

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

Освітньо-професійна програма « Біотехнології: фармацевтична

промислова, харчова, природоохоронна»

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і

мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ

“ 01 ” березня 2023 року

ЗАВДАННЯ

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

ДАРІЄНКО Павло Русланович

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи **«Одержання біомаси *Vibrio cholerae* для виробництва вакцини протихолерної»**

керівник роботи **доц. Пенчук Юрій Миколайович**

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від 28 березня 2023 року № 193-кс

2. Строк подання здобувачем роботи 12.06.2023

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Vibrio cholerae* JS1569, цільовий продукт: біомаса

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

РОЗДІЛ 1. Опис *Vibrio cholerae* для виробництва протихолерної вакцини;

РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору біологічного агента; РОЗДІЛ 3. Техніко-

економічне обґрунтування; РОЗДІЛ 4. Шлях синтезу біомаси *vibrio cholerae*

js1569; РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми; РОЗДІЛ 6.

Специфікація обладнання доферментаційних процесів та виробничого

біосинтезу; РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми виробничого синтезу

біомаси *vibrio cholerae js1569*; РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва; РОЗДІЛ 9.

Аналіз перспектив впровадження системи екологізації виробництва; РОЗДІЛ

10. Нормативно-технічна документація, використана під час проектування

виробництва

5. Перелік графічного матеріалу Технологічна схема ділянки виробничого біосинтезу біомаси – 1 аркуш формату А1; Апаратурна схема ділянки виробничого біосинтезу біомаси – 1 аркуш формату А1.

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 01 березня 2023 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
	РОЗДІЛ 1. Характеристика анатоксин-вакцини протистафілакокової	01.03.2023 – 05.03.2023	
	РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	06.03.2023 – 11.03.2023	
	РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування	12.03.2023 – 17.03.2023	
	РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту	18.03.2023 – 23.03.2023	
	РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми	24.03.2023 – 05.04.2023	
	РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу	06.04.2023 – 15.04.2023	
	РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу	16.04.2023 – 23.04.2023	
	РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва	24.04.2023 – 26.04.2023	
	РОЗДІЛ 9. Аналіз перспектив впровадження системи екологізації виробництва	27.04.2023 – 31.04.2023	
	РОЗДІЛ 10. Нормативно-технічна документація, використана під час проектування виробництва	01.05.2023-12.05.2023	
	Оформлення пояснювальної записки	13.05.2023-20.05.2023	
	Виконання графічної частини роботи	21.05.2023-31.5.2023	

Здобувач _____
(підпис)

ДАРІЄНКО Павло
(ім'я та прізвище)

Керівник роботи _____
(підпис)

доц. Пенчук Юрій
(ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена розробленню технологічного процесу виробництва біомаси *Vibrio cholerae* JS1569 яка використовується в якості компонента протихолерної вакцини.

Під час розгляду біологічних агентів виду *Vibrio cholerae* було проведено їх порівняння для промислового синтезу біомаси, в результаті порівняння було встановлено що оптимальним біологічним агентом є *Vibrio cholerae* JS1569, через найменшу умовну вартість синтезованої біомаси, через високі показники синтезованого продукту та низьку вартість поживного середовища.

Розглянуто теоретично можливу річну потребу в застосуванні протихолерної вакцини, в якості потенційних споживачів розглядали кількість подорожуючого населення в ендемічні регіони холери. Результатом розрахунків було визначено що річна потреб в препараті становить 235,2 кг біологічної маси *Vibrio cholerae*.

З наявних даних розроблено технологію отримання біомаси *Vibrio cholerae* JS1569 яка складається з допоміжних робіт, які передбачають підготовку повітря, приготування регуляторів рівня рН, приготування та стерилізації розчину мікроелементів, приготування розчину глюкози для дробного внесення на виробничий синтез і приготування поживного середовища та технологічного процесу – отримання посівного матеріалу *Vibrio cholerae* JS1569 та виробничий синтез біомаси *Vibrio cholerae* JS1569.

Кваліфікаційна робота складається з вступу, десяти розділів, списку використаної літератури (49 найменувань), технологічної та апаратурної схеми (2 аркуші формату А1). Роботи викладена на 70 сторінках та вміщає 14 таблиць і 7 рисунків.

Ключові слова: *Vibrio cholerae* JS1569, протихолерна вакцина, дробне внесення глюкози для покращеного синтезу біомаси.

					НУХТ БТЕК 04.03.40 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Дарієнко П.Р.			РЕФЕРАТ	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Пенчук Ю.М.					2	70
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	4
ВСТУП	7
РОЗДІЛ 1. Опис <i>Vibrio cholerae</i> для виробництва протихолерної вакцини	8
РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору біологічного агента	12
2.1. Обґрунтування вибору штаму <i>Vibrio cholerae</i>	12
2.2. Перевірочний розрахунок складу поживного середовища	21
2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента	22
2.4. Таксономічний статус біологічного агента	24
РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування	25
3.1. Потреба в протихолерній вакцині	25
3.2. Розрахунок потужності виробництва протихолерної вакцини	26
3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів	27
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу <i>Vibrio cholerae</i>	28
РОЗДІЛ 4. Шлях синтезу біомаси <i>vibrio cholerae</i> js1569	32
РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми	34
5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого синтезу біомаси <i>Vibrio cholerae</i> JS1569	34
5.1.1. Обґрунтування способу культивування <i>Vibrio cholerae</i> JS1569 і типу ферментера	34
5.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря ..	35
5.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів на технологічний процес отримання біомаси <i>Vibrio cholerae</i> JS1569	36
5.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для синтезу біомаси <i>Vibrio cholerae</i> JS1569	41

