитостатичні властивості [2].

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.31 КР ПЗ</i>			
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		<i>Літера</i>	<i>Аркиш</i>	<i>Аркишів</i>
<i>Розробник</i>		<i>Кирилідза Л.В.</i>			<i>ВСТУП</i>		<i>6</i>	<i>96</i>
<i>Керівник</i>		<i>Тетеріна С.М.</i>						
<i>Н. контр.</i>								
<i>Консильт</i>								
<i>Зав. каф.</i>		<i>Стадніков В.П.</i>						
					<i>Кафедра БТМ 6</i>			

У наш час з протипухлинних антибіотиків найбільше практичне застосування мають антрациклінові антибіотики, що відносяться до найефективніших протипухлинних засобів [3].

Протипухлинні препарати, що застосовуються для хіміотерапії, славляться своїм широким профілем побічних ефектів, який коливається від неприємних до летальних наслідків, і доксорубіцин не є винятком [4].

Антрацикліновий доксорубіцин широко використовується в хіміотерапії завдяки своїй ефективності в боротьбі з широким спектром ракових захворювань, такими як карциноми, саркоми та гематологічними видами раку [5].

Продуцентами антрациклінового антибіотику доксорубіцину можуть бути штами *Streptomyces peucetius* 33-24, *S. peucetius* SIPI-DU-1557 та *S. peucetius* SIPI-11 [6,7]. *S. peucetius* 33-24 має суттєву перевагу над іншими, оскільки виявляє найбільшу здатність до синтезу доксорубіцину (1100 мг/л) [6].

**Мета дипломного проекту** – проектування ділянки доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу (технологічна та апаратурна схеми) доксорубіцину бактеріями *S. peucetius* 33-24.

**Новизною даної роботи** є використання як біологічного агента бактеріального штаму *S. peucetius* 33-24., що характеризуються високою продуктивністю доксорубіцину (1,1 г/л), на оптимізованому середовищі з метою отримання антрациклінового антибіотика[6].

## РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

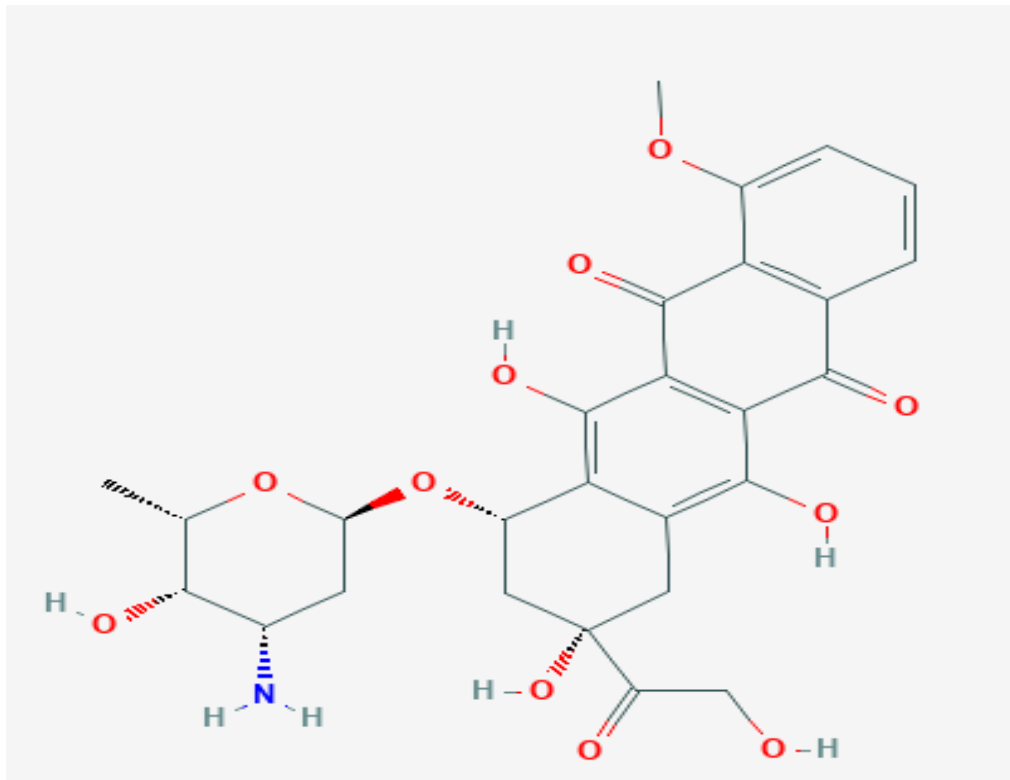
### 1.1. Загальна інформація

Доксорубіцин - високоефективний протипухлинний препарат із широким спектром дії. У 1974 році доксорубіцин був зареєстрований для клінічного застосування в США. Доксорубіцин є найбільш ефективним і найчастіше застосовується при лікуванні онкологічних захворювань [7,8].

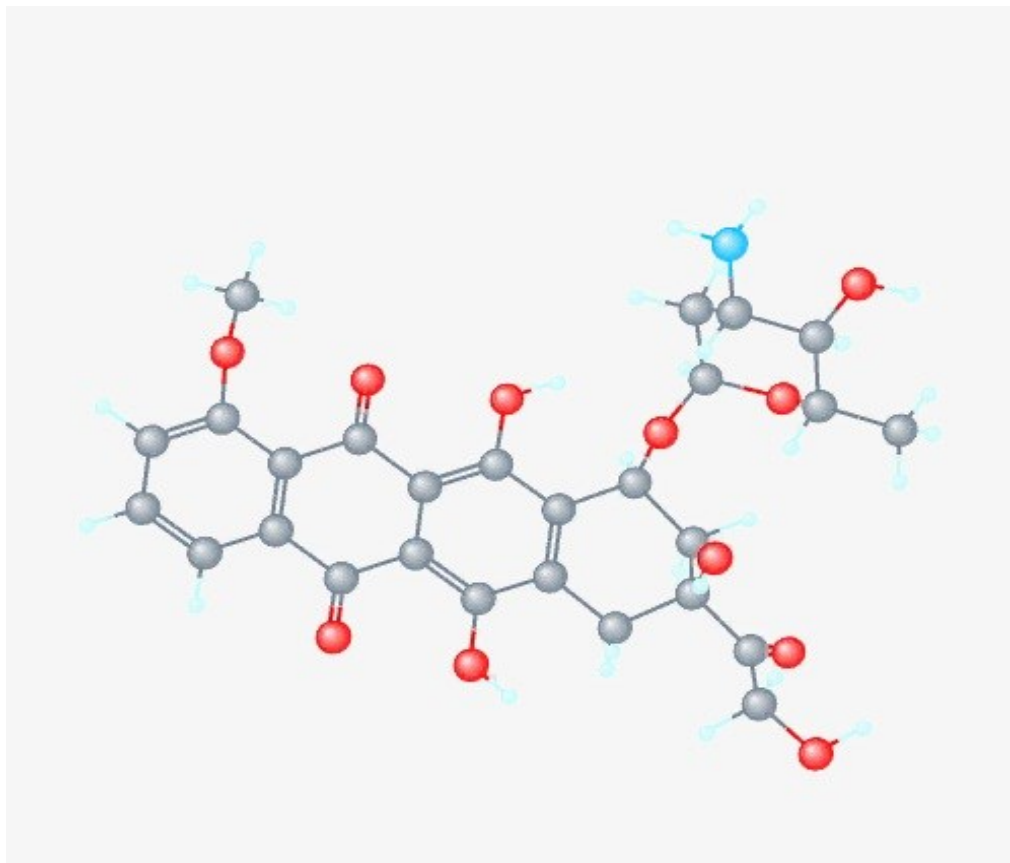
Доксорубіцин є гідрокси-похідним даунорубіцину та належить до антрациклінового ряду антибіотиків. Антрацикліни – це протипухлинні антибіотики, структура яких складається із тетрациклінового хромофора, поєданого з аміносахаридом глікозидним зв'язком. Антрацикліни є одними з найбільш важливих та найдоступніших протипухлинних препаратів. Першим представником групи антрациклінів був дауноміцин, відкритий у 1959 році. Але найбільш значимим з точки зору практичної онкології виявився препарат доксорубіцин, завдяки широкому спектру протипухлинної дії.

За структурою доксорубіцин являє собою кристалічний порошок червоного кольору, добре розчинний у воді та нерозчинний у спирті. Брутто формула:  $C_{27}H_{29}NO_{11}$ . Хімічна назва: Доксорубіцин; Адриабластин; Адриаміцин. Молекулярна маса: 543,5 г/моль [9,10].

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.1 КР ПЗ</i>			
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ</i>	<i>Літера</i>	<i>Аркш</i>	<i>Аркшів</i>
<i>Розробник</i>	<i>Кикиридзе Д.В.</i>						8	96
<i>Керівник</i>	<i>Тетеріна С.М.</i>							
<i>Н. контр</i>								
<i>Консульт</i>								
<i>Зав. каф.</i>	<i>Стадніков В.П.</i>					<i>Кафедра БТМ</i>		
								8



*Рис. 1.1. Структурна форма доксорубіцину [11].*



*Рис. 1.2 Просторова структура доксорубіцину [11].*

Торгова назва діючої речовини доксорубіцину: доксорубіцину гідрохлорид, «Адрибластин», «Доксолік», «Доксорубіцин-Тева»,

«Доксорубіцин-Амакса». Препарат має велику кількість аналогів як фармацевтичних компаній України, так і інших.

Згідно державного реєстру лікарських засобів на території України зареєстровано 10 лікарських препаратів, діючою речовиною яких є доксорубіцин.

Перелік препаратів [12]:

- ДОКСОРУБІЦИН-ТЕВА ліофілізат для розчину для інфузій по 50 мг, 1 флакон з ліофілізатом у коробці (Тева Фармацевтікал Індастріз Лтд., Ізраїль);
- ДОКСОРУБІЦИН "ЕБЕВЕ" концентрат для розчину для інфузій, 2 мг/мл по 5 мл (10 мг), по 25 мл (50 мг), по 50 мл (100 мг), по 100 мл (200 мг) у флаконі; по 1 флакону в картонній коробці (ЕБЕВЕ Фарма Гес.м.б.Х. Нфг. КГ, Австрія);
- АДРИБЛАСТИН ШВИДКОРОЗЧИННИЙ ліофілізат для розчину для інфузій по 50 мг, 1 флакон з ліофілізатом у картонній коробці (Пфайзер Інк., США)
- ДОКСОРУБІЦИН порошок для розчину для інфузій та ін'єкцій по 50 мг 1 флакон з порошком у картонній коробці (ТОВ "Тева Україна", Україна)
- ДОКСОРУБІЦИН порошок для розчину для інфузій та ін'єкцій по 10 мг 1 флакон з порошком у картонній коробці (ТОВ "Тева Україна", Україна)
- ДОКСОРУБІЦИНУ ГІДРОХЛОРИД кристалічний порошок (субстанція) у скляних контейнерах для фармацевтичного застосування (ТОВ "Юрія-Фарм", Україна).
- ДОКСОРУБІЦИН МЕДАК розчин для інфузій, 2 мг/мл по 5 мл (10 мг), 10 мл (20 мг), 25 мл (50 мг), 100 мл (200 мг) у флаконах № 1, № 5 (медак ГмбХ, Німеччина).

**Застосування доксорубіцину.**

Доксорубіцин застосовують для послаблення симптомів при ряді неопластичних патологій таких, як гостра мієлобластна лейкемія саркоми м'яких тканин і кісток, карцинома молочної залози, ходжкінська хвороба, злоякісна лімфома і бронхогенна карцинома, пухлина Вільмса, гостра лімфобластна лейкемія [13].

### **Протипоказання.**

- Гіперчутливість до доксорубіцину або інших компонентів препарату, інших антрациклінів чи антраценоїдів;
- тяжке порушення кровотворної функції кісткового мозку внаслідок попередньої хіміотерапії або променевої терапії (лейкопенія, тромбоцитопенія, анемія);
- тяжкі захворювання серцево-судинної системи (міокардит, гострий інфаркт міокарда, виражені порушення серцевого ритму);
- вагітність, період годування груддю;
- тяжкі порушення функції печінки (білірубін  $> 85,5$  мкмоль/л) та нирок;
- гострий гепатит;
- внутрішньоміхурове введення при інвазивних пухлинах, які проростають у стінку сечового міхура, інфекції сечовидільного тракту, запалення сечового міхура [10].

### **Фармакологічні властивості**

Доксорубіцин є продуктом ферментації актиноміцетів *Streptomyces peucetius* і належить до групи антрациклінових антибіотиків, що виявляють протипухлинні властивості. Він діє швидко і не вимагає метаболічної активації для продукування цитостатичної активності. Інактивується відщепленням глікозидного зв'язку. Його точний механізм дії остаточно не з'ясований. Припускаються такі механізми:

- здатність зв'язуватися з ДНК внаслідок інтеркаляції між парами нуклеотидів, що призводить до стеричних перешкод синтезу ДНК та РНК;
- утворення вільних радикалів;

- прямиий вплив на мембрану;
- пригнічення активності топоізомерази II [14].

### **Спосіб застосування та дози.**

Доксорубіцин вводять тільки внутрішньовенно. Внутрішньоміхуровий і внутрішньо артеріальний шляхи введення застосовують лише за показаннями. Внутрішньоміхуровий шлях введення доцільний в лікуванні поверхневого раку сечового міхура і для профілактики рецидиву пухлини після транс уретральної резекції. Внутрішньоартеріальний шлях введення також використовують для інтенсивного місцевого впливу з метою зменшення загальної інтоксикації.

Дозу препарату встановлюють індивідуально, залежно від характеру та фази захворювання, віку, стану хворого та гемопоетичної функції.

Препарат застосовують шляхом внутрішньовенної інфузії з 21-денним інтервалом з огляду на стан крові та кісткового мозку пацієнта. Нижча доза ( $60 \text{ мг/м}^2$ ) рекомендована пацієнтам зі зниженим резервом мозку у літньому віці або внаслідок попереднього лікування чи пухлинної інфільтрації кісткового мозку. Дозу  $60\text{--}75 \text{ мг/м}^2$  можна вводити у вигляді разової дози або розподілити на 2–3 щоденних введення.

Найпоширенішою є схема, яка передбачає внутрішньо венне введення препарату в дозі  $60 - 75 \text{ мг/м}^2$  поверхні тіла один раз через кожні 3 тижні.

Сумарна доза Доксорубіцину не повинна перебільшувати  $700 \text{ мг/м}^2$ .

Хворим з порушеннями функції нирок (гломерулярна фільтрація  $<10 \text{ мл/хв}$ ) застосовується 75 % дози.

Внутрішньоартеріальне введення. Препарат можна вводити внутрішньоартеріально з метою посилення локального впливу і зменшення системної токсичності у пацієнтів з гепатоцелюлярною карциномою. Оскільки ця техніка введення є потенційно небезпечною і може призвести до обширного некрозу перфузованої тканини, внутрішньо артеріальне введення

препарату повинно здійснюватися лише кваліфікованими спеціалістами, які мають досвід застосування цієї методики введення [10].



Рис.1.3. Товарна форма доксорубіцину: DOXOrubicin HCl Injection,USP [15].

## РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

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

Доксорубіцин (DXR), який виробляється *Streptomyces peucetius*, є важливим антибіотиком антрациклічного типу, що використовується для лікування різних видів раку. шляхом одностадійної ферментації. Продуктивність дикого штаму *S. peucetius* ATCC 27952 надзвичайно низька, вченими проводились дослідження, щодо підвищення синтезу доксорубіцину, які були зосереджені на генній інженерії [16]. Виробництво доксорубіцину було покращено за рахунок надмірного вираження відповідного структурного цукру, стійкості та регуляції генів. У *S. peucetius* – біосинтез доксорубіцину обмежується різними факторами, включаючи низьку ефективність ключових ферментів, цитотоксичність доксорубіцину та негативні регулятори, будь-який з них може брати участь у низькому синтезі доксорубіцину.

Хоча більшість попередніх досліджень вироблення доксорубіцину у *S. peucetius* були зосереджені на генній інженерії, мало спроб були зроблені для поліпшення виробництва доксорубіцину за допомогою мутагенезу та оптимізації середовища. Хоча традиційний метод покращення штаму за допомогою мутагенезу все ще відіграє важливу роль у розведенні мікроорганізмів, але це випадковий і трудомісткий процес. Ефективність традиційного розведення на основі мутацій зменшується після численних циклів мутагенезу. Нещодавно нова технологія мутагенезу мікроорганізмів ARTP (атмосферна плазма кімнатної температури) (ARTP), була розроблена з метою підвищення врожайності промислової продукції [6].

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.31 КР ПЗ</i>			
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розробник</i>		<i>Кичирідза Д.В.</i>			<i>РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІО-ЛОГІЧНОГО АГЕНТА</i>	<i>Літера</i>	<i>Аркш</i>	<i>Аркшів</i>
<i>Керівник</i>		<i>Тетеріна С.М.</i>					14	96
<i>Н. конта</i>						<i>Кафедра БТМ 14</i>		
<i>Консильт</i>								
<i>Зав. каф.</i>		<i>Стадніков В.П.</i>						

## 2.2. Мутація штаму

Як зазначалось вище, проблемою синтезу доксорубіцину була низька концентрація. Тому вчені проводили різні досліді, які були присвячені підвищенню виходу антибіотика. У дослідженні Сяору Вонга та його співавторів було досліджено вплив ультрафіолетового випромінення та впливу ARTP на мутації вихідного штаму *S. peucetius* SIPI-11, після чого проводили поетапний обрахунок на планшетах, що містить доксорубіцин. Крім того, ферментаційне середовище було оптимізовано для подальшого посилення синтезу доксорубіцину.

Для УФ-опромінення 2 мл суспензії міцелія *S. peucetius* отриманій із скошеної культури, перенесли на асептичну пластинку і піддали дії УФ опромінення протягом 2 хв на відстані 30 см від УФ лампи (довжина хвилі 254 нм, потужність 30 Вт), а потім розбавили і висіяли на агарову пластину. Робочі параметри були такими: робоча радіочастотна вхідна потужність становила 100 Вт, потік чистого гелієвого газу становив 10 літрів за хвилину (lpm), ефективна відстань становила 2 мм, а час впливу плазми становив 30–70 с. Позитивну частоту мутації обчислювали, використовуючи таке рівняння:

$$\left(\frac{P}{M}\right) \times 100\%$$

де М - загальний CFU (одиниці, що утворюють колонії) мутантних штамів і Р – CFU мутантів з вищим виходом доксорубіцину, ніж початковий штам [6].