					НУХТ БТЕК 04.03.40 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	ЗМІСТ		
Розроб.		Дарієнко П.Р.					
Перевір.		Пенчук Ю.М.					
Консультант							
Н. Контр.							
Затверд.		Стабніков В.П.					
					Літ.	Арк.	Аркушів
					3	74	
					Кафедра БТМ		

РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу.....	44
РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми виробничого синтезу біомаси <i>vibrio cholerae</i> js1569	47
РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва.....	59
8.1. Мікробіологічний контроль	59
8.2. Показники росту і синтезу цільового продукту.....	60
8.2.1. Концентрація біомаси.....	60
8.2.2. Концентрація живих клітин	60
8.2.3. Концентрація джерела вуглецю	61
8.2.4. Концентрація джерела азоту.....	62
8.3. Карта постадійного контролю	63
РОЗДІЛ 9. Аналіз перспектив впровадження системи екологізації виробництва	68
9.1. Система знешкодження рідких відходів.....	68
9.2. Система знешкодження газоподібних відходів	69
9.3. Знешкодження твердих відходів	70
РОЗДІЛ 10. Нормативно-технічна документація, використана під час проектування виробництва.....	71
ЛІТЕРАТУРА	72
ДОДАТКИ.....	77

ВСТУП

На сьогоднішній день холера залишається однією з основних проблем охорони здоров'я світового значення, актуальної в основному для країн, у яких відсутній доступ до чистої питної води та належні засоби санітарії та гігієни, або в країнах зі складною військово-політичною обстановкою, чи постраждалих від надзвичайних ситуацій. За деякими оцінками, у світі щорічно реєструються від 1,3 до 4,0 млн випадків захворювань на холеру, при цьому гинуть від 21 000 до 143 000 осіб.

Збудником холери є токсигенні штами *Vibrio cholerae* O1 та O139 серогруп. Серогрупа O1 по ряду фенотипічних та генетичних ознак поділяється на два біовари – класичний та Ель-Тор. Також O1 серогрупа за структурою ліпополісахариду (ЛПС) класифікується на три серотипи: Інаба, Огава та Гікошіма. Відомо, що перші шість пандемій холери (1816–1926 рр.) були викликані *V. cholerae* O1 класичного біовара, тоді як збудником сьомої пандемії (з 1961 р. по теперішній час) є *V. cholerae* O1 Ель-Тор. З 1992 вібріони нової O139 серогрупи викликали великі спалахи холери в країнах Південно-Східної Азії. В останні роки епідемії холери були викликані «зміненими» варіантами *V. cholerae* Ель-Тор, що мають характерні фенотипічні властивості Ель-Тор біовара, але продукують холерний токсин класичного біовара [1].

Все вищевикладене диктує необхідність оцінити з нових позицій потребу у проведенні масової вакцинації проти холери та її забезпечення у сучасних умовах. Останні епідемії холери показали, що продовжує залишатися суттєва потреба у ефективній економічній вакцині проти холери, що і обумовлює **актуальність даної роботи.**

Новизною роботи є використання штаму *Vibrio cholerae* JS1569, який утворює високу кількість біомаси 22,9 г/л на дешевому середовищі з глюкозою за 12 годин культивування.

					НУХТ БТЕК 04.03.40 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Дарієнко П.Р.			ВСТУП	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Пенчук Ю.М.					5	74
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

РОЗДІЛ 1

ОПИС *VIBRIO CHOLERAЕ* ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА ПРОТИХОЛЕРНОЇ ВАКЦИНИ

Холера відноситься до групи антропонозів і є небезпечною гострою кишковою інфекцією з фекально-оральним механізмом зараження та шляхами поширення: харчовим, контактено-побутовим та провідним водним. Збудники інфекції – токсигенні холерні вібріони серологічних груп О1 та О139 (*Vibrio cholerae* О1 та *V. cholerae* О139) – віднесені до мікроорганізмів II групи патогенності (небезпеки) [2].

Раніше у світі для профілактики холери використовувалися різні парентеральні вакцини, включаючи інактивовані цільноклітинні, очищені ліпополісахаридні, інактивовані цільноклітинні з різними ад'ювантами та ліпополісахарид-холероген кон'юговані вакцини. У СРСР були дозволені до застосування холерна вакцина, що складається з суспензії вбитих мікробних клітин холерного вібріона, і холероген-анатоксин, що був очищений і концентрований центрифугат бульйонної культури токсигенного штаму *V. cholerae* 569В. Парентеральні холерні вакцини були малоефективними (менше 50%), забезпечували нетривалий захист (3-6 міс.) і мали високий ризик виникнення небажаних реакцій: внутрішньом'язове або підшкірне введення препарату призводило до локального болю, еритеми, ущільнення м'яких тканин, біль у більшості вакцинованих людей. У зв'язку із цим ВООЗ не рекомендує застосування парентеральних холерних вакцин [1].

Наступні численні дослідження показали, що імунітет людини проти холери в основному обумовлений антибактеріальними та антитоксичними інтерстиціальними антитілами (sIgA) до ЛПС та ХТ. При цьому встановлено, що сироваткові вібріоцидні антитіла, які виявляються в сироватці крові людей, які перенесли холеру, або вакцинованих осіб, незважаючи на кореляцію між

					НУХТ БТЕК 04.03.40 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Дарієнко П.Р.			РОЗДІЛ 1. Опис <i>Vibrio cholerae</i> для виробництва протихолерної вакцини	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Пенчук Ю.М.					6	74
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

підвищенням рівня їхнього титру та зниженням ризику інфікування, неможливо розглядати як безпосередній захист від холери. Таким чином, розуміння механізму формування місцевого імунітету кишечника проти вібріонів *V. cholerae* зумовило створення оральних холерних вакцин, що показали свою безпеку та більш високу ефективність порівняно з парентеральними холерними вакцинами [1].

Суперечливими є дані про ефективність специфічної імунопрофілактики при холері пояснюються різною імуногенністю застосовуваних вакцин та способами їх аплікації [2].

Оральна холерна вакцина WC-rBS (Dukoral®, SBL, Швеція) – містить вбиті цільні клітинн, збагачена рекомбінантною В-субодиницею холерного ентеротоксину, та оральна жива холерна вакцина CVD-103 HgR (Orochol або Muta WC-rBS (Dukoral®) складається з убитих формаліном або нагріванням клітин холерного вібріону обох біоварів і сероварів та В-субодиниці холерного токсину, отриманої або препаративними хімічними методами з холерного ентеротоксину, або з використанням генетичної рекомбінантної технології. Пероральна вакцинація проводиться за дворазовою схемою з 10 – 14-денним інтервалом, вакцина розводиться у 150 мл води у суміші з буфером. Розвиток напруженого імунітету спостерігається вже через тиждень після останнього введення препарату та зберігається протягом трьох років у 70 % вакцинованих старше п'яти років. Вакцина залишається стабільною протягом трьох-чотирьох років, якщо зберігається при 4 °С, та протягом одного місяця – при 37 °С. Для мандрівників вартість однієї дози вакцини Dukoral® не перевищує 10 доларів США.

Холерна вакцина, вироблена у В'єтнамі Національним інститутом гігієни та епідеміології (НИНЕ), є цільноклітинним компонентом вакцини WC-rBS без субодиниці В і застосовується тільки в цій країні. Протективна ефективність цієї вакцини становить 66 % серед дорослого населення та 68 % – серед дітей віком від одного до п'яти років. Розроблено бівалентний варіант вакцини, що включає інактивовані клітини *V. cholerae* O139. Клінічні

випробування бівалентної вакцини показали її імунологічну ефективність та безпеку для дорослих та дітей віком від одного року. Досягнуто угоди між В'єтнамом, Китаєм та Індонезією про передачу технології виробництва цієї вакцини.

Shanchol™ — це вбита пероральна вакцина проти холери, яка складається з убитих цільноклітинних серогруп O1 і O139 без СТВ, по суті, ідентична за складом mORC-Vax™. Зокрема, він включав чотири штами *V. cholerae*, формаліном інактивованій O1 Inaba E1 Tor, штам Phil 6973, термоінактивованій O1 Ogawa класичний штам Cairo 50, формалін інактивованій O1 Ogawa класичний штам Cairo 50, термоінактивованій O1 Inaba класичний штам Cairo 48 та інактивованій формаліном O139 штам 4260. Щоб забезпечити доступність нового оновленого OCV за межами В'єтнаму та закупівлю агентствами ООН, вакцина повинна відповідати вимогам ВООЗ. Відповідно, IVI передала технологію розробки продукту, що використовується для mORC-Vax™, компанії Shantha Biotechnics, Індія. Shanchol™ було ліцензовано в Індії в лютому 2009 року, а ВООЗ пройшла попередню кваліфікацію у вересні 2011 року.

OraVacs — це кишковорозчинна капсула, що містить інактивовану цільну клітину (WC) *Vibrio cholerae* O1 класичного біотипу або біотипу E1 Tor і рекомбінантну субодиницю В холери (rBS). За складом він майже схожий на Dukoral®. OraVacs показаний для захисту від холери та діареї мандрівників, спричиненої ЕТЕС, у дітей віком від 2 років, підлітків і дорослих, які мають контакт або мають ризик контакту з цим захворюванням. Для початкової імунізації слід прийняти три капсули в дні 0, 7 і 28. OraVacs було перевірено на безпеку та імуногенність у спільному дослідженні, яке показало, що висока доза (5 мг rBS і 10¹¹ WC) і низька доза (1 мг rBS і 10¹¹ WC) вакцини є безпечними та імуногенними порівняно з плацебо. Наразі немає клінічної оцінки ефективності. OraVacs ліцензовано лише в Китаї та на Філіппінах [3].