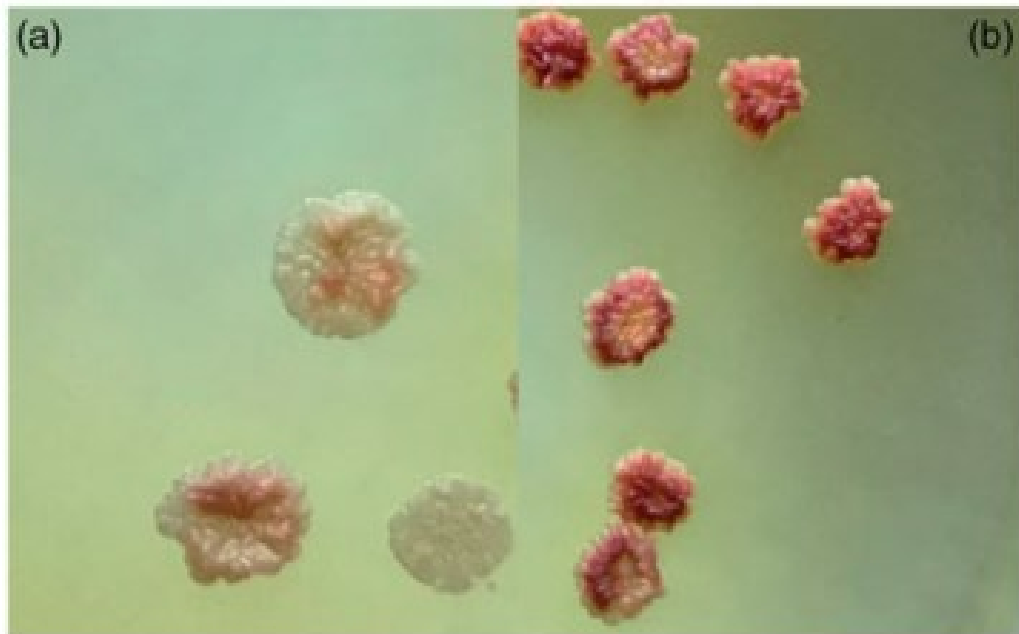


Рис.2.1. Морфологія колоній (а) вихідний штам (*S. peucetius* SIPI-11) (b) високопродуктивний мутант (*S. peucetius* 33-24).

З метою вибору найбільш перспективного біологічного агента для синтезу доксорубіцину були проведенні порівняння відомих на сьогодні штамів продуцентів. Узагальнені дані щодо синтезу доксорубіцину різними біологічними агентами, наведені у табл. 2.1. Аналізуючи приведені дані, можна зробити висновок, що найбільшу кількість доксорубіцину синтезують *S. peucetius* 33-24 (1100 мг/л), *S. peucetius* SIPI-11 (160 мг/л) та *S. peucetius* SIPI-DU-1557(535 мг/л), проте тривалість культивування штамів і склад поживних середовищ є різним. Тому на наступному етапі вибору біологічного агента слід розрахувати вартість поживних середовищ для культивування обраних продуцентів доксорубіцину (табл. 2.2).

Як видно з даних, наведених у табл. 2.2, середовище для культивування *S. peucetius* 33-24 дешевше, ніж для *S. peucetius* SIPI-11, але дорожче ніж для *S. peucetius* SIPI-DU-1557 відповідно. Проте тривалість культивування штамів *S. peucetius* SIPI-11 і *S. peucetius* SIPI-DU-1557 є нижчою, ніж *S. peucetius* 33-24.

Особливості одержання доксорубіцину на суміші ростових субстратів

Таблиця 2.1

Біологічний агент	Склад поживного середовища:		Тривалість культивування, год	Концентрація доксорубіцину, мг/л	Особливості процесу біосинтезу	Використана література
	компонент	концентрація, г/л				
1	2	3	4	5	6	7
<i>Streptomyces peucetius</i> 33-24	Мальтодекстрин Дріжджовий екстракт NaCl CaCO <sub>3</sub>	150 35 2 3	144	1100	<i>S. peucetius</i> 33-24 культивували в 100 мл посівного середовища при 28 °C у 750 мл колбах на струшуючому інкубаторі при 220 об / хв. Через 40 год 200 мл середовища для висіву перенесли у ферментатор на 5 л, що містить 2 л ферментаційного середовища. Температура культури та початковий рН становили 28 °C та 6.2 відповідно. Швидкість аерації була встановлена на рівні 1 об. / Хв (об'єм повітря / об'єм культури / хв).	Wang, Xiaoru; Tian, Xiaorong; Wu, Yuanjie; Shen, Xiaofang; Yang, Songbai; Chen, Shaoxin (2018). <i>Enhanced doxorubicin production by &lt;i&gt;Streptomyces peucetius&lt;/i&gt; using a combination of classical strain mutation and medium optimization. Preparative Biochemistry and Biotechnology</i> , (), 1–8. doi:10.1080/10826068.2018.1466156
<i>Streptomyces peucetius</i> SIPI-11	Соева олія Соева макуха NaCl CaCO <sub>3</sub>	80 30 2 3	144	160	<i>S. peucetius</i> SIPI-11 вирощували на скошеному середовищі при 28 °C протягом 7 днів, а потім посіяли у 250-мл колбу, яка вміщує 20 мл посівного середовища. Колби ставили на роторний шейкер при 220 об / хв і 28 °C протягом 2 днів. Потім, 2,5 мл інокуляту, перенесли в 250-мл колбу, що містить 25 мл ферментаційного середовища, і інкубували при 28 °C і 220 об / хв протягом 7 днів.	Wang, Xiaoru; Tian, Xiaorong; Wu, Yuanjie; Shen, Xiaofang; Yang, Songbai; Chen, Shaoxin (2018). <i>Enhanced doxorubicin production by &lt;i&gt;Streptomyces peucetius&lt;/i&gt; using a combination of classical strain mutation and medium optimization. Preparative Biochemistry and Biotechnology</i> , (), 1–8. doi:10.1080/10826068.2018.1466156

<p><i>Streptomyces peucetius</i> SIPI-DU-1557</p>	<p>Мальтодекстрин Дріжджовий екстракт NaCl CaCO<sub>3</sub> CaCl<sub>2</sub></p>	<p>120 30 2 3 3</p>	<p>84</p>	<p>535</p>	<p>Для одержання доксорубіцину у 5-літровому ферментері штам культивували у 100 мл насіннєвого середовища при 28 ° С у 750-мл колбах у струшуючому інкубаторі при 220 об / хв. Через 40 год 100 мл насіннєвого середовища переносили у 5-літровий ферментер що містить 2 л ферментаційного середовища. Культуру вирощували при 28°C і розчиненому рівні кисню підтримували на рівні понад 20% через аерацію в 1 об. (об'єм повітря на об'єм на хвилину) та різну швидкість перемішування</p>	<p>X Wang, X Tian, X Shen, Y Wu, S Yang and S Chen Enhanced One-Step Fermentative Production of Epirubicin by Combination of Mutagenesis and Genetic Engineering in Doxorubicin-Producing <i>Streptomyces peucetius</i>// J Microbiol and Biotechnol. – 2018. – Vol. 7. – P. 22-30.</p>
---	--	-------------------------------------	-----------	------------	--	---

**Вартість поживних середовищ для культивування продуцентів  
доксорубіцину**

Продуцент	Компонент поживного середовища	Концентрація у ПС, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації (1, 2, 3) *
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>
<i>S. peucetius</i> 33-24	Мальтодекстрин	150	31	4,65	1
	Дріжджовий екстракт	35	1100	38,5	2
	NaCl	2	10	0,02	3
	CaCO <sub>3</sub>	3	30	0,09	4
<b>Вартість 1 л середовища – 43,26 грн</b>					
<i>S. peucetius</i> SIPI-11	Соева олія	80	49	3,92	5
	Соева макуха	30	17	0,51	6
	NaCl	2	10	0,02	3
	CaCO <sub>3</sub>	3	30	0,09	4
<b>Вартість 1 л середовища – 4,52 грн</b>					
<i>S. peucetius</i> SIPI-DU-1557	Мальтодекстрин	120	31	3,72	1
	Дріжджовий екстракт	30	1100	33	2
	NaCl	2	10	0,02	3
	CaCl <sub>2</sub>	3	40	0,12	1
	CaCO <sub>3</sub>	3	30	0,09	4
<b>Вартість 1 л середовища – 36,95 грн</b>					

**Примітка.** \* – Ціни наведено станом на лютий 2021 р.

1. - <https://prom.ua/ua/p513471323-maltodekstrin.html>;
2. - <https://prom.ua/p1086437845-ekstrakt-drozhzhej.html>;
3. - <https://produktoff.ua/bakaleya-2/sakhar-sol-soda-29>;
4. <https://prom.ua/ua/p1304643309-krejda-poroshkova-mel.html?>;
5. <https://prom.ua/ua/p1389851638-soevoe-maslo.html>;
6. <https://prom.ua/ua/p788269897-soevyj-zhmyh-shrot.html?&primelead=MC40Mw>;
7. <https://prom.ua/ua/p1276893456-kaltsij-hloristyj-hlorid.html?&primelead=My41MQ>.

**Умовна вартість 1 г доксорубіцину, синтезованого на різних поживних середовищах**

Біологічний агент	Концентрація доксорубіцину, мг/л	Тривалість культивування, год	Кількість утвореного доксорубіцину за годину, мг/год	Вартість 1 л середовища, грн/л	Умовна вартість 1 мг цільового продукту, грн/мг
1	2	3	4	5	6
<i>S. peucetius</i> 33-24	1100	144	7,64	43,26	0,039
<i>S. peucetius</i> SIPI-11	160	144	1,1	4,52	0,028
<i>S. peucetius</i> SIPI-DU-1557	535	84	6,37	36,95	0,069

Для остаточного вибору найефективнішого біологічного агента розрахуємо умовну вартість 1 г цільового продукту (табл. 2.3). Дані, наведені у табл. 2.3, свідчать, що кількість утвореного доксорубіцину за 1 год є найвищою у *S. peucetius* 33-24 (7.64 мг/год).

Отже, після проведення порівняльної характеристики штамів очевидно, що показники синтезу та тривалості процесу культивування відрізняються в

чотирьох продуцентів. Вищий вихід продукту з вищою тривалістю культивування має штам *S. peucetius* 33-24.

### 2.3. Розрахунок складу поживного середовища

*Розрахунок вмісту в середовищі джерела вуглецевого живлення*

*Потреби для синтезу доксорубіцину.* Як джерело вуглецю для одержання доксорубіцину використовується мальтодекстрин.

Розрахуємо, скільки Карбону (за елементом С) міститься в 1,1 г/л доксорубіцину. Молекулярна маса доксорубіцину (C<sub>27</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>11</sub>) становить 543. Отже, у 543 г доксорубіцину міститься 324 г Карбону, а в 1,1 г доксорубіцину  $(543 \times 1,1) / 324 = 1,84$  г Карбону.

Далі розрахуємо, у скількох грамах вуглеводів міститься 1,84 г Карбону, враховуючи, що вміст Карбону у вуглеводі (мальтодекстрин) становить 50 %. Враховуючи, що при вирощуванні мікроорганізмів на вуглеводах (мальтодекстрин) близько 40% субстрату окислюється до CO<sub>2</sub> для одержання енергії, необхідної для конструктивного метаболізму, вміст мальтодекстрину у середовищі становитиме  $(1,84 \times 0,4) + 1,84 = 2,6$  г/л.

*Потреби для синтезу біомаси.* У біомасі міститься 50% Карбону, отже вміст Карбону у 35 г біомаси становить  $35 \times 0,5 = 17,5$  г. Ця кількість Карбону міститься у  $(17,5 \times 1,1) / 0,55 = 35$ .

Враховуючи, що 40% втрат субстрату йде на «холосте окиснювання», для одержання 35 г/л біомаси у середовище необхідно внести  $(35 \times 0,4) + 35 = 49$  г/л мальтодекстрину.

Отже, загальний вміст мальтодекстрину у середовищі, необхідний для синтезу біомаси (35 г/л) та доксорубіцину (1,1 г/л), становить 51,6 г/л.

**Склад поживного середовища для культивування продуцента гелану**

<b>Компоненти поживного середовища</b>	<b>Вміст, г/л</b>
Мальтодекстрин	150
Дріжджовий екстракт	35
NaCl	2
CaCO <sub>3</sub>	3

**2.4. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента**

У актиноміцетів *Streptomyces peucetius* 33-24 вегетативний лимонно-жовтий міцелій у молодих клітинах, пізніше переходячи в жовто-оранжевий і стає червоно-коричневим при старінні. Насправді, що стосується кольору вегетативного міцелію, то є колонії, які взагалі не мають пігменту, а також спостерігаються інші, що мають насичено-червоний, малиновий, фіолетовий колір. При фарбуванні за Грамом клітини набувають фіолетового кольору, а значить є грам-позитивними бактеріями [17].



Рис. 2.2. Колонії *S. peucetius* на агаризованому середовищі [18].

*S. peucetius* 33-24 є аеробом, здатним до росту і розмноження за оптимальної температури 28 °С (мезофіл). Бактерії здатні рости при рН 5,2 – 7,0, оптимальний рН 6,2 (ацидофіл) [18].

### 2.5. Таксономічний статус

Сучасна (філогенетична) класифікація для *S. peucetius* наведена згідно LPSN - List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature [19].

Домен – *Bacteria*

Тип – *Actinobacteria*

Клас – *Actinobacteria*

Порядок – *Streptomycetales*

Родина

–

*Streptomycetaceae*

Рід – *Streptomyces*

Вид – *Streptomyces peucetius*

## РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

### 3.1. Потреби населення України у доксорубіцині для лікування злюкисних пухлин

Згідно Центру медичної статистики МОЗ України загальна кількість зареєстрованих хворих із злюкисними новоутвореннями за 2020 рік становить 109 744 людини. Серед чоловіків кількість зареєстрованих хворих на злюкисні новоутворення складає 52335 людини, серед жінок – 57409.

Сьогодні в Україні проживає майже 1040137 осіб, уражених онкологічними хворобами. За прогнозом, до 2024 року кількість тих, хто вперше захворів на рак, може досягти 200 тисяч на рік, а загальна кількість онкохворих значно перевищить 1 млн [20].

Наслідки онкологічних захворювань виходять далеко за межі медичної проблеми і негативно впливають на соціальний та економічний розвиток країни. Економічні втрати суспільства від раку зумовлені витратами на проведення профілактичних і реабілітаційних заходів, високою вартістю сучасних методів протипухлинної терапії [21].

Звіт про захворюваність на злюкисні новоутворення за локалізацією станом за 2020 рік [20]

Таблиця 3.1

Злюкисні новоутворення	Всього зареєстровано захворювань	
	Чоловіки	Жінки
Україна	52335	57409
Ар Крим	0	0
Вінницька	2185	2177
Волинська	1273	1312

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.31 КР ПЗ</i>			
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО- ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ</i>	<i>Літера</i>	<i>Аркш</i>	<i>Аркшів</i>
<i>Розробник</i>	<i>Кикиридзе Л.В.</i>						25	96
<i>Керівник</i>	<i>Тетеріна С.М.</i>					<i>Кафедра БТМ 25</i>		
<i>Н. кантр</i>								
<i>Консильт</i>								
<i>Зав. каф.</i>	<i>Стадніков В.П.</i>							

Продовження табл.3.1

Дніпропетровська	4303	5412
Донецька	2120	2522
Житомирська	1475	1633
Закарпатська	1178	1116
Запорізька	2429	2710
Івано-Франківська	1887	1684
Київська	2368	2816
Кіровоградська	1787	1855
Луганська	938	1038
Львівська	3463	3576
Миколаївська	1688	1831
Одеська	2469	2825
Полтавська	2052	2209
Рівненська	1256	1327
Сумська	1782	1851
Тернопільська	1431	1321
Харківська	4052	4315
Херсонська	1720	1886
Хмельницька	1977	2021
Черкаська	1825	2072
Чернівецька	915	807
Чернігівська	1639	1725
м. Київ	4123	5368

Серед загального числа зареєстрованих онкологічних захворювань важливо знати розподіл кількості хворих між різними видами злоякісних новоутворень. В таблиці 3.2 наведена детальна інформація про кожний вид злоякісних новоутворень

**Звіт про захворюваність на злоякісні новоутворення за статтю,  
станом за 2020 рік [20]**

Таблиця 3.2

<b>Злоякісні новоутворення:</b>	<b>Чоловіки</b> (загальна кількість по Україні)	<b>Жінки</b> (загальна кількість по Україні)
губи	255	108
ротової порожнини	1516	410
органів травлення	15272	12284
печінки та внутріпечінкових жовчних протоків	875	577
жовчного міхура	302	485
підшлункової залози	2068	1901
органів дихання та грудної клітини	9956	2347
кісток та суглобових хрящів	147	122
сполучної та інших тканин	311	311
меланоми шкіри	983	1321
інші новоутворення шкіри	4287	5791
молочної залози	86	12213
статевих органів	6586	12948
сечових органів	5131	2293
ока та його придатків	83	78
нервової системи	897	790
головного мозку	865	750
щитовидної залози	472	1981
Хвороба Ходжкіна	309	368
Неходжкінські лімфоми	965	892
Лімфолейкоз	582	463
Мієлолейкоз	332	363

У чоловіків найбільш частіше діагностують рак легенів, рак товстого кишечника, шлунку, передміхурової залози, порожнини рота і ротоглотки, у жінок - рак молочної залози, товстого кишечника, шлунку, легень, шийки матки.

Очевидною є актуальність розробки методів боротьби з онкологічними захворюваннями в Україні та вдосконалення існуючих методик та технологій.

Застосування протипухлинних засобів при певних формах пухлин сприяє видужанню або значному подовженню життя хворого. В основі дії цих засобів лежить пригнічення прискороного розмноження або руйнування пухлинних клітин. Протипухлинні засоби, як правило, мають широкий спектр дії, наприклад похідні нітрозосечовини застосовують при лімфомах, мієломі, гострій формі лейкемії, раку, метастазах у тканинах мозку. Більшість протипухлинних препаратів загалом мають токсичну дію і на здорові клітини та тканини організму, тобто так звана низька селективна дія. Наприклад, алкілюючі речовини та інші, водночас спричинюють пригнічення кровотворення, облісіння, нудоту, блювання, кровотечу тощо. Протипухлинні засоби поряд з хірургічними методами лікування та методами променевої терапії займають важливе місце в практиці онкології.

Протипухлинні препарати, які отримали практичне застосування в онкології, прийнято ділити на наступні групи:

- 1) гормональні препарати (статеві гормони, кортикостероїди);
- 2) алкілюючі агенти - хлоретиаміни (ембіхін, новембіхін, сарколізин, допа, дегранол, новембітол, хлорбутин, циклофосфан), етиленімін (тіофосфамід, діпін, тіодипін, спиразидин, бензотеф, фторбензотеф), метансульфоніди (міелосан), епоксиди;
- 3) антиметаболіти – антагоністи пурину (6-меркаптопурин), антагоністи піримідину (5-фторурацил), антагоністи фолієвої кислоти (метотрексат);
- 4) речовини рослинного походження – винка-алкалоїди (вінбластин, вінкрестин), колхамін;
- 5) протипухлинні антибіотики (доксорубіцин, адриаміцин, олівоміцин, рубоміцин тощо);

б) інші препарати (натулан, ортопара ДДД) [21].

Препарати групи протипухлинних антибіотиків різні як за хімічною будовою, так і за механізмом протипухлинної дії. На відміну від протимікробних антибіотиків, їм властива висока токсичність для людини. Щороку до клінічної практики впроваджуються нові протипухлинні антибіотики, які дають змогу розширити спектр їх застосування.

Протипухлинні антибіотики класифікують на:

- актиноміцини (дактиноміцин, мітоміцин, блеоміцин, стрептозоцин);
- антрацикліни (доксорубіцин, мітоксантрон, епірубіцин, рубоміцин, карміноміцин).

Багато цитотоксичних антибіотиків мають радіоміметичну активність, тому їх слід поєднувати з променевою терапією [21]

Виходячи з того, що антрацикліни є одними з найбільш важливих та найдоступніших протипухлинних препаратів, а доксорубіцин є одним з найпоширеніших антибіотиків даного ряду, актуальним є питання дослідження фармацевтичного ринку України та можливого виробництва даного антибіотику.