Жива оральна холерна вакцина CVD-103 HgR (Orochol або Mutacol) створена в США на основі штаму *V. cholerae* CVD-103 HgR, що походить з високотоксичного штаму *V. cholerae* 569B classical Inaba, в якому з гена, що кодує синтез холерного токсину, було видалено ділянку, відповідальну за синтез токсичної субодиниці А. Штам *V. cholerae* CVD-103 HgR забезпечував напрацювання специфічних антитіл і захист добровольців від зараження, добре показав себе в польових дослідженнях в Малі та Бангладеші [2].

Однак результати чотирирічних контрольованих польових випробувань в Індонезії не підтвердили високу ефективність цієї вакцини у випадках холери, що викликається холерним вібрионом eltor, як і випробування у дітей віком від двох до дев'яти років у країнах Азії та Латинської Америки. Крім того, у 15 % вакцинованих живою оральною холерною вакциною CVD-103 HgR розвивається діарея, у 9 % – спостерігається нудота або блювота. У 2004 році випуск цієї вакцини було припинено, а її виробник – Berna Biotech (Швейцарія) перейшов на випуск WC-rBS (Dukoral®).

З впровадженням у практику досягнень сучасної молекулярної біології, генної інженерії та біотехнології з'явилася можливість конструювання ефективних безпечних вакцин холерних нового покоління для перорального застосування. Виділяється два провідних напрями, у межах яких проводяться основні дослідження. Перше їх пов'язані з створенням живих вакцин, друге – спрямовано розробку безпечних високоефективних неживих вакцин (хімічних, кон'югованих, з урахуванням технології отримання про тіней, тобто порожніх клітин грамнегативних бактерій; трансгенних вакцин та інших).

Низка кандидатів у живі вакцини розроблені в США (Peru-15, CVD-111, 112), на Кубі (*V. cholerae* 638, Cuban Finley Institute), у Китаї (*V. cholerae* JEM 109) і знаходяться на стадії доклінічних та клінічних преліцензійних випробувань [2].

РОЗДІЛ 2

ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

2.1. Обґрунтування вибору штаму *Vibrio cholerae*

З впровадженням у практику досягнень сучасної молекулярної біології, генної інженерії та біотехнології з'явилася можливість конструювання ефективних безпечних вакцин холерних нового покоління для перорального застосування. Виділяються два провідні напрямки, у межах яких проводяться основні дослідження. Перше їх пов'язане зі створенням живих вакцин, друге спрямовано розробку безпечних високоефективних неживих вакцин (хімічних, кон'югованих, вакцин з урахуванням технології отримання про «тіней», тобто порожніх клітин грамнегативних бактерій; трансгенних вакцин та інших.) [4].

Зважаючи на вищеописане, необхідно приділити увагу вибору найефективнішого продуцента для отримання протихолерної вакцини.

Дослідження ферментації високої щільності клітин проводили у роботі [5] для отримання субодиноци В термолабільного ентеротоксину *Escherichia coli* (LTV) з культури *Vibrio cholerae*, яка несе рекомбінантну плазмиду з геном стійкості до ампіциліну, промотором *tac* і геном, що кодує LTV. У цьому дослідженні використовували клітини *Vibrio cholerae* JBK 70, що містять плазмиду рММВ68. Культивування проводили з підживленням протягом 10 годин, швидкість перемішування становила 300-500 об/хв, витрата повітря 1-2 об/об для підтримки концентрації розчиненого кисню вище 20 % насичення повітря, а температура культивування становила 37 °С, рН підтримували на рівні 7,5 за допомогою розчину лугу (NaOH). При застосуванні підживлення у процесі культивування *V. cholerae* JBK 70 концентрація біомаси в кінці процесу була високою і становила 20 г/л. У роботі використовували таке поживне середовище, г/л:

					НУХТ БТЕК 04.03.40 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Дарієнко П.Р.			Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Пенчук Ю.М.				10	74
Консультант					Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Затверд.		Стабніков В.П.					
РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору біологічного агента							

- Бакто-триптон – 5;
- Казамінокислоти – 2;
- Дріжджовий екстракт – 5;
- Глюкоза – 6;
- $MgSO_4 \cdot 6H_2O$ – 0,2;
- $CaCl_2$ – 0,02;
- KH_2PO_4 – 3;
- Na_2HPO_4 – 6;
- NH_4Cl – 0,5;
- $NaCl$ – 0,2;
- Глутамінова кислота – 3;
- Розчин мікроелементів – 1 мл/л (10 мг/л $AlCl_3 \cdot 6H_2O$, 4 мг/л $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 1 мг/л $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0,5 мг/л H_3BO_3 , 10 мг/л $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 1 мг/л $NiCl_2 \cdot 6H_2O$, 2 мг/л $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 2 мг/л $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 40 мг/л $FeSO_4 \cdot 6H_2O$ та 40 мг/л етилендіамін тетраоцтової кислоти).

Для підживлення готували 50 %-ий розчин глюкози, який подавали разом із запасним розчином інших компонентів поживного середовища періодично у процесі культивування [5].

Зараження холерним вібрионом є серйозною проблемою в багатьох країнах, що розвиваються. Культивування *V. cholerae* використовується для виробництва субодиниці холерного токсину В, що є компонентом холерної вакцини. У дослідженні [6] були проведені періодичні культивування *V. cholerae* JS1569 у визначених середовищах та було отримано відтворювані результати. Суху масу клітин у кількості 22,9 г/л отримували через 12 год культивування. Вирощування проводили при рН 7,5, швидкості перемішування 160 об/хв, температурі 36 °С, витраті повітря 0,5 об/об. Під час вирощування в ферментері джерело вуглецю вносили дробно.