Готовий продукт являє собою субстанцію доксорубіцину, яка використовується в фармакологічній промисловості. Може бути додатково очищений або простерилізований, оскільки отриманий за даною технологією препарат не є стерильним. При додаванні допоміжних речовин, можна створити лікарський препарат, для парентерального введення, що володіє широким спектром протипухлинної дії і може використовуватися для хіміотерапії багатьох форм онкологічних захворювань. Готова продукція має рівень очистки в 98%, при 4% вологості [22]

### 3.2. Розрахунок потужності виробництва

Загальна кількість зареєстрованих хворих із злоякісними новоутвореннями згідно даних Інституту Раку за 2020 рік становить 1040137 чоловік. Щорічний приріст кількості хворих з онкологічними захворюваннями складає 1%. Отже, станом на 2021 рік кількість хворих складатиме:  $1040137 \text{ чоловік} + 1\% = 1050538 \text{ чоловік}$ .

Кількість хворих з злоякісними новоутвореннями в залежності від статі складає: 47% чоловіки, 53% жінки. Отже приймаємо, що в залежності від статі розподіл хворих приблизно однаковий.

Згідно схеми лікування препарат вводиться пацієнту ад'ювантно 4 курси в кількості 60-75 мг/м<sup>2</sup> по 2-3 введення. Обираємо дозу терапії 70 мг/м<sup>2</sup>. Розраховуємо кількість препарату для лікування хворого  $70 \text{ мг/м}^2 \times 4 \text{ курси} \times 2 \text{ введення}$ , отримаємо 560 мг/м<sup>2</sup>.

При виборі схеми лікування, згідно даних Держкомстату України хіміотерапію обирає 51% хворих. Отже, проводимо розрахунок кількості доксорубіцину для лікування всіх пацієнтів, що обирають хіміотерапевтичну схему лікування:  $1050538 \text{ чоловік} - 100\% \text{ хворих}; 51\% - X\%$ .  $X\% = 1050538 \text{ чоловік} \times \% / 100\% = 535774 \text{ людини}$ .

При розрахунку річної потреби не варто забувати, що на ринку України є інші препарати наділені протипухлинними властивостями. Однак, згідно Наказів Міністерства охорони здоров'я про лікування раку молочної залози, раку легенів, раку яєчка та інших, доксорубіцин внесено в протоколи лікування. Також важливим фактом є те, що для отримання більш високого ефекту терапії застосовуються комбіновані схеми лікування доксорубіцином. З огляду на це важливо дослідити схеми лікування різних видів злоякісних новоутворень [23, 24, 25]. Також важливим фактом є те, що для отримання більш високого ефекту терапії застосовуються комбіновані схеми лікування доксорубіцином. З огляду на це важливо дослідити схеми лікування різних видів злоякісних новоутворень.

## Схеми медикаментозного лікування при різних видах злоякісних новоутворень

Таблиця 3.3

Вид злоякісних новоутворень	Схеми медикаментозного лікування та дозування препаратів	Особливості використання
Рак молочної залози	Доксорубіцин – 60 мг/м <sup>2</sup> в/в, 1 день; Циклофосфамід – 600 мг/м <sup>2</sup> в/в, 1 день.	Інтервал між курсами 21 день; ад'ювантно 4 курси
	Доксорубіцин 50-60 мг/м <sup>2</sup> в/в, 1 день; Паклітаксел 175-200 мг/м <sup>2</sup> в/в, 1 день.	Інтервал між курсами 21 день;
	Доксорубіцин 50-60 мг/м <sup>2</sup> в/в, 1 день; Доцетаксел 75 мг/м <sup>2</sup> в/в, 1 день.	Інтервал між курсами 21 день, до 8 курсів; Доксорубіцин вводиться протягом 15 хв. інфузії, доцетаксел вводиться на протязі 1-годинної інфузії
	Гемцитабін 1000 мг/м <sup>2</sup> в/в 1, 8 дні; Доцетаксел 75 мг/м <sup>2</sup> в/в, 1 день.	Інфузія протягом 30 хв. Інфузія протягом 1 години Вводять кожні 3 тижні. Рекоменується для лікування хворих метастатичним РГЗ, які попередньо отримували антрацикліни.
Рак легенів	Циклофосфамід 1000 г/м <sup>2</sup> 1 день Доксорубіцин 45 мг/м <sup>2</sup> 1 день Етопозид 100 мг/м <sup>2</sup>	Кожні 3 тижні
Остеосаркома	Цисплатин – 60 мг/м <sup>2</sup> x 2 дні протягом 4-8 годин ї - 1,2-й день  Доксорубіцин – 35 мг/м <sup>2</sup> x2 дні в/в протягом 4 годин - 3,4 день	Наступний курс розпочинається на 22-й день

Згідно даних, наведених в *Таблиці 1.3* можна побачити, що доксорубіцин внесено в протоколи лікування найбільш поширених видів злоякісних захворювань, переважно в комплексі з ще одним протипухлинним препаратом. Тому на потребу в доксорубіцині виділено 50% від загальної

потреби в хіміотерапевтичних препаратах. Отже при розрахунку потреби в цільовому продукті на загальну кількість хворих отримуємо  $535774 \text{ людини} / 2 = 267887 \text{ людини}$ .

Середня площа тіла чоловіків складає  $1,95 \text{ м}^2$ , а жінок -  $1,8 \text{ м}^2$ , а співвідношення кількості хворих чоловіків до жінок 1:1, ми отримаємо, що середня площа поверхні тіла пацієнта  $(1,95+1,8)/2 = 1,875 \text{ м}^2$ .

Якщо середня поверхня тіла хворого  $1,875 \text{ м}^2$ , а пацієнтів всього 267887 і на лікування одного за курс витрачається  $560 \text{ мг/м}^2$  препарату, то для проходження повних курсів лікування всіх осіб необхідно  $1,875 \text{ м}^2 \times 267887 \text{ людини} \times 560 \text{ мг/м}^2 = 281281350 \text{ мг} = 281 \text{ кг}$  доксорубіцину. На ринку України на даний момент зареєстровано 7 препаратів, діючою речовиною яких є доксорубіцин 3 них 2 препарата виробляються вітчизняним виробником. Зважаючи на економічну складову препаратів в лікуванні онкологічних захворювань. Оскільки виробництво в Україні ведеться повністю на закупленій субстанції, то доцільним є впровадження виробництва данної субстанції на території України. Отже на забезпечення ринку України в доксорубіцину виділяємо  $\approx 30\%$  від загальної потреби:  $281 \text{ кг} \times 0,3 = 84,3 \text{ кг}$  (84384405 мг) доксорубіцину.

Оскільки продуцент – *Streptomyces peucetius* 33-24 синтезує 1100 мг доксорубіцину на 1 л культуральної рідини, тому для отримання 84,3 кг антибіотику потрібен такий об'єм культуральної рідини:

$$\begin{array}{l} 1100 \text{ мг} - 1 \text{ л} \\ 84384405 \text{ мг} - X \end{array} \quad X = 76713 \text{ л}$$

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

$$V_{\text{кр.}} = 76713 / (1-0,4) = 127855 \text{ л або } 127,8 \text{ м}^3$$

### **3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера для біосинтезу антибіотика доксорубіцину**

Приймаємо кількість робочих трудоднів (Трд) 300, тоді кількість продукту на добу (Vд) становитиме:

$$V_d = V_{гп} / T_{рд} = 127,8 / 300 = 0,426 \text{ м}^3.$$

Кількість продукту за цикл ( $V_{кр}$ ) буде становити:

$$V_{кр} = (K_1 \cdot V_d \cdot T_{цф}) / 24 = (1,1 \cdot 0,426 \cdot 152) / 24 = 2,96 \text{ м}^3/\text{цикл},$$

Кількість циклів

$$N_{цк} = 24 \cdot T_{рд} / T_{цф} = 24 \cdot 300 / 152 = 47 \text{ циклів},$$

де  $T_{цф}$  – цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу (144 год) та час підготовки ферментера до роботи (8 год).  $K_1$  – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій ( $K_1 = 1,1 - 1,5$ ).

Підготовка ферментера включає: миття та огляд апарата (1,5 год), перевірка на герметичність (0,5 год), підігрів (0,5 год), стерилізація апарату (1 год), охолодження (1 год), завантаження середовища (2 год), засів (0,5 год), вивантаження культуральної рідини (1 год).

Об'єм КР за цикл

$$V_{кр} = K_1 \times G_{ц} \times CP / (P_{кр} \times (1 - E_{гп})) = 1,1 \cdot 1,8 \cdot 0,90 / (1,1 \cdot (1 - 0,4)) = 2,7 \text{ м}^3$$

де  $K_1$  – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій ( $K_1 = 1,1 - 1,5$ ).

$$\text{Робочий об'єм ферментера } V_{рф} = V_{кр} / (1 - E_{ф}) = 2,7 / (1 - 0,1) = 3 \text{ м}^3$$

Можливий геометричний об'єм ферментера при  $K_3 = 0,6$

$$V_{мф} = V_{рф} / K_3 = 3 / 0,6 = 5 \text{ м}^3$$

У таблиці (див. додаток 4) знаходимо найближчий за геометричним об'ємом ферментер  $V_{ф} = 5 \text{ м}^3$ .

Уточнюємо  $K_3 = V_{рф} / V_{ф} = 2,7 / 5 = 0,54$ , що відповідає визначеним межам (0,5-0,65)

### 3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для біосинтезу антибіотика доксорубіцину *Streptomyces peucetius* 33-24

За виробничий цикл отримують  $V_{кр} = 2,7 \text{ м}^3$  культуральної рідини.

При одержанні культуральної рідини потрібно врахувати її втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 до 15%.

Отже, кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом становитиме:

$V_{роб.1} = V_{кр} / (1 - Eф) = 2,7 / (1 - 0,1) = 3 \text{ м}^3$ , де  $Eф$  – втрати культуральної рідини під час біосинтезу.

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

При обраному коефіцієнті заповнення  $K_{зап}$  розраховують можливий геометричний об'єм ферментатора ( $Vф$ ), що становить  $Vф = V_{роб.1} / K_{зап} = 3 / 0,6 = 5 \text{ м}^3$ .

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер  $V_{сф} = 5 \text{ м}^3$  (див. додаток 4), та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{зап1} = V_{роб.1} / V_{сф} = 3 / 1 = 3.$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах, отже геометричний об'єм ферментера обрано правильно.

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

Тоді кількість поживного середовища у ферментері буде складати:

$V_{пс1} = V_{роб.1} / (1 + Xф) = 3 / (1 + 0,1) = 2,7 \text{ м}^3$ , де  $Xф = 0,1$  – доза посівного матеріалу для ферментера.

Кількість посівного матеріалу становить  $V_{пм1} = V_{роб.1} - V_{пс1} = 3 - 2,7 = 0,3 \text{ м}^3$  або 300 л.

Для одержання 300 л інокуляту в посівному апараті враховуємо втрати у результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 до 15%.

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

$$V_{роб.2} = V_{пм1} / (1 - E_{па}) = 300 / (1 - 0,1) = 333 \text{ л.}$$

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

Тоді кількість поживного середовища у посівному апараті буде складати:

$V_{пс2} = V_{роб.2} / (1 + X_{па}) = 333 / (1 + 0,1) = 303 \text{ л}$ , де  $X_{па} = 0,1$  – доза інокуляту для посівного апарату.

Кількість посівного матеріалу для посівного апарату становить  $V_{пм2} = V_{роб.2} - V_{пс2} = 333 - 303 = 30 \text{ л}$ .

Кількість інокуляту  $V_{роб.2} = 333 \text{ л}$  можна одержати під час культивування бактерій у посівному апараті з геометричним об'ємом  $V_{па2} = V_{роб.2} / K_{зап} = 333 / 0,6 = 555 \text{ л}$ . Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний інокулятор  $V_{сф} = 600 \text{ л}$  (див. додаток 4), та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{зап2} = V_{роб.2} / V_{сф} = 333 / 600 = 0,55.$$

Для одержання 3,3 л інокуляту в інокуляторі враховуємо втрати у результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 до 15%.

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

$$V_{роб.3} = V_{пм2} / (1 - E_{ін}) = 30 / (1 - 0,1) = 33,3 \text{ л.}$$

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

Тоді кількість поживного середовища у посівному апараті буде складати:

$V_{пс3} = V_{роб.3} / (1 + X_{ін}) = 33,3 / (1 + 0,1) = 30 \text{ л}$ , де  $X_{ін} = 0,1$  – доза інокуляту для посівного апарату.

Кількість посівного матеріалу для посівного апарату становить  $V_{пм3} = V_{роб.3} - V_{пс3} = 33,3 - 30 = 3,3$  л.

Кількість інокуляту  $V_{роб.3} = 33,3$  л можна одержати під час культивування бактерій в інокуляторі з геометричним об'ємом  $V_{ін3} = V_{роб.3} / K_{зап} = 33,3 / 0,6 = 55$  л. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний інокулятор  $V_{сф} = 60$  л (див. додаток 4), та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{зап3} = V_{роб.3} / V_{сф} = 33,3 / 60 = 0,55.$$

Кількість інокуляту для засіву малого інокулятора  $V_{пм3} = 3,3$  л можна одержати культивуванням бактерій у колбах на качалці. Для цього використовують качалочні колби об'ємом  $V_{колб} = 2000$  мл та коефіцієнтом заповнення  $K_{зк} = 0,2$ .

Тоді кількість колб для отримання посівного матеріалу становитиме:

$$N_{колб} = V_{пм4} / (V_{колб} \cdot K_{зк}) = 3300 / (2000 \cdot 0,2) = 8$$

Таким чином, для одержання посівного матеріалу необхідно 8 качалочних колб.

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу доксорубіцину у ферментері об'ємом  $5 \text{ м}^3$  з коефіцієнтом заповнення (0,6) буде проходити у 4 етапи.

Таким чином, за результатами розрахунків для біосинтезу доксорубіцину *S. peucetius* 33-24 приймаємо до встановлення один ферментер об'ємом  $5 \text{ м}^3$ , інокулятори об'ємом 600 л та 60 л.

## РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

### 4.1. Шлях катаболізму ростового субстрату біологічним агентом

Ростовим субстратом для біосинтезу доксорубіцину за допомогою *Streptomyces peucetius* 33-24 є мальтодекстрин [6].

Так як, у Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) [26] відсутня інформація про шляхи катаболізму ростового субстрату у штаму *Streptomyces peucetius* 33-24, тому для побудови шляху метаболізму доксорубіцину обираємо близькоспоріднені мікроорганізми *Streptomyces coelicolor* [26]

Згідно з KEGG катаболізм доксорубіцину у *S. coelicolor* [27] відбувається шляхом перетворення ростового субстрату у Мальтозу, який згодом перетворюється у Мальтоза-1-фосфат за допомогою ферменту мальтокіназа ( КФ. 2.7.1.175). Мальтоза-1-фосфат перетворюється у  $\alpha$ -D – Глюкоза – 1-фосфат за допомогою  $\alpha$ -1,4-глюкан-мальтозо-1-фосфат-мальтозилтрансфераза ( КФ. 2.499.16 ).

Згідно з KEGG подальший метаболізм у *S. coelicolor* [28] проходить із залученням і  $\alpha$ -D – Глюкоза – 1-фосфат до гліколізу і перетворенням рядом реакцій його на фосфоенолпіруват (ФЕП), а ФЕП у свою чергу перетворюється за допомогою піруваткінази (КФ 2.7.1.40) на піруват, який згодом під дією фередоксин оксидоредуктази (КФ 1.2.7.11) перетворюється на ацетил-КоА.

Схему катаболізму мальтодекстрину наведено на Рис. 4.1 [28, 29].

					НУХТ БТЕК 04.01.31 КР ПЗ			
Зм	Арк.	№ документа	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	Літера	Аркш	Аркшів
Розробник		Кичирідза Л.В.					37	96
Керівник		Тетеріна С.М.						
Н. контр								
Консильт								
Зав. каф.		Стадніков В.П.						
						Кафедра БТМ 37		

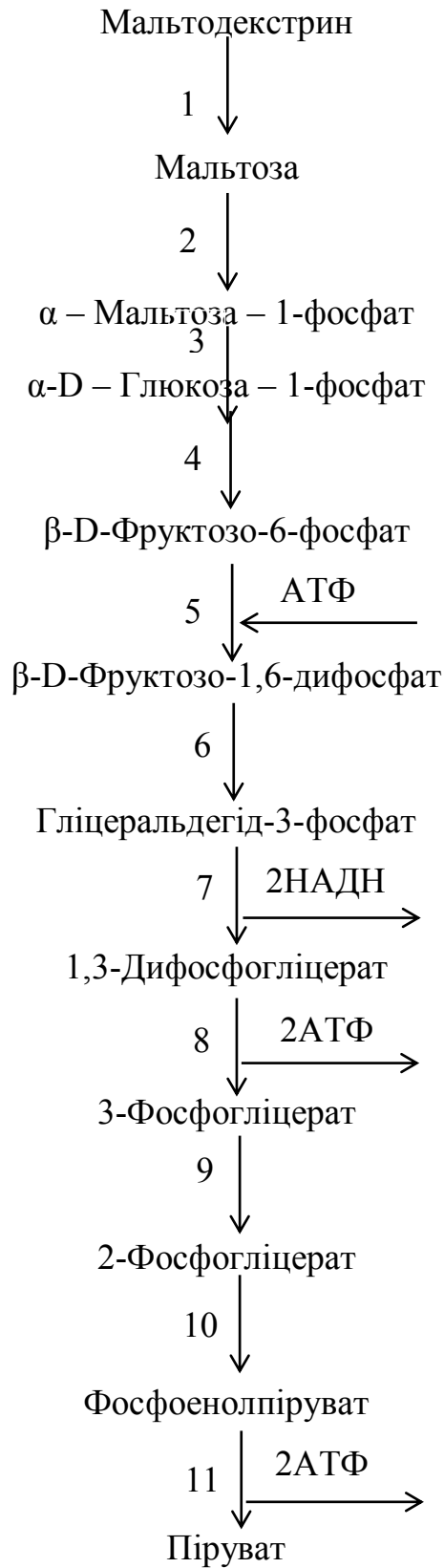


Рис.4. 1. Катаболізм мальтодекстрину у *Streptomyces coelicolor*

Ферменти: 1 – мальтозо  $\alpha$ -D – глікозилтрансфераза ( КФ. 3.2.1.1); 2 – мальтокіназа ( КФ. 2.7.1.175); 3 –  $\alpha$ -1,4-глюкан-мальтозо-1-фосфат-мальтозилтрансфераза ( КФ. 2.499.16 ); 4 – глюкозо-6-фосфатізомераза (КФ.5.3.1.9); 5 – фосфофруктокіназа (КФ.2.7.1.11); 6 – фруктозодифосфатальдоза (КФ.4.1.2.13); 7- гліцеральдегідфосфатдегідрогеназа (КФ.1.2.1.12); 8 – фосфогліцераткіназа (КФ.2.7.2.3); 9 – фосфогліцеромутаза (КФ.5.4.2.11); 10 – енолаза (КФ.4.2.1.11); 11 – піруваткіназа (КФ.2.7.1.4).

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

Під час росту *S. peucetius* 33-24 з використанням мальтодекстрину, внаслідок катаболізму мальтодекстрину, утворюється піруват, який згодом під дією ферредоксиноксидоредуктази (КФ 1.2.7.11) перетворюється на ацетил-КоА. Далі ацетил-КоА перетворюється на Малоніл-КоА під дією ферменту Ацетил-коА карбоксилаза (КФ.6.4.1.2) [29].

Для того, щоб утворилися ФЕП, 3-фосфогліцерат, фруктозо-6-фосфат і глюкозо-6-фосфат, потрібно, щоб функціонували реакції глюконеогенезу, ключовим ферментом якого є фосфоенолпіруваткарбоксикіназа (АТФ) (КФ 4.1.1.49), під дією якого оксалоацетат перетворюється на ФЕП [28].