Таким чином, дослідниками було встановлено, що таке культивування з підживленням дозволило досягти високої кількості біомаси збудника холери після 12 годин його вирощування [6].

Під час періодичного глибинного культивування в статі [7] досліджено спосіб накопичення антигенів та біомаси *V. cholerae* 569В Інаба. Штам вирощували при 37°C в біореакторі у середовищі з ферментативного гідролізату казеїну в умовах глибинного культивування. Через 10 год вирощування припиняли додаванням формаліну до кінцевої концентрації 0,6%. Так, після 10 годин аеробного культивування з підживленням вдалось досягти кількості біомаси 17,8 г/л при початковій концентрації глюкози у середовищі 22 г/л.

Автори зазначають, що розчин для підживлення становив собою 40%-ий розчин глюкози, а поживне середовище на основі ферментативного гідролізату казеїну складалось із:

- NaCl – 0,5 % (5 г/л),
- Na₂HPO₄ – 0,06 % (0,6 г/л),
- пептон до 1% (10 г/л).

При цьому вміст амінного азоту становив 2 г/л. Концентрацію ферментативного гідролізату казеїну у середовищі не вказано (оскільки це основа цього середовища), тому надалі вартість даного середовища будемо розраховувати за тими компонентами, концентрація яких є відомою.

Загальні відомості для здійснення порівняння описаних штамів-продуцентів біомаси для виробництва вакцини протихолерної наведено у табл. 2.1.

З таблиці 2.1 видно, що найбільшу кількість біомаси синтезував штам *V. cholerae* JS1569 – 22,9 г/л, а найменше біомаси збудника холери отримали при культивуванні *V. cholerae* 569В Інаба, її кількість становила 17,8 г/л, однак штам JS1569 культивували на 20 год більше, у порівнянні з іншими.

Але цієї інформації для вибору продуцента біомаси з метою виробництва вакцини протихолерної недостатньо, у зв'язку з цим на

наступному етапі порівняємо розраховану ціну поживних середовищ для культивування штамів *V. cholerae* (табл. 2.2).

Таблиця 2.1

Загальна характеристика продуцентів біомаси для виробництва вакцини протихолерної

Біологічний агент	Склад поживного середовища, г/л	Концентрація біомаси, г/л	Тривалість культивування, год	Умови культивування	Посилання
<i>V. cholerae</i> JBK 70	Бакто-триптон – 5; Казамінокислоти – 2; Дріжджовий екстракт – 5; Глюкоза – 6; $MgSO_4 \cdot 6H_2O$ – 0,2; $CaCl_2$ – 0,02; KH_2PO_4 – 3; Na_2HPO_4 – 6; NH_4Cl – 0,5; $NaCl$ – 0,2; Глутамінова кислота – 3; Розчин мікроелементів – 1 мл/л (10 мг/л $AlCl_3 \cdot 6H_2O$, 4 мг/л $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 1 мг/л $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0,5 мг/л H_3BO_3 , 10 мг/л $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 1 мг/л $NiCl_2 \cdot 6H_2O$, 2 мг/л $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 2 мг/л $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 40 мг/л $FeSO_4 \cdot 6H_2O$ та 40 мг/л етилендіамін тетраоцтової кислоти)	20	10	300-500 об/хв, витрата повітря 1-2 об/об для підтримки концентрації розчиненого кисню вище 20% насичення повітря, температура 37°C, рН підтримували на рівні 7,5 за допомогою розчину лугу (NaOH)	[5].

Закінчення табл. 2.1

<p><i>V. cholerae</i> JS1569</p>	<p>Глюкоза – поч. – 10, кінц. - 60 (NH₄)₂SO₄ – 0,63 K₂HPO₄ – 2,53 KH₂PO₄ – 0,4 NH₄Cl – 0,13 Цитрат натрію – 0,13 MgSO₄ 1,2 М – 3 Розчин мікроелементів – 1 мл, вміст компонентів у г/л: FeCl₃*6H₂O – 8,1, ZnSO₄*7H₂O – 0,36, CuSO₄*5H₂O – 0,31, Na₂-EDTA*2H₂O – 1, CoCl₂*6H₂O – 0,36, MnSO₄*H₂O – 0,3, CaCl₂*2H₂O – 1.</p>	22,9	12	<p>pH 7,5, 160 об/хв, температура 36°C, витрата повітря 0,5 об/об середовища, дробне внесення глюкози</p>	[6].
<p><i>V. cholerae</i> 569B Інаба</p>	<p>Основа – основа ферментативний гідролізат казеїну; NaCl – 0,5 % (5 г/л), Na₂HPO₄ – 0,06 % (0,6 г/л), Пептон до 1% (10 г/л), Глюкоза – 22 г/л (у процесі підживлення 40%-им розчином).</p>	17,8	10	<p>Аеробні умови, температура 37°C.</p>	[7].