Згідно з KEGG [30] ацетил-КоА перетворюється на ацетоацетил-КоА під дією ферменту Ацетил-коА С-ацетилтрансфераза (КФ.2.3.1.9), який перетворюється на (С)-3-Гідроксибутанол-коА під дією ферменту 3-гідроксиацил-коА-дегідрогеназа (КФ.1.1.1.35), який перетворюється на Кротоноіл-КоА під дією фермента еноіл-коА гідратази (КФ.4.2.1.17), Кротоноіл-КоА перетворюється на Бутаноіл-КоА під дією фермента кротоноіл-коА редуکتаса (КФ.1.3.1.86).

Згідно з KEGG [31] піруват (С)-2-Ацето-2-дегідроксибутаноат під дією ферменту ацетолактат синтаза I/II/III (КФ.2.2.1.6), який далі перетворюється на (Р)-3-Гідрокси-3-метил-2-оксопентаноат під дією фермента кетолова-кислота редуктоізомераза (КФ.1.1.1.86), (Р)-3-Гідрокси-3-метил-2-оксопентаноат

піддається перетворенню у (P)-2,3-Дегідрокси-3-метилпентаноат за допомогою ферменту кетолова-кислота редуктоізомераза (КФ.1.1.1.86), далі перетворюється на (С)-3-Метил-2-оксопентаноат під дією ферменту дигідрокси-кислотна дегідретаза (КФ.4.2.1.9), який згодом перетворюється на L-Ізолейцин під дією ферменту розгалуженого ланцюга амінокислотної амінотрансферази (К.Ф.2.6.1.42)

Згідно з KEGG [32] відбувається деградація амінокислот з розгалуженим ланцюгом, далі відбувається деградація L-Ізолейцин до Ацетил-КоА під дією ферменту ацетил-коА ацилтрансфераза (К.Ф.2.3.1.16).

Згідно з KEGG [33] у біосинтезі полікетидів 2 типу беруть участь Малоніл-КоА, Ацетил-КоА та Бутаноїл-КоА, піддаються перетворенню у 7,9,12-Декакетиди під дією ферментів мінімальна кетосинтетаза PKS (К.Ф.2.3.1.260), мінімальний коефіцієнт довжини ланцюга (К.Ф.2.3.1.235) та мінімальний PKS носій білка.

7,9,12-Декакетиди піддаються перетворенню у 7,9,12-Декакетид інтермедіат 1, далі перетворюються у 7,9,12-Декакетид інтермедіат 2 під дією фермента кеторедуктази (К.Ф.1.1.1.-), що в свою чергу перетворюється на 7,9,12-Декакетид інтермедіат 3 під дією фермента біофункціональної ароматази (К.Ф.4.2.1.-)

Згідно з KEGG [34] 7,9,12-Декакетид інтермедіат 3 перетворюється на 7,9,12-Декакетид інтермедіат-6, який в свою чергу перетворюється на 12-Деокси-акланонову кислоту під дією ферменту циклази. 12-Деокси-акланорова кислота піддається перетворенню у Акланонат під дією ферменту деоксиногалонат (К.Ф.1.13.12.22), Акланонат перетворюється у Метил акланонат під дією ферменту 0-метилотрансфераза (К.Ф.2.1.1.288), Метил акланонат піддається перетворенню у Аклавікетон під дією ферменту метиловий ефір циклази ногалонової кислоти (К.Ф.5.5.1.26), Аклавікетон у свою чергу перетворюється на Аклавінон під дією ферменту ногалавікетон (К.Ф.1.1.1.362), Аклавінон піддається перетворенню у е-Родоміцин під дією ферменту аклавінон 12-гідролази (К.Ф. 1.14.13.180), а е-Родоміцин

перетворюється на Родоміцин D під дією глікозилтрансферази та допоміжного білка глікозилтрансферази, Родоміцин D піддається перетворенню у 10-

Карбокси-13-деоксикарміноміцин під дією 10-карбометокси-13-дезоксикарміноміцин естерази, який в свою чергу перетворюється у 13-деокси-карміноміцин, 13-деокси-карміноміцин піддається перетворенню у 13-деокси-даунорубіцин під дією ферменту карміноміцин 4-0-метилтрансфераза (К.Ф.2.1.1.292), 13-деокси-даунорубіцин піддається перетворенню у доксорубіцин під дією ферменту 13 – деоксидаунорубіцин гідроксилаза.

Схема біотрансформації ростового субстрату у кінцевий продукт

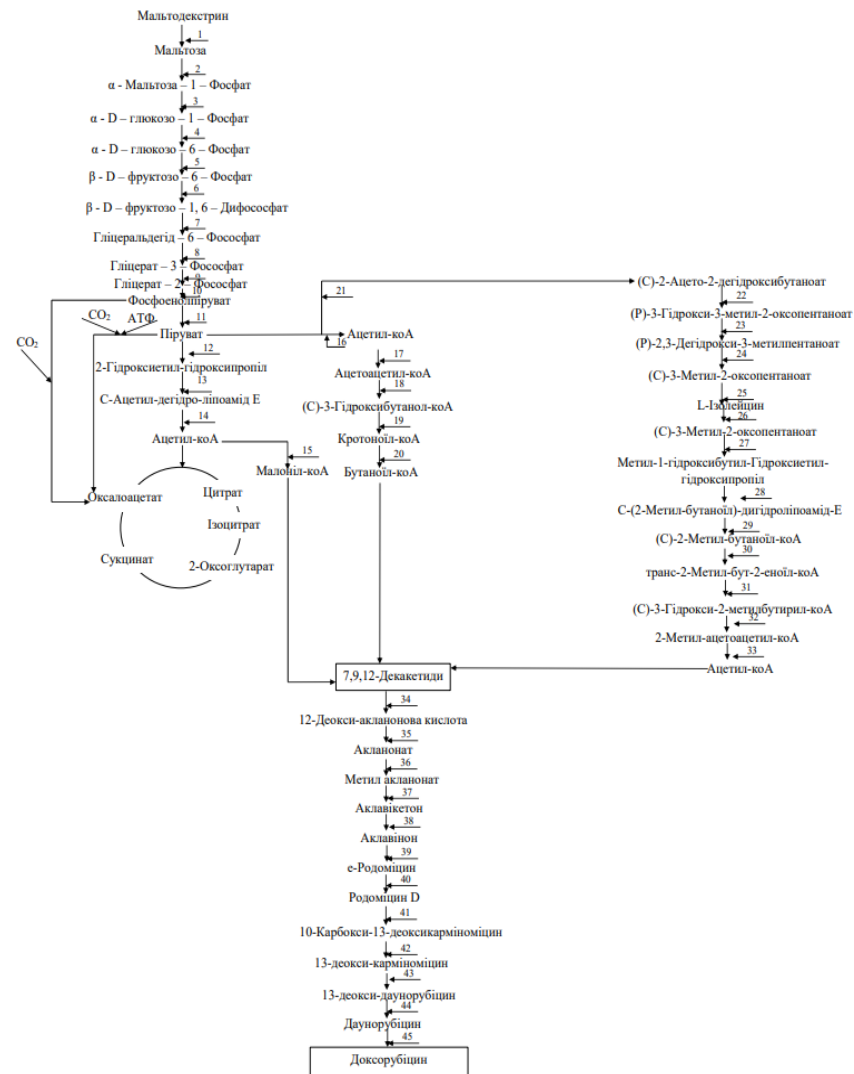


Рис.4.2. Схема біотрансформації мальтодекстрину *Streptomyces peucetius* 33-24 у доксорубіцин

### Ферменти:

- 1 – мальтозо  $\alpha$ -D – глікозилтрансфераза ( КФ. 3.2.1.1);
- 2 – мальтокіназа ( КФ. 2.7.1.175);
- 3 –  $\alpha$ -1,4-глюкан-мальтозо-1-фосфат-мальтозилтрансфераза ( КФ. 2.499.16 );
- 4 – глюкозо-6-фосфатізомераза (КФ.5.3.1.9);
- 5 – фосфофруктокіназа (КФ.2.7.1.11);
- 6 – фруктозодифосфатальдоза (КФ.4.1.2.13);
- 7 – гліцеральдегідфосфатдегідрогеназа (КФ.1.2.1.12);
- 8 – фосфогліцераткіназа (КФ.2.7.2.3);
- 9 – фосфогліцеромутаза (КФ.5.4.2.11);
- 10 – 10 – енолаза (КФ.4.2.1.11);
- 11 – піруваткіназа (КФ.2.7.1.4);
- 12 – піруват дегідрогіназа E1 компонент (КФ.1.2.4.1);
- 13 – піруват дегідрогіназа E1 компонент (КФ.1.2.4.1);
- 14 – піруват дегідрогіназа E2 компонент (КФ.2.3.1.12);
- 15 – ацетил-коА карбоксилаза; (КФ.6.4.1.2);
- 16 – 2-оксоглутарат феродоксин оксиредуктаза; (КФ.1.2.7.11);
- 17 – Ацетил-коА С-ацетилтрансфераза (КФ.2.3.1.9);
- 18 – 3-гідроксиацил-коА-дегідрогеназа (КФ.1.1.1.35);
- 19 – еноіл-коА гідратаза (КФ.4.2.1.17);
- 20 – кротоноіл-коА редуктаза (КФ.1.3.1.86);
- 21 – ацетолактат синтаза I/II/III (КФ.2.2.1.6);
- 22 – кетолова-кислота редуктоізомераза (КФ.1.1.1.86);
- 23 – кетолово-кислотна редуктоізомераза (КФ.1.1.1.86);
- 24 – дигідроксо-кислотна дегідретаза (КФ.4.2.1.9);
- 25 – розгалужений ланцюг амінокислотної амінотрансферази (КФ.2.6.1.42);
- 26 – розгалужений ланцюг амінокислотної амінотрансферази (КФ.2.6.1.42);
- 27 – Альфа субодиниця 2-оксоізовалерату дегідрогенази E1 (КФ.1.2.4.4);

- 28 – Альфа субодиниця 2-оксоізовалерату дегідрогенази E1 (КФ.1.2.4.4);
- 29 – дегідроліпоамід дегідрогеназа (КФ.2.3.1.168);
- 30 – ацетил-коА дегідрогеназа (КФ.1.3.8.7);
- 31 – еноіл-коА гідратаза (КФ.4.2.1.17);
- 32 – 3-гідроксиацил-коА дегідрогеназа (КФ.1.1.1.35);
- 33 – ацетил-коА ацилтрансфераза (КФ 2.3.1.16);
- 34 – циклаза;
- 35 – деоксиногалонат (КФ 1.13.12.22);
- 36 – 0-метилотрансфераза (КФ 2.1.1.288);
- 37 – метиловий ефір циклази ногалонової кислоти (КФ 5.5.1.26);
- 38 – ногалавікетон (КФ 1.1.1.362);
- 39 – аклавінон 12-гідроксилаза (КФ 1.14.13.180);
- 40 – глікозилтрансфераза (КФ 2.4.1.-);
- 41 – 10-карбометокси-13-дезоксикарміноміцин естераза;
- 42 – 10-карбометокси-13-дезоксикарміноміцин естераза;
- 43 – карміноміцин 4-0-метилтрансфераза (КФ 2.1.1.292);
- 44 – 13 – деоксидаунорубіцин гідроксилаза (КФ 1.14.13.181);
- 45 – 13 – деоксидаунорубіцин гідроксилаза (КФ 1.14.13.181).

## РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ СТАДІЙ ВИРОБНИЦТВА

### 5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу

#### 5.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Оптимальними умовами росту для даного штаму актиноміцетів є  $t = 28^\circ \text{C}$ , рН = 6,2 при інтенсивності перемішування 220 об/хв.

Такі умови є сприятливими для розвитку сторонньої мікрофлори. Тому потрібно забезпечити асептичні умови біосинтезу, що неможливо при поверхневому культивуванні. Таких умов ми можемо досягти, використовуючи глибинний спосіб культивування. Глибинне культивування мікроорганізмів має ряд переваг перед поверхневим і дозволяє: значно зменшити виробничі площі; повністю автоматизувати і механізувати процес; перейти на безперервне культивування; покращити санітарно-гігієнічні умови праці. Також асептичні умови забезпечують шляхом стерилізації ферментаційного обладнання, аераційного повітря, поживного середовища і т.д.

*S. peucetius* 33-24 є надпродуцентом доксорубіцину, а для забезпечення необхідної потужності виробництва необхідні великі об'єми поживного середовища, що робить використання поверхневого способу культивування недоцільним. В процесі культивування поживне середовище потребує підживлення, яке являється дуже трудомістким процесом при поверхневому культивуванні.

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.31 КР ПЗ</i>					
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ					
<i>Розробник</i>	<i>Кирилюк Д.В.</i>							<i>Літера</i>	<i>Аркш</i>	<i>Аркшів</i>
<i>Керівник</i>	<i>Тетейна С.М.</i>								45	96
<i>Н. контр</i>								<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Консульт</i>								45		
<i>Зав. каф.</i>	<i>Стадніков В.П.</i>									

Також при глибинному способі культивування компоненти споживаються раціональніше, що дає змогу зменшити кількість відходів виробництва.

Згідно даних наведених вище, найбільш оптимальним для культивування *S. peucetius* 33-24 є глибинне культивування на рідкому поживному середовищі при постійній аерації та перемішуванні.

. Оскільки штам *S. peucetius* 33-24 є аеробом, процес культивування має проходити в аеробних умовах, відповідно ферментер повинен бути оснащений барботером. Аерація 1 об/об\*хв забезпечить культуру потрібною кількістю кисню.

2. Оскільки штам актиноміцетів необхідно культивувати при постійному перемішуванні (220 об/хв) ферментер повинен бути обладнаний аероліфтною мішалкою.

3. Для забезпечення сталої температури культивування ферментер оснащується сорочкою і датчиком температури.

4. Для контролю рівня рН культуральної рідини ферментер оснащується датчиком рН та датчиком контролю піноутворення.

У складі поживного середовища є компоненти, приготування яких супроводжується утворенням піни. Тому, для нормалізації рівня поживного середовища рекомендовано використовувати хімічний піногасник Софексіл-1520А, який являє собою 20% водно-масляну емульсію полідиметилсилоксана і блоксополімерами на основі етиленоксиду і пропіленоксиду. Він є ефективним у широкому діапазоні температур (0° - 100°C), при різних значень рН (4:14) та низьких концентраціях. Товарна форма піногасника є готовою до використання, середнє значення дозування якого становить 0,001-0,01 % від маси системи. Для використання даного піногасника у сферах де передбачається асептичне виробництво Софексіл-1520А дозволяється стерилізувати. При використанні розведеної форми для запобігання розшарування розчину необхідно періодичне перемішування до однорідної системи.

### 5.1.2 Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря

Оскільки продуцент доксорубіцину штам *S.peucetius* 33-24 вирощують в аеробних умовах [6], однією із важливих умов, при культивуванні, є підготовка стерильного аераційного повітря.

Для знезараження повітря при роботі з культурою в боксах використовуємо ультрафіолетове опромінення, а для культивування у ферментері та інокуляторах використовують очищене на фільтрах повітря

- Забір атмосферного повітря здійснюється за допомогою турбокомпресора через забірну шахту на висоті двох-трьох метрів від найвищої точки будівлі. Оскільки висота виробничої будівлі становить 6,5 м (5 м – висота стін, 1,5 м – дах будівлі), атмосферне повітря відбирається на висоті 9 м.
- Для того, щоб знизити кількість контамінантів, повітря спрямовують у фільтри попереднього очищення, в яких воно звільняється від грубого аерозолі – пилу, за допомогою фільтрувального матеріалу (пенополіуретану).
- Далі, відбувається стиснення повітря у турбокомпресорі до 0,35 – 0,5 МПа, що призводить до підвищення його температури (120 – 250 °С) і збільшення вмісту вологи на одиницю об'єму.
- Щоб уникнути процесу злипання волокон і утворення каналів, забезпечується випадання вологи у краплевловлювачі охолодженням повітря за допомогою теплообмінного апарату.
- Видалення конденсованої вологи у ресивері, що потрапила із компресора.
- Підігрів повітря у теплообмінниках.
- Очищення повітря на головних фільтрах.
- Головні фільтри заповнюють набивним волокном і встановлюють в цеху ферментації на головному повітряному колекторі стиснутого аераційного повітря. На головних фільтрах видаляється приблизно 98% мікроорганізмів, а на індивідуальних (встановлюють безпосередньо

перед ферментером, посівним апаратом або інокулятором.) які заповнюються надтонкими мембранами чи волокнами, затримується до 99,999% мікроорганізмів [35],[36].

- Індивідуальні фільтри встановлюють безпосередньо перед ферментером, посівним апаратом або інокулятором. Головні фільтри заповнюють набивним волокном і встановлюють в цеху ферментації на головному повітряному колекторі стиснутого аераційного повітря. На головних фільтрах видаляється приблизно 98% мікроорганізмів, а на індивідуальних, які заповнюються надтонкими мембранами чи волокнами, затримується до 99,999% мікроорганізмів [36].

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

Важливою складовою для забезпечення виробництва продукції належної якості і мікробіологічної чистоти є забезпечення відповідного стану санітарії та гігієни на підприємстві. Підготовка виробничих приміщень включає в себе ряд заходів: вологе прибирання, дезінфекцію і ультрафіолетове опромінення підлоговими та настінними лампами стін, підлог, стель, поверхні обладнання та комунікацій з метою забезпечення чистоти. Підготовка виробничих приміщень поділяється на щоденну і генеральну. Щоденне прибирання "чистих" приміщень проводять після кожної зміни вологим способом.

Для попередження набуття мікроорганізмами резистентності до миючих засобів, слід змінювати засоби для дезінфекції один раз в 1-3 місяці. Із метою охорони безпеки життєдіяльності людини і тварин і запобігання небажаних для людини наслідків до дезінфікуючих речовин, які використовуються у фармацевтичній і харчовій промисловостях висувається ряд вимог:

- ✓ низька ціна та висока доступність;
- ✓ широкий спектр антимікробної дії;
- ✓ безпека для людей і тварин;
- ✓ мінімальні корозійна активність та агресивність;

- ✓ легка розчинність у воді;
- ✓ відсутність різкого запаху;
- ✓ стійкість при зберіганні, використанні, придатність до транспортування;
- ✓ висока активність;

здатність до очищення та відбілювання [37].

«**Вітол**» - це негорюча, нетоксична, поверхнево-активна речовина з дезінфікувальним ефектом. Лужні і нейтральні солі забезпечують високу миючу дію препарату. Розчин стабільний і при зберіганні не розкладається. Наявність в складі пом'якшувачів води дозволяє використовувати розчин препарату в районах з підвищеною жорсткістю води. Використовується для миття обладнання, тари та трубопроводів на підприємствах.

Зберігають в упакованому вигляді в закритих сухих провітрюваних приміщеннях при температурі від мінус 10 до 40 °С, відносної вологості повітря не більше 85%, захищають від дії сонячних променів [38].

«**Хлорантоін**»— хлорактивний, багатокomпонентний, поліфункціональний дезінфекційний засіб з миючим ефектом. Видаляє механічні білкові, жирові забруднення, залишки крові, залишки лікарських засобів із зовнішніх поверхонь, внутрішніх каналів та порожнин виробів медичного призначення.

Водні розчини Хлорантоїну прозорі, безбарвні, мають помірний запах хлору, не ушкоджують об'єкти, які виготовлені із металу (неіржавіюча сталь, хром-нікелева сталь, алюміній тощо), скла, гуми, полімерних та комбінованих матеріалів, дерева, кахлю, порцеляни, фаянсу, поверхні медичних приладів і устаткування з лакофарбовим, гальванічним та полімерним покриттям, не фіксують білкові та жирові забруднення на поверхні виробів медичного призначення, добре змиваються, не залишають нальоту.

Хлорантоін зберігають у пакуванні виробника у критих, сухих, провітрюваних приміщеннях, недоступних для загального використання на

відстані не менше 1 м від нагрівальних приладів, за температури від 5 до 30 °С. Засіб не повинен підлягати дії прямого сонячного проміння. Гарантійний термін зберігання 3 роки з дати виробництва [39].

«*Полідез-А*»– засіб, що не містить хлору, для дезінфекції поверхонь предстерилізаційної очистки багатофункціонального призначення.

Призначення дезінфекційного засобу «*Полідез-А*»:

- для дезінфекції високого рівня при інфекціях;
- для дезінфекції поверхонь у приміщеннях;
- для предстерилізаційної очистки та дезінфекції;
- для боротьби з пліснявою мікрофлорою в приміщеннях;
- для проведення генерального прибирання.

Засіб при кімнатній температурі повністю розчиняється у воді, робочі розчини проявляють миючі властивості, не спричиняє корозію металів, робочі розчини легко змиватися з поверхонь, не залишаючи нальоту. Робочі розчини готують в будь-якій тарі і вони не вимагають особливих умов зберігання. Володіє вираженою антимікробною активністю відносно інфекцій бактеріальної (включаючи туберкульоз), вірусної (включаючи грип різних типів, вірусні гепатити, ВІЛ інфекцію) і грибової (кандидози і дерматофітіях) етіології. Гарантійний термін зберігання 2 роки [40].

#### **5.1.4. Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища**

Згідно з попередньо проведеними розрахунками (див. підрозділ 3.4) виробничий біосинтез доксорубіцину проходить у ферментері об'ємом 5 м<sup>3</sup>, що містить 2,7 м<sup>3</sup> поживного середовища. Інокулянт отримують у три етапи: у колбах на качалках, в інокуляторах об'ємом 60 і 600 л.

Максимальний синтез доксорубіцину (1100 мг/л за 144 год) досягається за умов росту бактеріального штаму *S. peucetius* 33-24 на середовищі такого складу(г/л):

#### **Склад поживного середовища для вирощування посівного матеріалу**

Таблиця 5.1

№ з/п	компонент	кількість, г/л
1	Кукурудзяний крохмаль	5,00
2	Дріжджовий порошок	1,00
3	Глюкоза	5,00
4	Соєве борошно	30,00
5	NaCl	1,00
6	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,00
7	MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	1,00

Варто відзначити, що попереднього запарювання потребують кукурудзяний крохмаль та соєве борошно перед початком процесу стерилізації. Процес запарювання буде проходити в реакторі-змішувачі обладнананому сорочкою та перемішуючим пристроєм.

Важливим є те, що середовище для виробничого біосинтезу доксорубіцину та середовище для вирощування посівного матеріалу відрізняються. В *табл.5.1* наведене поживне середовище для вирощування посівного матеріалу. В *табл.5.2* наведене поживне середовище для виробничого біосинтезу [6].

#### Склад поживного середовища для виробничого біосинтеза

Таблиця 5.2

№ з/п	компонент	кількість, г/л
1	Мальтодекстрин	150,00
2	Дріжджовий екстракт	35,00
3	NaCl	2,00
4	CaCO <sub>3</sub>	3,00

Поживне середовище для виробничого біосинтезу відрізняється від поживного середовища для посівного матеріалу не тільки складом поживного середовища, а й умовами культивування. Температура та рівень рН є сталими для обох процесів  $t = 28 \text{ }^\circ\text{C}$  та  $\text{pH} = 6,2$ . Частота обертів

мішалки інокуляторів та ферментера складає 220 об/хв. Рівень аерації також сталий (1 об/хв) [6].

Для оптимізації процесу виробничого біосинтезу, необхідно приготувати підживлюючий розчин мальтодекстрину, оскільки концентрація субстрату в поживному середовищі є надто великою.

Для підтримання оптимальних умов культивування *S. peucetius* 33-24 та через необхідність запобігання утворення нерозчинних осадів необхідним є приготування титрувальних агентів, а саме 6 %-ї соляної кислоти та еквімолярної кількості 6 %-го гідроксиду натрію необхідні титрувальні агенти.

### Розрахунок вмісту та особливості приготування титрувальних розчинів

Таблиця 5.3

Об'єм середовища, л	HCl (6%)		NaOH (6%)	
	Об'єм, мл	Особливість приготування	Об'єм, мл	Особливість приготування
3,3	–	–	–	–
33,3	66,6	у колбі на 200 мл	66,6	у колбі на 200 мл
333	666	у колбі на 1 л	666	у колбі на 1 л
3 м <sup>3</sup>	6000	у реакторі на 8 л	6000	у реакторі на 8 л

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

Для отримання посівного матеріалу у качалочних колбах об'єм яких 750 мл потрібно приготувати 3,3 л поживного середовища, тому стерилізація компонентів буде відбуватися у автоклаві.

Компоненти середовища розбивають на наступні композиції:

**Композиція 1:** Кукурудзяний крохмаль, соєве борошно, дріжджовий екстракт та глюкоза – режим стерилізації: 112 °С, 30 хв.

**Композиція 2:** NaCl, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O – режим стерилізації: 131 °С, 40 хв.

**Композиція 3:** KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – режим стерилізації: 131 °С, 40 хв.

Кукурудзяний крохмаль та соєве борошно потрібно попередньо суспендувати у холодній воді, потім заварити при температурі 70-90 °С , вмикаємо перемішуючуй пристрій для уникнення утворення великих грудок.

Додаємо глюкозу та дріжджовий екстракт змішуємо та стерилізуємо – режим стерилізації:  $t = 112\text{ °C}$  (30 хв) 0,05 МПа, вмикаємо перемішуючий пристрій для уникнення утворення великих грудок.

В окремих колбах стерилізують дигідроортофосфат калію (Композиція 3), хлорид натрію та сульфат магнію (Композиція 2) (умови стерилізації 131°C, 40 хв), через можливість утворення осаду фосфатів магнію.

### **Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 60 л**

Для одержання посівного матеріалу необхідно 33,3 л середовища, тому стерилізація буде здійснюватися безпосередньо в інокуляторі.

**Композиція 1:** Кукурудзяний крохмаль, соєве борошно, дріжджовий екстракт та глюкоза – режим стерилізації: 112 °С, 30 хв.

**Композиція 2:** NaCl,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – режим стерилізації: 131 °С, 40 хв.

Кукурудзяний крохмаль та соєве борошно потрібно попередньо суспендувати у холодній воді, потім заварити при температурі 70-90 °С , вмикаємо перемішуючуй пристрій для уникнення утворення великих грудок.

Додаємо глюкозу та дріжджовий екстракт змішуємо та стерилізуємо – режим стерилізації:  $t = 112\text{ °C}$  (30 хв) 0,05 МПа, вмикаємо перемішуючий пристрій для уникнення утворення великих грудок.

Для зменшення витрат і спрощення технологічного процесу на даному етапі основні і фосфорні солі об'єднують в одну композицію, яку попередньо розчиняють в окремому збірнику об'ємом 10 л і стерилізують в інокуляторі. Для запобігання утворенню нерозчинних фосфатів магнію розчину з солями, перед стерилізацією рН доводять 6 %-вим розчином соляної кислоти до

значення рН 4,0 – 4,5 та додають стерильний 6%-ий розчин NaOH для стабілізації рівня рН. Після цього вносять посівний матеріал.

**Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 600 л**

Для одержання посівного матеріалу необхідно 333 л ПС, тому стерилізація буде також здійснюватися безпосередньо в інокуляторі.

**Композиція 1:** Кукурудзяний крохмаль, соєве борошно, дріжджовий екстракт та глюкоза – режим стерилізації: 112 °С, 30 хв.

**Композиція 2:** NaCl, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – режим стерилізації: 131 °С, 40 хв.

Кукурудзяний крохмаль та соєве борошно потрібно попередньо суспендувати у холодній воді, потім заварити при температурі 70-90 °С, вмикаємо перемішуючу пристрій для уникнення утворення великих грудок.

Додаємо глюкозу та дріжджовий екстракт змішуємо та стерилізуємо – режим стерилізації: t = 112 °С (30 хв) 0,05 МПа, вмикаємо перемішуючий пристрій для уникнення утворення великих грудок.

Приготування відбувається аналогічно описанному для апарату об'ємом 600 л.

**Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 5 м<sup>3</sup>**

Для одержання посівного матеріалу на цьому етапі необхідно приготувати 3 м<sup>3</sup> середовища.

**Композиція 1:** Мальтодекстрин, дріжджовий екстракт.

**Композиція 2:** Підживлюючий розчин мальтодекстрину

**Композиція 3:** NaCl

**Композиція 4:** CaCO<sub>3</sub>.

Після закінчення стерилізації компонентів композицій та змішуванні їх в ферментері необхідно стабілізувати рівень рН до рівня 6,2. Стабілізація рівня рН відбуватиметься шляхом внесення стерильної 6%-ї HCl або 6 %-го

розчину стерильного NaOH. Кількість HCl або NaOH буде залежний від того, який рівень рН буде після того, як будуть змішані усі композиції в ферментері.

### **2.2.5 Розрахунок складу мальтодекстринового підживлювального розчину**

В лабораторних умовах використовується 40% розчин мальтодекстрину в кількості 150 г/л. Враховуючи те, що для синтезу доксорубіцину використовують ферментер об'ємом 500 л та коефіцієнтом заповнення 0,6. Розраховуємо кількість мальтодекстрину, як підживлюючого розчину:  $150 \text{ г/л} \times 2700 \text{ л} = 405 \text{ кг}$ .

Внесення підживлюючого розчину відбувається кожних 24 год, враховуючи, що час культивування 144 год (6 діб), внесення припиняється на 6 добу, розраховуємо кількість внесення на 5 діб ( $405/5 = 81 \text{ кг}$ ). Так як в данному поживному середовищі, відсутні будь-які інші компоненти, які містили б джерело вуглецю, то 40% розчин мальтодекстрину вноситься разом з поживним середовищем.

У вигляді підживлювального розчину в середовище необхідно внести у процесі культивування 324 кг мальтодекстрину. Тривалість культивування становить 144 год. Прийmemo, що підживлення додається у середовище кожні 24 год. Тоді кількість порцій підживлення становить  $(144-24) / 24 = 5$ .

Отже, з кожною порцією підживлення у середовище повинно вноситись  $100 / 5 = 20 \text{ л}$ .

### **Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН та піногасника**

Аби спростити технологічний процес, основні та фосфорні солі для одержання посівного матеріалу в інокуляторах стерилізуємо разом безпосередньо в біореакторах об'ємом  $5 \text{ м}^3$ , 600 л і 60 л. Для цього, щоб уникнути утворення осаду, рН розчину доводимо до 4,0 – 4,5 додаванням 6% HCl.

Оскільки процес ферментації повинен проходити за значенням рН (6,2) [14], то перед внесенням посівного матеріалу поживне середовище підкислюють 6% HCl.

Необхідним є приготування та стерилізація піногасника, оскільки під час процесу ферментації може утворюватись піна. Обрано піногасник **Софексіл-1520А**

Отже, технологічна схема, окрім стадій підготовки поживного середовища, включає такі стадії допоміжних робіт:

- підготовка стерильного аераційного повітря та очистка відпрацьованого;

- приготування 6% розчину HCl для підкислення середовища при стерилізації його в посівних апаратах об'ємом 60, 600 л і 5 м<sup>3</sup>;

- приготування та стерилізація 6% розчину NaOH для стабілізації рН середовища перед початком культивування в посівних апаратах об'ємом 60, 600 л і 5 м<sup>3</sup>;

Окрім основних реакторів для розчинення композицій солей, також необхідно передбачити колби та реактори:

- ✓ У цеху підготовки посівного матеріалу:

- для приготування 6% HCl (200 мл та 1 л) на стадії культивування в реакторі об'ємом 60, 600 л;

- для приготування та стерилізації 6% NaOH (200 мл та 1 л) на стадії культивування в інокуляторі об'ємом 60, 600 л;

- ✓ У цеху виробничого біосинтезу:

- для приготування 6% HCl (8 л);

- для приготування та стерилізації 6% NaOH (8 л);

Приготований 6 %-й розчин HCl не стерилізується, оскільки приготування розчинів кислот супроводжується виділенням теплоти (екзотермічна реакція) попередньо у сорочку додають холодну воду для урівноваження температури.

## РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Специфікація обладнання, зображеного на апартурній схемі (див. графічна частина), наведена в табл. 3.1.

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

Таблиця 6.1.

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
Д-9 Д-11 Д-14 Д-17 Д-19 Д-22 Д-24 Д-26	Об'ємно-ваговий дозатор	10	Електронний промисловий дозатор води та рідин Serv_W21. Об'єм дозуючої води: 0,1 – 999,9л; витрати води: 12 л/хв [41].
Н-34	Відцентровий насос	1	Герметичний відцентровий насос з магнітною муфтою DM 10 з поліпропілену або фторопласта. Продуктивність 16,6-216 л/хв, температурні параметри середовища, що перекачується від +3 до +95 ° С. Виробник: «DEBEM», Італія [42].
ПЗ-1	Повітрязабірник	1	Пристрій для забору повітря DUNDAR SM 21.2, обладнаний металевією сіткою для видалення механічних забруднень, продуктивність 2500 м <sup>3</sup> /год, робоча температура від -30 до +80 ° С. Виробник: «Dundar», Туреччина [43]

<i>НУХТ БТЕК 04.01.31 КР ПЗ</i>				
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>
<i>Розробник</i>	<i>Кикилидзе Л.В.</i>			
<i>Керівник</i>	<i>Тетеріна С.М.</i>			
<i>Н. конто</i>				
<i>Консульт</i>				
<i>Зав. каф.</i>	<i>Стадніков В.П.</i>			
<i>РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ</i>			<i>Літера</i>	<i>Аркш</i>
				<i>Аркшів</i>
				58
			<i>Кафедра БТМ</i> <sup>58</sup>	

Продовження табл. 6.1

Ф-2	Фільтр грубої очистки	1	Повітряний фільтр ФВКАС-6. Виробник: «Єврофільтр». Фільтрувальний матеріал: пенополіуретан; продуктивність: 3400 м <sup>3</sup> /год; E=90%; габаритні розміри, мм: 592x592x48 [44].
К-3	Компресор	1	Поршневий компресор Abac B 4900. Максимальний робочий тиск 1,0 МПа, продуктивність 514 л/хв. Виробник: «АВАС», Італія 1500 x 450 x 1100 [45].
Т-4	Теплообмінник охолоджувач	1	Охолоджувач повітря WHE 2020 Максимальний робочий тиск 2,5 МПа (25 бар), охолоджувальна здатність 7 кВт/год. Виробник: «Гідропневмосистеми», Україна [46].
Р-5	Ресивер	1	Ресивер ПЗВ 900-800-11-01. Об'єм 900 л. Робочий тиск 1,1 МПа. Виробник компанія «ZELKO Group» (Україна) 2240 x 800 [47].
Т-6	Теплообмінник нагрівач	1	Повітрянагрівач водяний VBC (Systemair). Максимальний робочий тиск 1,6 МПа (16 бар), робоча температура 150 °С. Виробник: «Systemair», Швеція [48]
Ф-7	Фільтр головний	1	Карманний фільтр тонкої очистки класу F9. Фільтруючий матеріал мельблоун. Максимальна робоча температура: 60-70 °С. Ступінь очищення становить 90- 99 % [49]

Ф-12 Ф-15 Ф-20 Ф-28 Ф-30 Ф-32	Індивідуальний фільтр	6	Фільтр повітряний <i>Ultradepth II P-SRF</i> . Фільтруючий матеріал - фторопласт, діапазон температур від -20 до 200 °С, ступінь очищення повітря фільтром становить 99,999 % [50]
Обладнання для приготування поживного середовища в інокулятора об'ємом 60 л			
P-16	Реактор-змішувач для приготування композиції А	1	Реактор-змішувач BIOSTAT® Cplus, обладнаний перемішувальним пристроєм (20-1000 об/хв), об'ємом 15 л. Виробник: «Sartorius» [51].
P-18	Реактор-змішувач для приготування композиції Б	1	Реактор-змішувач BIOSTAT® Cplus, обладнаний перемішувальним пристроєм (20-1000 об/хв), об'ємом 18 л. Виробник: «Sartorius» [52].
Обладнання для приготування поживного середовища в інокулятора об'ємом 600 л			
P-21	Реактор-змішувач для приготування композиції А	1	Реактор-змішувач об'ємом 180 л (d=600мм, h=700мм), оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (100 об/хв), сталь – AISI 316. Виробник: «Schulz Technology» [53]
P-23	Реактор-змішувач для приготування композиції Б	1	Реактор-змішувач об'ємом 150 л, d = 500 мм, h = 800 мм, оснащений сорочкою та турбінною мішалкою (100 об/хв), сталь AISI 316. Виробник компанія «Sartorius» [54]
Обладнання для приготування поживного середовища для ферментера об'ємом 5000 л			

P-13	Реактор-змішувач для приготування композиції А	1	Реактор-змішувач об'ємом 2000 л, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (100 об/хв), сталь – AISI 304. Виробник: «Schulz Technology»  1855x1710x2930 [55].
P-10	Реактор-змішувач для приготування підживлюючого розчину	1	Реактор-змішувач об'ємом 2000 л, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (100 об/хв), сталь – AISI 304. Виробник: «Schulz Technology»  1855x1710x2930 [56].
P-25	Реактор-змішувач для приготування композиції В		Реактор-змішувач об'ємом 300 л, d = 1000 мм, h = 1600 мм, оснащений сорочкою та турбінною мішалкою (100 об/хв), сталь AISI 316. Виробник компанія «Sartorius» [57].
P-27	Реактор-змішувач для приготування композиції Г		Реактор об'ємом 300 л, d = 1000 мм, h = 1600 мм, оснащений сорочкою та турбінною мішалкою (100 об/хв), сталь AISI 316. Виробник компанія «Sartorius» [58].
P-36	Реактор-змішувач для приготування 6-% розчину HCl	1	Реактор об'ємом 10 л, 1900 x 1020 x 750 мм, оснащений сорочкою та турбінною мішалкою (20-1500 об/хв), сталь AISI 316. Виробник компанія «Sartorius» [59]

Р-37	Реактор-змішувач для приготування 6-% розчину NaOH	1	Реактор об'ємом 10 л, 1900 x 1020 x 750 мм, оснащений сорочкою та турбінною мішалкою (20-1500 об/хв), сталь AISI 316. Виробник компанія «Sartorius» [60]
I-29	Інокулятор	1	Промисловий біореактор STR 200 L об'ємом 60 л («Allegro»). Матеріал: нержавіюча сталь AISI 316; розрахунковий тиск в ємності: 0,3 МПа; частота обертів мішалки R 1313: 0-800 об/хв; з рубашкою; оснащений датчиками вимірювання рН, рО <sub>2</sub> , температури; витратоміром, манометром; габаритні розміри, мм 1620 x 1162 x 2125 [61].
ЗБ-35	Засівний бачок	1	Загальний об'єм до 5 л. Нержавіюча сталь
I-31	Інокулятор	1	Інокулятор об'ємом 600 л BLBIO-200SJ («BLBIO»). Матеріал корпусу: нержавіюча сталь AISI 316L; обладнаний турбінною мішалкою: 200-600 об/хв; з рубашкою; датчиками вимірювання рН, рО <sub>2</sub> , DO, температури; витратоміром, манометром, барботером, контролером рівня рідини; потужність: 6 кВт; габаритні розміри, мм: 2000x1500x2800 [62].