Ціна поживних середовищ для культивування штамів *V. cholerae*

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації (1,2,3)*	
<i>V. cholerae</i> JBK 70	Бакто-триптон – 5;	4 772,8	23,8	1	
	Казамінокислоти – 2;	18836,83	37,6	2	
	Дріжджовий екстракт – 5;	1100	5,5	3	
	Глюкоза – 6;	18	0,1	4	
	MgSO ₄ · 6H ₂ O – 0,2;	11	0,002	5	
	CaCl ₂ – 0,02;	16	0,0003	6	
	KH ₂ PO ₄ – 3;	120	0,3	7	
	Na ₂ HPO ₄ – 6;	42	0,2	8	
	NH ₄ Cl – 0,5;	21	0,01	9	
	NaCl – 0,2;	5,5	0,001	7	
	Глутамінова кислота – 3;	870	2,6	10	
	AlCl ₃ · 6H ₂ O – 10 мг/л	81	0,0008	11	
	CoCl ₂ · 6H ₂ O – 4 мг/л	650	0,002	12	
	CuSO ₄ · 5H ₂ O – 1 мг/л	179	0,0002	13	
	H ₃ BO ₃ – 0,5 мг/л	28	0,00001	14	
	MnCl ₂ · 4H ₂ O – 10 мг/л	58	0,0006	7	
	NiCl ₂ · 6H ₂ O – 1 мг/л	210	0,0002	15	
	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O – 2 мг/л	1320	0,002	16	
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O – 2 мг/л	80	0,0001	7	
FeSO ₄ · 6H ₂ O – 40 мг/л	40	0,001	17		
Етилендіамін тетрацтової кислоти – 40 мг/л	50	0,002	18		
Вартість 1 л середовища становить – 70,1 грн					
<i>V. cholerae</i> JS1569	Глюкоза – 60	18	1,08	4	
	(NH ₄) ₂ SO ₄ – 2,5	71	0,177	24	
	K ₂ HPO ₄ – 10,1	125	1,26	23	
	KH ₂ PO ₄ – 1,57	120	0,188	7	
	NH ₄ Cl – 0,5	21	0,01	9	
	Цитрат натрію – 0,5	124	0,062	25	
	MgSO ₄ 1,2 М – 3	11	0,033	5	
	Розчин мікроелементів – 1 мл	1,21	0,0012		
	Розчин мікроелементів – 1,21 грн				
	FeCl ₃ *6H ₂ O – 8,1	105	0,85	19	
	ZnSO ₄ *7H ₂ O – 0,36	80	0,03	7	
	CuSO ₄ *5H ₂ O – 0,31	179	0,05	13	
	Na ₂ -EDTA*2H ₂ O – 1	50	0,05	18	
	CoCl ₂ *6H ₂ O – 0,36	650	0,2	12	
	MnSO ₄ *H ₂ O – 0,3	58	0,02	20	
	CaCl ₂ *2H ₂ O – 1	16	0,01	6	
Вартість 1 л середовища становить – 2,81 грн					

<i>V. cholerae</i> 569В Інаба	Глюкоза – 22	18	0,39	4
	NaCl – 5	5,5	0,03	7
	Na ₂ HPO ₄ – 0,6	42	0,02	21
	Пептон – 10	266,1	2,6	22
Вартість 1 л середовища становить – 3,04 грн				

Примітка: * – ціни наведено з урахуванням ПДВ станом на червень 2022 року

- 1 – <https://shop.hlr.ua/pepton-tripton-merck-115290.html>
- 2 – <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/223050>
- 3 – <https://prom.ua/p1086437845-ekstrakt-drozhzhej.html>
- 4 – <https://flagma.ua/glyukoza-dekstroza-o2394980.html>
- 5 – <https://flagma.ua/magniy-sernokisly-sulfat-magniya-o2616951.html>
- 6 – https://zakupka.com/p/2165261-kalciy-hloristy-pishchevoy-i-tehnicheskij-kupit-s-dostavkoy-po-ukraine/?e=1&i=j2xFaDO884Nv4IPR8G25-jJKC-cwc-WA-4Vlg3qH5x81cI9RjqNZ9SjzBzhXPdDbQiSiNCuo5szpxZz4vpuxh_0RD53AW1XcIZTvseeL7jX0ordasJ8REbTYAdNB-S4zbKv5eKCrMtigwg_regbKUO11zbip-S-hdFyOeLTCeI=&gclid=Cj0KCQjw-pCVBhCFARIsAGMxhAdDfAdRxbWUv9joZ0g7dMJhrGZFzZl-GCT0IU70tJRopSk2Vij28aAtbxEALw_wcB
- 7 – <https://prom.ua/ua>
- 8 – <https://selitra.biz/p1178653379-natrij-phosphornokislyj-1-zameschennyj-b-v-pisch.html>
- 9 – <https://selitra.biz/p616272092-ammonij-hloristyj-kristallicheskij.html>
- 10 – <https://prom.ua/p617664251-glutaminovaya-kislota-glu.html>
- 11 – <https://shop.hlr.ua/alyuminiy-hloristyj-97729.html>
- 12 – <https://medoprom.com.ua/product/kobalt-khloristyj-1kg>
- 13 – <https://eurozakup.com.ua/product-sulfat-medi-5h2o-chistyj-cuso4-5kg-pieciowodny-7150014892.html>
- 14 – https://runa-inter.all.biz/bornaya-kislota-h3bo3-g12194394?utm_currency=UAH&utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=shopping_ua_personal&utm_content=268940
- 15 – https://tdchem.com.ua/product/%D0%BD%D0%B8%D0%BA%D0%B5%D0%BB%D1%8C-%D1%85%D0%BB%D0%BE%D1%80%D0%B8%D1%81%D1%82%D1%8B%D0%B9/?utm_source=Google%20Shopping&utm_campaign=tdchem&utm_medium=cpc&utm_term=430
- 16 – https://www.systopt.com.ua/ru/item-natrij-molibdenovokyslyj-molibdat-natriyu?utm_source=google&utm_medium=shopping