Фр-33	Ферментер	1	<p>Ферментер фірми «Luxun International Group» об'ємом 5 м<sup>3</sup> оснащений мішалкою із нержавіючої сталі AISI 316, швидкість перемішування 400-700 об/хв. ; з рубашкою; датчиками вимірювання рН, рО<sub>2</sub>, DO, температури; витратоміром, манометром, барботером, контролером рівня рідини;</p> <p>габаритні розміри, мм: 2200x1700x3100 [63].</p>
З-38	Збірник для стерилізації піногасника	1	<p>Збірник об'ємом 5 л, 1900 x 1020 x 750 мм, оснащений сорочкою та турбінною мішалкою (100 об/хв), сталь AISI 316. Виробник компанія «Sartorius» [64].</p>

## РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ ДОКСОРУБІЦИНУ

Технологічна схема біосинтезу доксорубіцину штамом *S. peucetius* 33-24 включає допоміжні роботи (приготування та стерилізація титрувальних розчинів, приготування та стерилізація піногасника, приготування та стерилізація середовища для дробного внесення, а також підготовка та стерилізація поживних середовищ), та власне технологічний процес (підготовка посівного матеріалу та виробничий біосинтез).

Технологічну та апаратурну схеми біосинтезу доксорубіцину наведено у графічній частині проекту.

### ***ДР 1. Підготовка аераційного повітря***

#### *ДР 1.1. Забір атмосферного повітря*

Атмосферне повітря забирають через повітрозабірник (ПЗ-1) на висоті 9 м, де концентрація пилових часток і мікроорганізмів є мінімальною.

#### *ДР 1.2. Попереднє грубе очищення повітря*

Попередню очистку повітря здійснюють у фільтрі (Ф-2), що забезпечує ступінь очищення 80%. При проходженні повітря через фільтр грубого очищення, пил, механічні частки діаметром 5–10 мкм затримуються. Очищене повітря надходить у компресор (К-3).

#### *ДР 1.3. Стиснення повітря*

Стиснення повітря відбувається за допомогою компресора (К-3), при цьому створюється тиск величиною 0,1 МПа, температура повітря підвищується від 120 до 250 °С. Знищується значна кількість контамінуючої мікрофлори.

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.31 КР ПЗ</i>			
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ</i>	<i>Літера</i>	<i>Аркш</i>	<i>Аркшів</i>
<i>Розробник</i>		<i>Кижирідза Л.В.</i>					64	96
<i>Керівник</i>		<i>Тетеріна С.М.</i>						
<i>Н. контр</i>								
<i>Консульт</i>								
<i>Зав. каф.</i>		<i>Стадніков В.П.</i>					<i>Кафедра БТМ</i> <sup>64</sup>	

#### *ДР 1.4. Охолодження повітря та видалення зайвої вологи*

При високому вмісту вологи у вихідному атмосферному повітрі під час того, як воно охолоджується конденсується ще більша кількість вологи. Для видалення вологи, що утворилася при компресуванні, повітря піддають швидкому охолодженню до 25-30 °С у теплообмінному апараті (Т-4), далі видалену вологу подають на ресивер-вологовідділювач (Р-5), у якому відбувається видалення зайвої вологи до  $W = 60-65 \%$ .

#### *ДР 1.5. Нагрівання повітря*

Для забезпечення надійної роботи фільтрів. Також запобіганню утворення конденсату пари, на волокнах головного та індивідуальних фільтрів, охолоджене повітря з ресивера (Р-5) у теплообміннику (Т-6) нагрівають до температури 30-40 °С. На даному етапі показник вологості зменшується до 50%

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

Повітря пропускають через головний фільтр (Ф-7), в якому фільтрувальним матеріалом є мельблун. Охолоджене повітря, проходячи крізь фільтр, очищається від пилу та мікроорганізмів. Ступінь очищення становить  $E = 95\%$ .

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

Заключна стадія очищення повітря від контамінантів здійснюється в індивідуальних фільтрах (Ф-12, Ф-15, Ф-20, Ф-28, Ф-30, Ф-32), які встановлюють перед кожним апаратом. Фільтруючий матеріал – фторопласт. Ступінь очищення становить  $E = 99,999 \%$ .

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

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

*ДР 2.1.1. Приготування 6%-го розчину HCl для підкислення середовища у посівному апараті об'ємом 60 л*

У колбу об'ємом 200 мл за допомогою мірного циліндру вносять 32,3 мл питної води і при постійному перемішуванні додають 1 мл 31% - ї HCl

(обов'язково рідини змішують в такому порядку, а не навпаки для уникнення сильної екзотермічної реакції).

*ДР 2.1.2. Приготування 6%-го розчину HCl для підкислення середовища у посівному апараті об'ємом 600 л*

У колбу об'ємом 1 л за допомогою мірного циліндру вносять 323,3 мл питної води і при постійному перемішуванні додають 10 мл 31% - і HCl (обов'язково рідини змішують в такому порядку, а не навпаки для уникнення сильної екзотермічної реакції).

*ДР 2.1.3. Приготування 6%-го розчину HCl для підкислення середовища у посівному апараті об'ємом 5 м<sup>3</sup>*

У реактор (Р-36) об'ємом 10 л за допомогою мірного циліндру вносять 2912,6 мл питної води і при постійному перемішуванні додають 87,4 мл 31% - і HCl (обов'язково рідини змішують в такому порядку, а не навпаки для уникнення сильної екзотермічної реакції).

*ДР 2.2. Приготування і стерилізація розчину титрувального агента (6 %-й розчин NaOH)*

*ДР 2.2.1. Приготування та стерилізація розчину NaOH для підлужнення середовища, в інокуляторі об'ємом 60 л.*

У колбу об'ємом 200 мл за допомогою технічних вагів вносять 0,19 г кристалічного NaOH і додають 33,3 мл дистильованої води, вмикають перемішуючий пристрій. Приготований розчин лугу стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С впродовж 40 хв.

*ДР 2.2.2. Приготування та стерилізація розчину NaOH для підлужнення середовища, в інокуляторі об'ємом 600 л.*

У колбу об'ємом 1 л за допомогою технічних вагів вносять 2 г кристалічного NaOH і додають 333 мл дистильованої води, вмикають перемішуючий пристрій. Приготований розчин лугу стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С впродовж 40 хв.

*ДР 2.2.3. Приготування та стерилізація розчину NaOH для підлужнення середовища, в інокуляторі об'ємом 5 м<sup>3</sup>.*

У реактор (P-37) об'ємом 10 л за допомогою технічних вагів вносять 36 г кристалічного NaOH і додають 3000 мл дистильованої води, вмикають перемішуючий пристрій. Приготований розчин лугу стерилізують шляхом подачі пари в сорочку в збірнику при температурі 131 °С впродовж 40 хв.

### ***ДР 3. Приготування та стерилізація піногаснику***

Приготування та стерилізація піногасника Софексіл-1520А з 20 %-ю водно-маслянистою емульсією полідиметилсилоксана і блоксополімерами на основі етиленоксиду і пропіленоксиду. Піногасник буде вноситися автоматично (доза одного внесення – 0,1% від робочого об'єму ферментера або інокулятора) при спрацьовуванні датчика рівня піни. Для культивування в інокуляторах та ферментері загальний об'єм середовищ в яких складає 33,3 333 л та 3 м<sup>3</sup> потрібно приготувати та простерилізувати 30, 300 та 3000 мл піногасника Софексіл-1520А.

*ДР 3.1. Приготування та стерилізація піногасника для інокулятора об'ємом 60,600 л та ферментера об'ємом 5 м<sup>3</sup>.*

Робочий об'єм поживного середовища усіх стадій становить 3 м<sup>3</sup>, тому необхідно приготувати та простерилізувати 3330 мл піногасника. Стерилізацію проводять в збірнику (З-38) при температурі 131 °С, тиску 0,15 МПа упродовж 40 хв.

### ***ДР 4. Приготування та стерилізація поживних середовищ***

*ДР 4.1. Приготування та стерилізація середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках*

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

<b>Компонент поживного середовища</b>	<b>Концентрація, г/л</b>	<b>Кількість для приготування 3,3 л середовища, г</b>	<b>Композиція</b>	<b>Об'єм композиції V, мл</b>
Кукурудзяний крохмаль	5	16,5	А	2000
Соєве борошно	30	99		
Дріжджовий екстракт	1	3,3		
Глюкоза	5	16,5		
NaCl	1	3,3	Б	1000
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1	3,3		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1	3,3	В	300

*ДР. 4.1.1. Підготовка та стерилізація композиції А*

На технічних вагах зважують 16,5 г кукурудзяного крохмалю, 99 г соєвого борошна. Кукурудзяний крохмаль та соєве борошно потрібно суспендувати у холодній воді, потім заварити при температурі 70-90 °С. Далі додаємо 3,3 г дріжджового екстракту та 16,5 г глюкози вносять у колбу об'ємом 4000 мл та додають 1865 мл дистильованої води, перемішують. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при 112 °С упродовж 30 хв, 0,05 МПа.

*ДР. 4.1.2. Підготовка та стерилізація композиції Б*

На технічних вагах зважують 3,3 г NaCl, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O вносять у колбу об'ємом 2000 мл та додають 1000 мл дистильованої води, перемішують до повного розчинення солей. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при 131 °С упродовж 40 хв, 0,15 МПа.

#### *ДР. 4.1.3. Підготовка до стерилізації композиції В*

На технічних вагах зважують 3,3 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  вносять у колбу об'ємом 500 мл та додають 300 мл дистильованої води, перемішують до повного розчинення солей. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при 131 °С упродовж 40 хв, 0,15 МПа.

#### *ДР 4.2. Приготування і стерилізація поживного середовища для інокулятора об'ємом 60 л*

Для вирощування посівного матеріалу у інокуляторі об'ємом 60 л потрібно приготувати середовище об'ємом 30 л ( з урахуванням 10% посівного матеріалу та конденсату).

Отже, загальна кількість води, яка необхідна для приготування поживного середовища становить 27 л.

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування для приготування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 60 л наведений у табл.7.2.

*Таблиця 7.2*

#### **Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 60 л (Кз = 0,6)**

<b>Компонент поживного середовища</b>	<b>Концентрація, г/л</b>	<b>Кількість для приготування 30 л середовища, г</b>	<b>Композиція</b>	<b>Об'єм композиції, л</b>
Кукурудзяний крохмаль	5	150	А	12
Соєве борошно	30	900		
Дріжджовий екстракт	1	30		

Глюкоза	5	150		
NaCl	1	30	Б	15
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1	30		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1	30		
Конденсат				3
<b>Усього</b>				<b>30</b>

*ДР. 4.2.1. Підготовка до стерилізації композиції А*

За допомогою об'ємного-вагового дозатора (Д-14) зважують 150 г кукурудзяного крохмалю та 900 г соєвого борошна. Кукурудзяний крохмаль та соєве борошно потрібно суспендувати у холодній воді, потім заварити при температурі 70-90 °С. Далі додаємо 30 г дріжджового екстракту та 150 г глюкози вносять у реактор (Р-16) об'ємом 15 л та додають 12 л питної води, перемішують. Стерилізують шляхом подачі пари у рубашку при температурі 112<sup>0</sup> С впродовж 30 хв.

*ДР. 4.2.2. Підготовка до стерилізації композиції Б*

За допомогою об'ємного-вагового дозатора (Д-17) зважують 30 г NaCl, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O та 30 г KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> вносять реактор (Р-18) об'ємом 18 л та додають 15 л питної води, перемішують. Стерилізують шляхом подачі пари у рубашку при температурі 112<sup>0</sup> С впродовж 30 хв.

*ДР 4.3. Приготування і стерилізація поживного середовища для інокулятора об'ємом 600 л*

Для вирощування посівного матеріалу у інокуляторі об'ємом 600 л потрібно приготувати середовище об'ємом 300 л ( з урахуванням 10% посівного матеріалу та конденсату).

Отже, загальна кількість води, яка необхідна для приготування поживного середовища становить 270 л.

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 100 л наведений у табл. 4.3.

Таблиця 7.3

**Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 600 л ( $K_3 = 0,6$ )**

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Кількість для приготування 300 л середовища, кг	Композиція	Об'єм композиції, л
Кукурудзяний крохмаль	5	1,5	А	150
Соеве борошно	30	9		
Дріжджовий екстракт	1	0,3		
Глюкоза	5	1,5		
NaCl	1	0,3	Б	120
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1	0,3		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1	0,3		
Конденсат				30
<b>Усього</b>				<b>300</b>

#### *ДР. 4.3.1. Підготовка до стерилізації композиції А*

У реактор-змішувач реактор (Р-21) об'ємом 180 л за допомогою об'ємно – вагового (Д-19) дозатора вносять 1,5 кг кукурудзяного крохмалю та 9 кг соєвого борошна. Кукурудзяний крохмаль та соєве борошно потрібно суспендувати у холодній воді, потім заварити при температурі 70-90 °С. Далі додаємо 0,3 кг дріжджового екстракту та 1,5 кг глюкози додають 150 л питної води, перемішують. Стерилізують шляхом подачі пари у рубашку при температурі 112 ° С впродовж 30 хв.

#### *ДР. 4.3.2. Підготовка до стерилізації композиції Б*

У реактор-змішувач (Р-23) об'ємом 150 л за допомогою об'ємно – вагового дозатора (Д-22) вносять 0,3 кг  $K_2HPO_4$ , 0,3 кг NaCl та 0,3 кг  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  та додають питну воду до загального об'єму 120 л. Для кращого розчинення солей в сорочку подається пара (до досягнення температури розчину 40 °С) та встановлюють режим перемішування з кількістю обертів 100 - 150 об/хв до повного розчинення. Розчин подають в попередньо простерилізований інокулятор об'ємом 600 л. Додають розчин соляної кислоти (від ДР 1.1.3.) до досягнення значення рН 4-4,5. Стерилізація відбувається парою при температурі 131 °С упродовж 40 хв.

#### ***ДР.4.4. Приготування і стерилізація поживного середовища для ферментера об'ємом 5 м<sup>3</sup>***

Для вирощування посівного матеріалу у ферментері об'ємом 5 м<sup>3</sup> потрібно приготувати середовище об'ємом 2,7 м<sup>3</sup> ( з урахуванням 10% посівного матеріалу та конденсату).

Отже, загальна кількість води, яка необхідна для приготування поживного середовища становить 2,4 м<sup>3</sup>.

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування інокуляту в ферментері об'ємом 5 м<sup>3</sup> наведений у табл 4.4.

**Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в ферментері об'ємом 5 м<sup>3</sup> (Кз = 0,6)**

<b>Компонент поживного середовища</b>	<b>Концентрація, г/л</b>	<b>Кількість для приготування 2,7 м<sup>3</sup> середовища, кг</b>	<b>Композиція</b>	<b>Об'єм композиції, л</b>
Мальтодекстрин	60	81	А	1000
Дріжджовий екстракт	35	94,5		
Мальтодекстрин (підживлюючий розчин)	90	324	Б	1100
NaCl	2	5,4	В	150
CaCO <sub>3</sub>	3	8,1	Г	150
Конденсат				300
<b>Усього</b>				<b>2700</b>

*ДР 4.4.1. Приготування та стерилізація композиції А*

У реактор (Р-13) об'ємом 2000 л за допомогою об'ємно - вагового дозатора (Д-11) вносять 81 кг мальтодекстрину та 91,5 кг дріжджового екстракту та додають питну воду до загального об'єму 1000 л. Розчин подають в попередньо простерилізований ферментер (Фр-33) об'ємом 5 м<sup>3</sup>. Стерилізують шляхом подачі пари у рубашку при температурі 112 ° С впродовж 30 хв.

*ДР. 4.4.2. Приготування та стерилізація композиції Б*

Готуємо підживлюючий розчин з 40-% концентрацією мальтодекстрину. Для цього в реактор-змішувач (Р-10), об'ємом 2000 л, за допомогою об'ємно-вагового дозатору (Д-9) вносять 324 кг мальтодекстрину та питну воду до

загального об'єму 1100 л. Після чого стерилізують шляхом подачі пари у сорочку ( $t = 112\text{ }^{\circ}\text{C}$  упродовж 30 хв).

#### *ДР. 4.4.3. Приготування та стерилізація композиції В*

У реактор (Р-25) об'ємом 300 л за допомогою об'ємно вагового дозатора (Д-24) вносять NaCl у кількості 5,4 кг та додають питну холодну воду до загального об'єму 150 л. Для кращого розчинення солі в сорочку подається пара (до досягнення температури розчину  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) та встановлюють режим перемішування з кількістю обертів 100 - 150 об/хв до повного розчинення. Розчин подають в попередньо простерилізований ферментер (Фр-33) об'ємом  $5\text{ м}^3$ . Стерилізують шляхом подачі пари у рубашку при температурі  $131\text{ }^{\circ}\text{C}$  упродовж 40 хв, 0,15 МПа.

#### *ДР. 4.4.4. Приготування та стерилізація композиції Г*

У реактор (Р-27) об'ємом 300 л за допомогою об'ємно вагового дозатора (Д-26) вносять  $\text{CaCO}_3$  у кількості 8,1 кг та додають питну холодну воду до загального об'єму 150 л для попереднього суспендування у холодній воді в реакторі об'ємом 300 л. Для кращого розчинення солі в сорочку подається пара (до досягнення температури розчину  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) та встановлюють режим перемішування з кількістю обертів 100 - 150 об/хв до повного розчинення. Розчин подають в попередньо простерилізований ферментер об'ємом  $5\text{ м}^3$ . Стерилізують шляхом подачі пари у рубашку при температурі  $131\text{ }^{\circ}\text{C}$  упродовж 40 хв, 0,15 МПа.

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

#### *ТП 5.1. Підтримання колекційної культури.*

Колекційну культуру *Streptomyces peucetius* 33-24 зберігають у пробірках з триптон соєвим агар. Пересіви здійснюють кожен місяць. Всі роботи з колекційною культурою проводять строго в асептичних умовах.

#### *ТП 5.2. Отримання робочої культури на агаризованих середовищах.*

Культуру, що зберігається в пробірках з триптон соєвим агаром, пересівають на чашки Петрі для отримання ізольованих колоній. Через 2 доби роблять пересів ізольованої колонії з чашки Петрі на необхідні 4 (3 для

інокулювання колб + 1 запасна) пробірок з скошеним триптон-соєвим агаром, і вирощують у термостаті 48 год. при температурі 30 °С.

### *ТП 5.3. Вирощування робочої культури на агаризованому середовищі*

З чашки Петрі роблять пересів ізольованих колоній на 4 пробірки з триптон-соєвим агаром. Культивують в термостаті при  $t = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$  (24 год).

### *ТП 5.4. Вирощування культури в колбах на качалках.*

У колбу об'ємом 1000 мл в асептичних умовах вносять композицію А (від ДР 4.1.1), композицію Б (від ДР 4.1.2), композицію В (від ДР 4.1.3). Перемішують і розливають стерильним мірним циліндром (200 мл) по 100 мл у три стерильні качалочні колби об'ємом 750 мл.

Робочу культуру *Streptomyces peucetius* 33-24 у пробірках суспендують та піпеткою вносять у колби з розлитим поживним середовищем. Культивування *Streptomyces peucetius* 33-24 здійснюють у колбах на качалці (220 об/хв) упродовж 40 год. Після вирощування інокуляту здійснюють мікробіологічний контроль у кожній колбі.

### *ТП 5.5. Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 60 л*

У стерильний інокулятор об'ємом 60 л в асептичних умовах вносять композицію А (від ДР 4.2.1), композицію Б (від ДР 4.2.2), піногасник (від ДР 3.1) та посівний матеріал з минулої стадії у кількості 10 %. Перемішують і в асептичних умовах через засівний бачок вносять в інокулятор об'ємом 60 л.

Культивування проводять у інокуляторі, вмикають перемішуючий пристрій (220 об/хв) при температурі 28 °С упродовж 40 годин.

Кожні 4-6 год відбирають проби для проведення мікробіологічного контролю, визначення рівня біомаси.

### *ТП 5.6. Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 600 л*

У інокулятор з композицією Б (від ДР 4.3.2) подається композиція А (від ДР 4.3.1), піногасник (від ДР 3.1) та посівний матеріал (через трубоперетискування) (від ТП 4.5) та вмикають подачу аераційного повітря.

Культивування проводять у інокуляторі, вмикають перемішуючий пристрій (220 об/хв) при температурі 28 °С упродовж 40 годин.

Кожні 4-6 год відбирають проби для проведення мікробіологічного контролю, визначення рівня біомаси.

### ***ТП 6. Виробничий біосинтез.***

У ферментер, подають композицію Г (від ДР. 4.4.4) подають композицію В від (ДР 4.4.3.), подають композицію 1 від (ДР 4.4.1.) піногасник (від ДР 3.1) та подають підживлюючий розчин мальтодекстрину (від ДР 4.4.2) кожні 24 год. Вмикають перемішуючий пристрій (220 об/хв), подають стерильне повітря через барботер, стерилізують та додають стерильний 6 % NaOH (від ДР 2.1.3.) для стабілізації рівня рН. Через трубоперетискування вносять інокулят (від ТП 5.4.) Культивування проводять при температурі 28 °С упродовж 144 годин.

Кожні 4-6 год відбирають проби для проведення мікробіологічного контролю, визначення рівня біомаси. В кінці процесу культивування, орієнтовна концентрація доксорубіцину має складати – 1100 мг/л.

## РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

Протягом процесу культивування періодично (кожні 4 год) відбирають проби культуральної рідини для мікробіологічного контролю, концентрації доксорубіцину та біомаси бактерій; контролю рівня джерела вуглецю (мальтодекстрину) та джерела азоту (дріжджового екстракту) у середовищі.

### 8.1. Мікробіологічний контроль

Враховуючи те, що культивування бактерій *Streptomyces peucetius* 33-24 з метою одержання доксорубіцину проводиться в асептичних умовах, то необхідно проводити мікробіологічний контроль на усіх етапах, для того щоб впевнитись у відсутності контамінації.

Мікробіологічний контроль проводиться двома шляхами: прямий висів на агаризовані поживні середовища та мікроскопіювання. Культуральну рідину розсівають петлею до ізольованих колоній на чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром (МПА) для виявлення бактерій, із сусло-агаром (СА) або глюкозо-картопляним агаром (ГКА) – для дріжджів і грибів. Чашки інкубують за температури 28 – 30 °С (МПА) та 24 – 26 °С (СА або ГКА). Після інкубації чашки розглядають на наявність сторонньої мікрофлори.

Мікроскопіювання проводять у світловому мікроскопі з імерсійною системою. Для приготування препарату на чисте знежирене предметне скло, в асептичних умовах, за допомогою стерильної петлі наносять невелику краплину культуральної рідини. Краплю, яка містить мікроорганізми, розподіляють по склу за допомогою бактеріальної петлі (діаметр мазка близько 1 см). Мазок висушують без нагрівання, при кімнатній температурі, до повного випаровування вологи. Потім на абсолютно сухий препарат за допомогою скляної палички наносять 1–2 краплини імерсійного масла та проводять мікроскопіювання. Після роботи ваткою, змоченою етиловим спиртом, знімають залишки масла з імерсійного об'єктива.

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.31 КР ПЗ</i>			
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА</i>	<i>Літера</i>	<i>Аркш</i>	<i>Аркшів</i>
<i>Розробник</i>	<i>Кікіридзе Л.В.</i>						77	96
<i>Керівник</i>	<i>Тетеріна С.М.</i>					<i>Кафедра БТМ<sup>77</sup></i>		
<i>Н. контр</i>								
<i>Консильт</i>								
<i>Зав. каф.</i>	<i>Стадніков В.П.</i>							

При відсутності у зразку сторонньої мікрофлори під час мікроскопіювання можна побачити клітини *Streptomyces peucetius* 33-24. Клітини утворюють міцелій, розташовуються переважно утворюючи ланцюжки, рідше поодинокі або попарно.

Кожні 4 год з інокуляторів і ферментера відбирають зразки культуральної рідини для аналізу.



Рис. 8.1. Колонії *S. peucetius* на агаризованому середовищі [18].

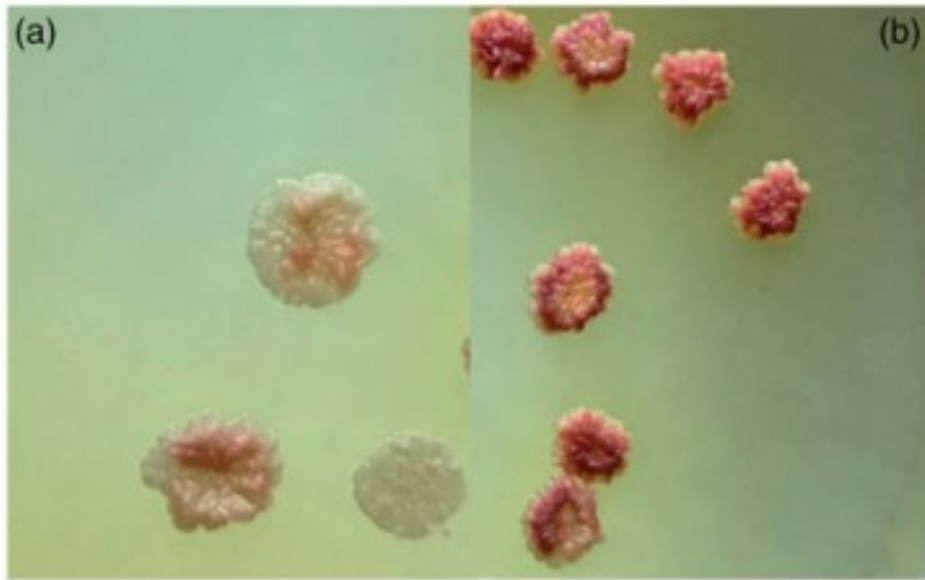


Рис. 8.2. Колонії вихідного штаму *Streptomyces peucetius* SIPI-11 та мутованого штаму *Streptomyces peucetius* 33-24 [6].

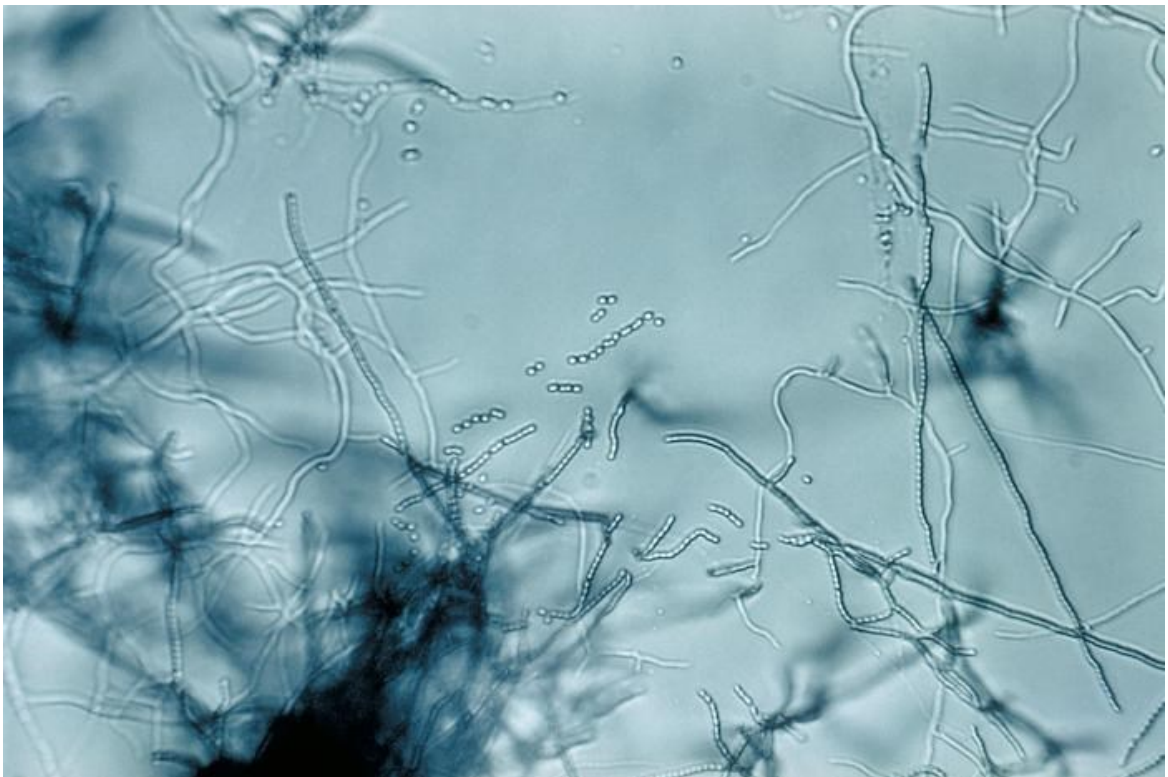


Рис. 8.3. *Streptomyces peucetius* 33-24 при мікроскопіюванні [65].

## 8.2. Визначення концентрації біомаси бактерій

Концентрацію біомаси визначають ваговим методом, висушуючи відділений центрифугуванням міцелій при 105 °С до постійної ваги та

виражають її у міліграмах на мілілітр культуральної рідини. Продуктивність культури оцінюють відношенням величини біосинтетичної (літичної) активності до концентрації біомаси в культуральній рідині та виражають в умовних одиницях на міліграм біомаси [66].

### **8.3. Визначення концентрації доксорубіцину**

Для вимірювання концентрації доксорубіцину культуральну рідину екстрагують абсолютним етиловим спиртом і центрифугують при 12000 об/хв протягом 5 хв, після регулювання рН до 1,5–1,8 з 6 моль / л НСІ. Отримані супернатанти аналізують рідинною хроматографією високого тиску (ВЕРХ) на Agilent Колона С18 (4,6 150 мм; 3,5  $\mu$ m).

Аналітично використовують наступну програму з розчинником А (0,1% трифтороцтової кислоти (ТФА) у  $H_2O$ ) та В (0,1% ТФА в ацетонітрилі): 0–5 хв, лінійний градієнт від 75% А / 25% В до 70% А / 30% В; 5–20 хв, лінійний градієнт від 70% А / 30% В до 55% А / 45% В; 20–23 хв, лінійний градієнт від 55% А / 45% В до 10% А / 90% В; 23–24 хв, лінійний градієнт від 10% А / 90% В до 75% А / 25% В; і 24–30 хв, 75% А / 25% В, зі швидкістю потоку 0,8 мл / хв та УФ-детектуванням при 254 нм з використанням системи ВЕРХ Agilent 1260 [6].

### **8.4. Визначення концентрації джерела Карбону (мальтодекстрин) у середовищі**

Вимірювання проводиться методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) за допомогою приладу Agilent Technologies 1200 (рис 5.2). Метод ґрунтується на різному розподілі речовин в динамічних умовах між рухомою і нерухомою фазами.

Прилад Agilent Technologies 1200 оснащений детектором показника заломлення. Аналіз речовин проводиться ізократно зі швидкістю протоку 0,6 мл/хв на колонці Aminex НРХ-87Н (300  $\times$  7.8 мм) при температурі 65  $^{\circ}$ С. Колонка Aminex НРХ-87Н заповнена дивінілбензолом, як рухому фазу використовують  $H_2SO_4$  (0,005 Н). Для якісного і кількісного визначення використовують стандартні реактиви.

Культуральну рідину (зразок для аналізу) центрифугують при 10 тис об/хв та температурі 4° С протягом 10 хв. В подальшому супернатант фільтрують з використанням фільтрувального елемента з діаметром пор 0,22 мкм. Отриманий фільтрат подають до приймача хроматографу у кількості 10 мкл. В ході хроматографічного аналізу реєструють отримані піки та аналізують вміст компонентів поживного середовища за площею кожного окремого піку [67].



Рис.5.4. Agilent Technologies 1200

### **8.5. Визначення концентрації джерела Нітрогену (Дріжджовий екстракт) у середовищі**

Дріжджовий екстракт в поживному середовищі являється джерелом азоту, до складу якого входить азот в амінній формі. В супернатанті визначають концентрацію азоту, який одержують за допомогою центрифугування культуральної рідини при 7000 об/хв протягом 20-30 хв, для видалення біомаси від супернатанту, використовують мідний метод. Метод заснований на здатності амінокислот вступати в реакцію з міддю і утворювати розчинні з'єднання, кількість визначають за допомогою йодометричного титрування. Суть методу: до слабо лужного розчину амінокислот додають надлишок суспензії ортофосфату міді  $Cu_3(PO_4)_2$  у

боратному буферному розчині. При цьому утворюються розчинні мідні з'єднання. Для їхнього відділення від нерозчинного ортофосфату міді суміш фільтрують. Потім до фільтрату прибавляють оцтову кислоту, яка відщеплює мідь від комплексного з'єднання і перетворюється в ацетат міді.

Для визначення кількості міді, яка брала участь в реакції, до розчину додають йодид калію:  $2\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 + 4\text{KJ} = \text{J}_2 + 2\text{CuJ} + 4\text{CH}_3\text{COOK}$  (6.1)<sup>84</sup> В результаті реакції виділяється йод в кількості, еквівалентній кількості міді, а відповідно, і азоту амінокислот, який відтитровують розчином тіосульфату натрію:  $\text{J}_2 + 2\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 = 2\text{NaJ} + \text{Na}_2\text{S}_4\text{O}_6$  (6.2) 1 мл 0,01 н розчину тіосульфату натрію відповідає 0,28 мг амінного азоту, оскільки один атом міді реагує з двома молекулами амінокислот, утворюючи з'єднання типу  $\text{Cu}(\text{RCHNH}_2\text{COO})_2$ . Техніка визначення:

В мірну колбу місткістю 50 мл піпеткою вносять 5 мл дослідного розчину, додають 3-4 краплини індикатору тимолфталейну і по краплям розчин гідроксиду натрію концентрацією 0,1 моль/л до появи блідно-блакитного забарвлення. До слабо лужного розчину із циліндра при перемішуванні порціями обережно приливають 30 мл суспензії ортофосфату міді, вміст колби доводять дистильованою водою до мітки, перемішують і фільтрують через паперовий фільтр. Фільтрат повинен бути прозорим. 10 мл абсолютно прозорого фільтрату піпеткою переносять в фарфорову чашку або конічну колбу, додають 0,5 мл 80 %-ї оцтової кислоти (підкислюють) і 10 мл розчину йодату калію. Після перемішування йод, що виділився, титрують із мікробюретки розчином тіосульфату натрію концентрацією 0,01 моль/л. В кінці титрування до розчину додають 1-2 краплини розчину крохмалю. Кінець титрування визначають по зникненню синього забарвлення від однієї краплі тіосульфату натрію. При прийнятому розбавленні кількість амінного азоту в 10 мл фільтрату отримують множенням маси тіосульфату натрію, витраченого на титрування, на 0,28. З урахуванням розчинення це відповідає 1 мл культуральної рідини. Вміст амінного азоту  $X$  розраховують за рівнянням:  $X = a \cdot 0,28 \cdot 6 \cdot 10 \cdot 100 / 50$  де  $a$  – кількість розчину тіосульфату

натрію концентрацією 0,01 моль/л, витраченого на титрування, л ; б – об'єм дослідної рідини, взятий на аналіз, л [68].

## 8.6. Карта постадійного контролю

Таблиця 8.1

### Карта постадійного контролю біосинтезу доксорубіцину

<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>
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>
Кт 1.1 <i>Забір атмосферного повітря</i>	<b>Повітрозабірник</b>  Висота забору повітря	-	Під час купівлі та при встановленні	H = 9 м
Кт 1.2 <i>Очистка від грубих домішок</i>	<b>Очищене повітря</b>  Ступінь очистки	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно з паспортом фільтра	Після проходження через фільтр грубої очистки	E = 80%
Кт 1.3 <i>Стиснення повітря</i>	<b>Стиснене повітря</b>  Тиск	Манометр	Після компресування	P = 0,1 МПа,
Кт 1.4 <i>Охолодження і видалення зайвої вологи</i>	<b>Охолоджене повітря</b>  Температура, вологовміст	Термометр, психрометр	Після охолодження і видалення вологи	t = 25-30°C, W = 60-65%
Кт 1.5 <i>Нагрівання повітря</i>	<b>Нагріте повітря</b>  Температура, вологовміст	Термометр, психрометр	Після нагрівання	t = 30-40°C, W = 50%

Кт 1.6 <i>Очищення у головному фільтрі</i>	<b>Очищене повітря</b>  Ступінь очистки,	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно з паспортом фільтра	Після проходження через головний фільтр	E = 95%
Кт, Км 1.7 <i>Очищення в індивідуальному фільтрі</i>	<b>Очищене повітря</b>  Ступінь очищення, мікробіологічна чистота	Перевірка ступеня очищення згідно з паспортом фільтра, мікробіологічний контроль	Після проходження через індивідуальний фільтр	E = 99,999%, КУО – менше 1
Кх 2.1.1, 2.1.2, 2.1.3  <i>Приготування розчину соляної кислоти</i>	<b>Розчин соляної кислоти</b>  Концентрація	Фізико-хімічний метод,	Після приготування розчину	C = 6%,
Кт, Кх, Км 2.2.1, 2.2.2, 2.2.3  <i>Приготування і стерилізація розчину натрію гідроксиду</i>	<b>Розчин натрію гідроксиду</b>  Тиск, температура, час, концентрація, стерильність	Манометр, термометр, годинник, фізико-хімічний метод, мікробіологічний контроль	Концентрація визначається після приготування розчину, тривалість, тиск і температура безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P = 0,15 МПа,  t = 131 °C,  τ = 40 хв,  C = 6%,  відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.1  <i>Приготування і стерилізація піногасника</i>	Тиск, температура, час стерильність	Манометр, термометр, годинник, фізико-хімічний метод, мікробіологічний контроль	Тривалість, тиск і температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P = 0,15 МПа,  t = 131 °C,  τ = 40 хв,  відсутність мікробіоти

<p>Кт, Км 4.1.1</p> <p><i>Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту у колбах на качалках</i></p> <p><i>Приготування і стерилізація композиції А</i></p>	<p><b>Композиція А</b></p> <p>Тиск, температура, час, стерильність</p>	<p>Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Тривалість, тиск і температура визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>P = 0,05 МПа, t = 112 °С, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт, Км 4.1.2</p> <p><i>Приготування і стерилізація композиції Б</i></p>	<p><b>Композиція Б</b></p> <p>Тиск, температура, час, стерильність</p>	<p>Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Тривалість, тиск і температура визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>P = 0,15 МПа, t = 131 °С, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт, Км 4.1.3</p> <p><i>Приготування і стерилізація композиції В</i></p>	<p><b>Композиція В</b></p> <p>Тиск, температура, час, стерильність</p>	<p>Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Тривалість, тиск і температура визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>P = 0,15 МПа, t = 131 °С, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти</p>