- 17 – <https://klebrig.com.ua/>
- 18 – <https://selitra.biz/p220671637-trilon.html>
- 19 – https://www.systopt.com.ua/ru/item-zalizo-iii-hlorne?utm_source=google&utm_medium=shopping
- 20 – <https://rozetka.com.ua/333561850/p333561850/>
- 21 – <https://selitra.biz/p1178653379-natrij-phosphornokislyj-1-zameschennyj-b-v-pisch.html>
- 22 – https://russian.alibaba.com/p-detail/Manufacturer-60735200013.html?spm=a2700.7724857.normal_offer.d_image.686f6aeaqWNOx4
23. <https://prom.ua/ua/p1262306581-kaltsij-fosfornokislyj-zameschennyj.html?&primelead=NC4z>
24. https://svitidey.com/product/362701-sulfat-amoniyu-amoniy-sirchanokislyj-for-nh4-2so4-1kg-tmukrayina.html?gclid=CjwKCAjw-IWkBhBTEiwA2exyO863LXf2P0ki9Znj2G5yAwj5aUPwOtwRHCHzE4_7D9CiQ2fR7dzi5RoCJn4QAvD_BwE
25. https://klebrig.com.ua/ua/p1199499510-tsitratt-natriya-klebrig.html?source=merchant_center&utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=Perf_Max-Turboweb&gclid=CjwKCAjw-IWkBhBTEiwA2exyOyctHls7TrJs3yBCCCuypRGUVWKywnH46KZ1Vy8fJgg_By_MhlpNwnxoCffMQAvD_BwE

Виходячи з розрахунків вартості поживних середовищ, поданих у табл. 2.2, бачимо, що найдорожчим є 1 л середовища для культивування *V. cholerae* JBK 70, оскільки його вартість склала 70,1 грн, натомість 1 л середовища для вирощування штаму *V. cholerae* JS1569 майже у 25 разів дешевший, оскільки ціна становить 2,81 грн. В 1,08 рази дорожчим виявилось середовище для *V. cholerae* 569В Інаба – 3,04 грн за 1 л.

Після порівняння вартості поживних середовищ на заключній стадії розрахуємо умовну вартість 1 г біомаси. Результати розрахунків подано у таблиці 2.3.

Умовна вартість 1 г біомаси при культивуванні штамів *V. cholerae*

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища, грн	Концентрація біомаси, г/л	Умовна вартість 1 г біомаси, грн	Час культивування, год	Кількість біомаси синтезованої за годину, г/л
<i>V. cholerae</i> JBK 70	70,1	20	3,5	10	2
<i>V. cholerae</i> JS1569	2,81	22,9	0,12	12	1,9
<i>V. cholerae</i> 569B Інаба	3,04	17,8	0,17	10	1,78

Так, дивлячись на дані з табл. 2.3, підсумуємо, що кількість біомаси, синтезованої за 1 год штамми *V. cholerae* JBK 70 та JS1569, є практично однаковою, але їх умовні вартості 1 г біомаси відрізняються, це значення для штаму *V. cholerae* JS1569 є найнижчим, а у *V. cholerae* JBK 70 – найвищим серед трьох біологічних агентів.

Зважаючи на високий рівень утворення біомаси та дешеве поживне середовище, найкращим біологічним агентом для виробництва вакцини протихолерної є *V. cholerae* JS1569.

2.2. Перевірочний розрахунок складу поживного середовища

За 12 год вирощування *Vibrio cholerae* JS1569 синтезує 22,9 г/л біомаси, для визначення правильності наведеного середовища розглянемо потреби в джерелах карбону та нітрогену які необхідні для отримання даного виходу біомаси.

Розрахунок вмісту в середовищі джерела карбонового живлення

Потреби для синтезу біомаси. У біомасі міститься 50 % карбону, отже вміст карбону у 22,9 г біомаси становитиме $22,9 \times 0,5 = 11,45$ г, а також слід врахувати витрату карбону на «холосте окислення», які знаходять приблизно на рівні 50 %, підсумовуючи загальна кількість карбону повинна бути на рівні $11,45 \times 2 = 22,9$ г

Дізнаємося яку кількість глюкози необхідно помістити в поживне середовище для задоволення даної потреби, молярна маса глюкози – 182

г/моль, молярна маса карбону в глюкозі – 72 г/моль, отже кількість глюкози становитиме:

$$22,9 \times 182 / 72 = 57,8 \text{ г/л}$$

В наявному поживному середовищі наведено що початкова концентрація глюкози становить 10 г/л, а також вноситься підживлювальний розчин глюкози, кількість внесеного розчину не наведена, але можна зробити висновок, що необхідно дробно внести $57,8 - 10 = 47,8$ г/л глюкози, для зручності подальших розрахунків приймемо дане значення на рівні 50 г/л.