<p>Кт, Км, Кх 4.2.1, 4.3.1, <i>Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту у посівному апараті</i></p>	<p><b>Композиція А</b>  Тиск, температура, час, рН, стерильність</p>	<p>Манометр, термометр, годинник, датчик рН, мікробіологічний контроль</p>	<p>Тривалість, тиск, температура і рівень рН визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>P = 0,05 МПа, t = 112 °C, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт, Км, Кх 4.2.2, 4.3.2</p>	<p><b>Композиція Б</b>  Тиск, температура, час, рН, стерильність</p>	<p>Манометр, термометр, годинник, датчик рН, мікробіологічний контроль</p>	<p>Тривалість, тиск, температура і рівень рН визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>P = 0,15 МПа, t = 131 °C, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт, Км, Кх 4.4.1 <i>Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту для виробничого біосинтезу у ферментері</i>  <i>Приготування і стерилізація композиції А</i></p>	<p><b>Композиція А</b>  Тиск, температура, час, рН, стерильність</p>	<p>Манометр, термометр, годинник, датчик рН, мікробіологічний контроль</p>	<p>Тривалість, тиск, температура і рівень рН визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>P = 0,05 МПа, t = 112 °C, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти</p>

Кт, Км, Кх 4.4.2 <i>Приготування і стерилізація композиції Б</i>	<b>Композиція Б</b>  Тиск, температура, час, рН, стерильність	Манометр, термометр, годинник, датчик рН, мікробіологічний контроль	Тривалість, тиск, температура і рівень рН визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P = 0,05 МПа, t = 112 °С, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км, Кх 4.4.3 <i>Приготування і стерилізація композиції В</i>	<b>Композиція В</b>  Тиск, температура, час, рН, стерильність	Манометр, термометр, годинник, датчик рН, мікробіологічний контроль	Тривалість, тиск, температура і рівень рН визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P = 0,15 МПа, t = 131 °С, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км, Кх 4.4.4 <i>Приготування і стерилізація композиції Г</i>	<b>Композиція Г</b>  Тиск, температура, час, рН, стерильність	Манометр, термометр, годинник, датчик рН, мікробіологічний контроль	Тривалість, тиск, температура і рівень рН визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P = 0,15 МПа, t = 131 °С, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 5.1 <i>Підтримання колекційної культури</i>	<b>Колекційна культура <i>Streptomyces peucetius</i> 33-24</b>  Температура, морфологічна однорідність, відсутність неконтрольованих мутацій, відсутність сторонньої мікробіоти	Холодильник, мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль проводять 1 – 2 рази на місяць	t = 2 – 4 °С, τ = 3 – 4 місяці, відсутність сторонньої мікробіоти

<p>Кт, Км 5.2</p> <p><i>Одержання робочої культури</i></p>	<p><b>Колекційна культура <i>Streptomyces peucetius 33-24</i></b></p> <p>Температура, час, морфологічна однорідність, відсутність неконтрольованих мутацій, відсутність сторонньої мікробіоти</p>	<p>Термостат, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура і тривалість визначаються безперервно під час вирощування, мікробіологічний контроль проводять кожні 4 год</p>	<p><math>t = 30\text{ }^{\circ}\text{C}</math>,</p> <p><math>\tau = 48</math> год, відсутність сторонньої мікробіоти</p>
<p>Кт, Км 5.3</p> <p><i>Вирощування культури на агаризованому середовищі</i></p>	<p><b>Колекційна культура <i>Streptomyces peucetius 33-24</i></b></p> <p>Температура, час, морфологічна однорідність, відсутність неконтрольованих мутацій, відсутність сторонньої мікробіоти</p>	<p>Термостат, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура і тривалість визначаються безперервно під час вирощування, мікробіологічний контроль проводять кожні 4 год</p>	<p><math>t = 30\text{ }^{\circ}\text{C}</math>,</p> <p><math>\tau = 24</math> год, відсутність сторонньої мікробіоти</p>
<p>Кт, Км 5.4</p> <p><i>Вирощування культури у колбах на качалках</i></p>	<p><b>Посівний матеріал</b></p> <p>Температура, час, частота обертів качалки, концентрація біомаси, відсутність сторонньої мікробіоти</p>	<p>Термометр, годинник, тахометр, ваговий метод, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура, тривалість і частота обертів контролюються автоматично під час вирощування, визначення концентрації біомаси і мікробіологічний контроль проводять після вирощування</p>	<p><math>t = 30\text{ }^{\circ}\text{C}</math>,</p> <p><math>\tau = 40</math> год, <math>w = 220</math> об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти</p>

<p>Кт, Км, Кх 5.5, 5.6</p> <p><i>Вирощування культури в інокуляторі</i></p>	<p><b>Посівний матеріал</b></p> <p>Температура, час, рН, концентрація розчиненого кисню, концентрація біомаси, відсутність сторонньої мікробіоти, морфологічна відповідність організмів</p>	<p>Термометр, годинник, датчик рН, барботер, ваговий метод, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура, тривалість, рН і концентрація розчиненого кисню контролюються автоматично під час вирощування, визначення концентрації біомаси і мікробіологічний контроль – кожні 4 год</p>	<p>t = 30 °С, τ = 40 год, рН = 6,8-7,0 рО<sub>2</sub> = 20 – 30%, відсутність сторонньої мікробіоти</p>
<p>Кт, Км, Кх 6</p> <p><i>Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 5 м<sup>3</sup></i></p>	<p><b>Культуральна рідина</b></p> <p>Температура, час, рН, концентрація розчиненого кисню, концентрація біомаси, концентрація доксорубіцину, відсутність сторонньої мікробіоти, морфологічна відповідність організмів</p>	<p>Термометр, годинник, датчик рН, барботер, ваговий метод, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура, тривалість, рН і концентрація розчиненого кисню контролюються автоматично під час вирощування, визначення концентрації біомаси, доксорубіцину і мікробіологічний контроль – кожні 4 год</p>	<p>t = 28 °С, τ = 144 год, рН = 6,2 рО<sub>2</sub> = 20 – 30%, Сб = 1,1 г/л, відсутність сторонньої мікробіоти</p>

1. Бондарь Г. В. Онкологія : підруч. / Г. В. Бондарь, Ю. В. Думанський, О. Ю. Попович. – К.: ВСВ «Медицина», 2013. – 9-68 с.
2. Протипухлинні засоби. [Електронний ресурс] – режим доступу: <http://dmupharm.pp.ua/index.php/temi/20-khimioterapevtichni-zasobi-riznikh-grup/228protipukhlinni-zasobi>
3. Природні засоби, протипухлинні антибіотики. [Електронний ресурс] – режим доступу: [https://pidruchniki.com/68396/meditsina/prirodni\\_zasobi](https://pidruchniki.com/68396/meditsina/prirodni_zasobi)
4. Doxorubicin, mesenchymal stem cell toxicity and antitumour activity: implications for clinical use / Baxter-Holland M, Crispin R // Journal of Pharmacy and Pharmacology. – 2018. P. 2-4.
5. An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy / Rivankar, Sangeeta // Journal of Cancer Research and Therapeutics. – 2014. - № 10. – P. 853.
6. X Wang, X Tian, Y Wu, X Shen, S Yang, S Chen / Enhanced doxorubicin production by Streptomyces peucetius using a combination of classical strain mutation and medium optimization // Preparative Biochemistry and Biotechnology. – 2018. – P. 1–8.
7. Тазина Е.В., Игнатъева Е.В., Полозкова А.П., Орлова О.Л., Оборотова Н.А. / Технология получения и анализ термозависимой липосомальной лекарственной формы доксорубицина // Химико-фармацевтический журнал. – 2008. – Том 42, №12. – С. 30-35.
8. Doxorubicin (Code C456), National Cancer Institute [Електронний ресурс] - режим доступу: [https://ncit.nci.nih.gov/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI\\_Thesaurus&ns=NCI\\_Thesaurus&code=C456](https://ncit.nci.nih.gov/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI_Thesaurus&ns=NCI_Thesaurus&code=C456).
9. Doxorubicin [Електронний ресурс] – режим\доступу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68004317>

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.31 КР ПЗ</i>					
<i>Зм</i>	<i>Адж.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ					
<i>Розробник</i>	<i>Кикиридзе Д.В.</i>							<i>Літера</i>	<i>Аджш</i>	<i>Аджшв</i>
<i>Керівник</i>	<i>Тетеріна С.М.</i>								90	96
<i>Н. контр</i>								<i>Кафедра БТМ</i> <sup>90</sup>		
<i>Консульт</i>										
<i>Зав. каф.</i>	<i>Стадніков В.П.</i>									

10. Адриабластин швидкорозчинний – інструкція по використанню. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://tabletki.ua/Адриабластин-быстрорастворимый/12022/>
11. Доксорубіцин. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Doxorubicin>
12. Державний реєстр лікарських засобів України [Електронний ресурс] – режим доступу: <http://www.drlz.com.ua>
13. Доксорубіцин Медак – інструкція по застосуванню. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://tabletki.ua/Доксорубицин-медак/>
14. Доксорубіцин – інструкція по застосуванню [Електронний ресурс] – режим доступу: <http://likicontrol.com.ua/>
15. DOXOrubicin HCl Injection, USP. [Електронний ресурс] – режим доступу: <http://products.fresenius-kabi.us/product-174.html>
16. Doxorubicin (Code C456), National Cancer Institute [Електронний ресурс] – режим доступу: [https://ncit.nci.nih.gov/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI\\_Thesaurus&ns=NCI\\_Thesaurus&code=C456](https://ncit.nci.nih.gov/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI_Thesaurus&ns=NCI_Thesaurus&code=C456).
17. Arcamone, F., Cassinelli, G., Fantini, G., Grein, A., Orezzi, P., Pol, C., & Spalla, C. (1969). Adriamycin, 14-hydroxydaimomycin, a new antitumor antibiotic from *S. Peucetius var.caesius*. *Biotechnol. Bioeng.* 1969, 11(6): 1101–1110. doi:10.1002/bit.260110607
18. *Streptomyces peucetius* mesophilic bacterium that produces antibiotic compounds and was isolated from soil. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://bacdive.dsmz.de/strain/15460>
19. Parte, A.C. LPSN — List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. *Nucleic Acids Res.* 2014, 42: 613–616. doi: 10.1093/nar/gkt1111.
20. Звіт про захворюваність на злоякісні новоутворення. [Електронний ресурс] – режим доступу: <http://medstat.gov.ua/ukr/statdan.html>
21. Контингенти хворих на злоякісні новоутворення. [Електронний ресурс] – режим доступу: [http://www.ncru.inf.ua/publications/BULL\\_22/PDF/str-kont.pdf](http://www.ncru.inf.ua/publications/BULL_22/PDF/str-kont.pdf)

22. Нормативно-директивні документи МОЗ України. [Електронний ресурс] – режим доступу: <http://mozdocs.kiev.ua/likiview.php?id=5030>
23. Уніфікований клінічний протокол первинної, вторинної (Спеціалізованої), третинної (високоспеціалізованої) медичної допомоги, Рак молочної залози, Наказ Міністерства охорони здоров'я України 30.06.2015 №396, с.37
24. Уніфікований клінічний протокол первинної, вторинної (Спеціалізованої), третинної (високоспеціалізованої) медичної допомоги, Рак легені, Наказ Міністерства охорони здоров'я України 4.06.2014 №387, с.32
25. Клінічний протокол, Рак яєчника, Додаток до наказу МОЗ №554 від 17-09-2007 [Електронний ресурс] – Режим\доступу: <http://medstandart.net/browse/2564>
26. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Pathway Database. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>.
27. Starch and sucrose metabolism - *Streptomyces coelicolor* KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Pathway Database. [Електронний ресурс] – режим доступу: [https://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?sco00500](https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?sco00500)
28. Glycolysis / Gluconeogenesis - *Streptomyces coelicolor* KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Pathway Database. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.genome.jp/pathway/sco00010>
29. Pyruvate metabolism - *Streptomyces coelicolor* KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Pathway Database. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.genome.jp/pathway/sco000620>
30. Butanoate metabolism - *Streptomyces coelicolor* KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Pathway Database. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.genome.jp/pathway/sco000650>

31. Valine, leucine and isoleucine biosynthesis - *Streptomyces coelicolor* KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Pathway Database. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.genome.jp/pathway/sco00290>
32. Valine, leucine and isoleucine degradation - *Streptomyces coelicolor* KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Pathway Database. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.genome.jp/pathway/sco00280>
33. Biosynthesis of type II polyketide backbone - *Streptomyces coelicolor* KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Pathway Database. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.genome.jp/pathway/sco01056>
34. Biosynthesis of type II polyketide products - *Streptomyces coelicolor* KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Pathway Database. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.genome.jp/pathway/sco01057>
35. Пирог Т.П., Ігнатова О. А. Загальна біотехнологія: підручник / К. :НУХТ, 2009. – 336 с.
36. Карлаш Ю.В. Основи проектування біотехнологічних виробництв: Конспект лекцій для студентів напряму 6.051401 «Біотехнологія» денної та заочної форм навчання / Уклад.: Ю.В.Карлаш – К: НУХТ, 2013. – 143 с.
37. Грегірчак Н.М. Мікробіологія, санітарія і гігієна виробництв з основами НАССР [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобувачів освітнього ступеня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» освітньо-професійної програми «Біотехнологія» денної та заочної форм навчання / Н.М.Грегірчак – К.: НУХТ, 2020. – 177 с.
38. Техническое моющее средство "Вимол" для молочных и мясоперерабатывающих предприятий. [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://prom.ua/ua/p8345198-tehnicheskoe-moyuschee-sredstvo;all.html>
39. Дезінфекційний засіб з миючим ефектом. [Електронний ресурс] – режим доступу:  
<https://prom.ua/ua/p276027906hlorantoin.html?&primelead=NS4xg>
40. Дезинфицирующее средство Полидез-А. [Електронний ресурс] –

режим доступу: <https://spilnameta.com.ua/p257108626dezinfitsiruyuscheesredstvo-polidez.html>

41. Лічильник дозатор для КАС, води, дизпалива ДТ до 400 л/м. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://prom.ua/p491625353-elektronnyj-promyshlennyj-dozator.html>.

42. Герметичний відцентровий насос з магнітною муфтою DM 10. [Електронний ресурс] – режим доступу: [https://www.vicaqua.com.ua/chemical\\_pumps/pumps\\_magnetic/dm\\_10/](https://www.vicaqua.com.ua/chemical_pumps/pumps_magnetic/dm_10/)

43. Відцентровий вентилятор Dundar CM 21.2. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://mir-ventilacii.com.ua/ua/p24362599-tsentrobezhhnyj-ventilyator-dundar.html>

44. Воздушный кассетный фильтр ФВКАС-6. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://eurofilter.ru/catalogue/17/96/>.

45. Поршневой масляный компрессор Акас В 4900/200 СТ 4. [Електронний ресурс] – режим доступу: <http://www.compressor-rnd.ru/page/b4900-200-ct4.php>

46. Теплообмінник WHE 2020. [Електронний ресурс] – режим доступу: [https://paskal.ua/ua/product/teploobmenik-whe-2020\\_168.html](https://paskal.ua/ua/product/teploobmenik-whe-2020_168.html)

47. Ресивер ПЗВ 900-800-11-01. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.zelko.ua/vozduhopodgotovka/resivery>

48. Теплообмінник нагрівач. [Електронний ресурс] – режим доступу: <http://www.systemair-ukraine.com/ua/air-heaters.html>

49. Фільтр кишеньковий тонкої очистки повітря F5-F9. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://air-klimat.prom.ua/ua/p206908809-filtr-karmannyj-tonkoj.html>

50. Фільтр повітряний. [Електронний ресурс] – режим доступу: <http://atkgroup.com/files/sterilnyj-filtr-ultradepth-ii-psrf.htm>

51. Реактор-змішувач BIOSTAT® Cplus 15 л. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://pcgroup.ru/products/vzryvozaschischennyj-laboratornyj-reaktor-eh-jgr-15-litrov/>

52. Реактор-змішувач BIOSSTAT® Cplus 18 л. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://pcgroup.ru/products/vzryvozaschischennyj-laboratornyj-reaktor-eh-jgr-18-litrov/>
53. Реактор-змішувач «Schulz Technology» 180 л. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://schulz-tech.com.ua/uk/emkostnoe-oborudovanie.html>
54. Реактор-змішувач «Sartorius» 180 л. [Електронний ресурс] – режим доступу: <http://sartorius-sd.com.ua/index.php.html>
55. Реактор-змішувач «Schulz Technology» 2000 л. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://schulz-tech.com.ua/uk/emkostnoe-oborudovanie.html>
56. Реактор-змішувач «Schulz Technology» 2000 л. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://schulz-tech.com.ua/uk/emkostnoe-oborudovanie.html>
57. Реактор-змішувач «Sartorius» 300 л. [Електронний ресурс] – режим доступу:  
<http://sartorius-sd.com.ua/index.php/.html>
58. Реактор-змішувач «Sartorius» 300 л. [Електронний ресурс] – режим доступу: <http://sartorius-sd.com.ua/index.php/.html>
59. Реактор-змішувач «Sartorius» 10 л. [Електронний ресурс] – режим доступу: <http://sartorius-sd.com.ua/index.php/>
60. Реактор-змішувач «Sartorius» 10 л. [Електронний ресурс] – режим доступу: <http://sartorius-sd.com.ua/index.php/>
61. Allegro™ STR Single-Use Stirred Tank Bioreactors . [Електронний ресурс] – режим доступу:  
<https://shop.pall.com/us/en/biotech/cell-culture/bioreactors/zidhslqw8fu>
62. CATALOG-Bioreactor-System-Innova. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://blanc-labo.fr/wp-content/uploads/2017/11/CATALOG-Bioreactor-System-Innova-2016.pdf>
63. Реактор трехслойный PG-III. [Електронний ресурс] – режим доступу: <http://lxn-china.ru/index.php?id=843>
64. Реактор-змішувач «Sartorius» 5 л. [Електронний ресурс] – режим доступу: <http://sartorius-sd.com.ua/index.php/>

65. Spore chain morphology of *Streptomyces peucetius* . [Електронний ресурс] – режим доступу: [https://www.researchgate.net/figure/Spore-chain-morphology-of-Streptomyces-sp-IN2-10-Light-microscopy-1-000\\_fig7\\_51470402](https://www.researchgate.net/figure/Spore-chain-morphology-of-Streptomyces-sp-IN2-10-Light-microscopy-1-000_fig7_51470402)
66. Тодосійчук Т.С., Гордєєв Д.А., Іздебська Т.І.: Наукові вісті НТУУ "КПІ" (2012). Альтернативні компоненти поживних середовищ для актиноміцетів — продуцентів біологічно активних речовин
67. Moore, Geovana Rocha Plácido; Canto, Luciana Rodrigues do; Amante, Edna Regina; Soldi, Valdir (2005). *Cassava and corn starch in maltodextrin production. Química Nova*, 28(4), 596–600. doi:10.1590/S0100-40422005000400008
68. Загальні технології харчової промисловості: Метод. вказівки до вик. лаб. практикуму студ. заоч. форми навчання напряму підготовки 6.051701 «Харчові технології та інженерія» спец. «Технологія продуктів бродіння і виноробства» / Укл.: А.М. Куц, М.В. Бондар, Ю.В. Булій. – К: НУХТ, 2011. – 53 с.