Розрахунок вмісту в середовищі джерела нітрогенового живлення

Потреби для синтезу біомаси. В біомасі міститься 10 % нітрогену, таким чином, у 22,9 г біомаси вміст азоту становить 2,29 г.

Дізнаємося яку кількість сульфату амонію необхідно помістити в поживне середовище для задоволення даної потреби, молярна маса $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 132 г/моль, молярна маса нітрогену в $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 28 г/моль, отже кількість сульфату амонію становитиме:

$$2,29 \times 132 / 28 = 10,8 \text{ г/л}$$

Середовище для виробництва вакцини протихолерної з використанням штаму *V. cholerae* JS1569 містить в якості джерела нітрогену лише 2,5 г/л $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, отже для задоволення потреби в нітрогені необхідно збільшити кількість сульфату амонію в поживному середовищі на $10,8 - 2,5 = 7,5$ г/л.

Інші компоненти середовища

Джерелами таких необхідних для росту бактерій елементів, як Магній, Кальцій і Ферум є MgSO_4 , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ та $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, які вносяться у середовище в достатній кількості.

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

Vibrio cholerae JS1569 (з лат. *vibrio* – «вібрувати») – невеликі прями, злегка зігнуті, зігнуті або комоподібні грамнегативні палички розміром $0,5 - 0,8 \times 1,4 - 2,6$ мкм (рис. 2.1). У зрілих культурах і за несприятливих умов можуть спостерігатися закручені форми. Спор не утворює. В рідких

середовищах є рухливими за рахунок монотрихіяльно або мультитрихіяльно розташованих джгутиків, покритих оболонкою. Під час росту на гліцеринвмісних середовищах може накопичувати полігідроксибутират всередині клітин. Колонії *Vibrio cholerae* JS1569 на агаризованих середовищах – гладенькі, напівпрозорі, кремового кольору, з рівними краями. В зрілих культурах можуть спостерігатися зморшкуваті колонії, утворені шляхом агрегації великої кількості клітин і екзополісахаридів [8].

Vibrio cholerae JS1569 – факультативний анаероб, який росте за нейтральних значень рН та для якого оптимальною температурою росту є 30 °С (при цьому здатен рости за 35 °С і 40 °С, не здатен – за 4 °С). Здатен відновлювати нітрати до нітритів. Здатен рости за концентрації натрію хлориду ці 1 %. Пігментів не утворює. Люмінесценція відсутня. Дає позитивний результат у тестах на оксидазу, амілазу, хітиназу, желатиназу, ліпазу та реакцію Фогеса-Проскауера, негативний – у тесті на альгіназу та утворення газу з глюкози. Утворює кислоту з галактози, глюкози, мальтози, маніту, сахарози, трегалози, манози. Метаболізує галактозу, глюконат, глутамат, кетоглутарат, DL-лактат, DL-малат, маніт, пролін, пропіонат, піруват, сахарозу, трегалозу, не метаболізує – аланін, арабінозу, целобіозу, аміновалеріат, амінобутират, етанол, галактуронат, глюкуронат, глутарат, гептаноат, *n*-гідроксибензоат, гідроксибутират, лактозу, лейцин, мелібіозу, путресцин, саліцин, сорбіт, тирозин, валеріат, ксилозу [8].

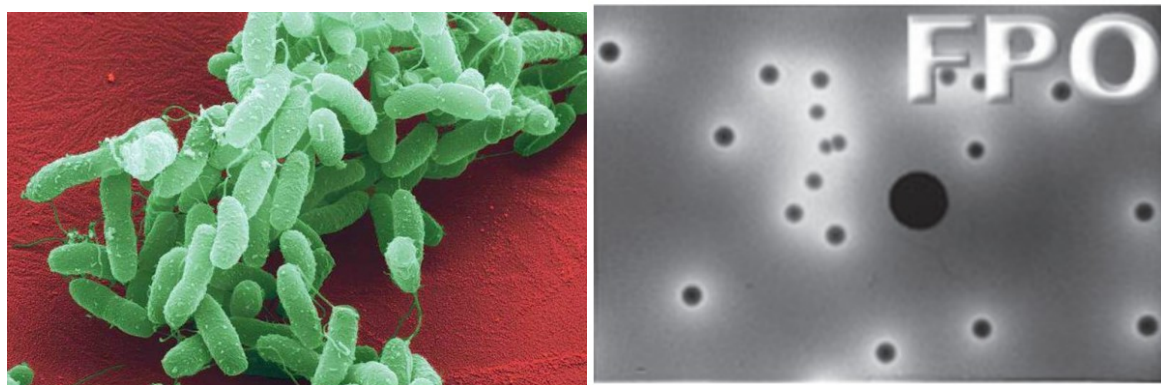


Рис. 2.1. Мікрофотографія клітин *Vibrio cholerae* JS1569 та зовнішній вигляд колоній на агаризованому середовищі TCBS (Thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose agar)

2.4. Таксономічний статус біологічного агента

Згідно з філогенетичною класифікацією, таксономічний статус *Vibrio cholerae* JS1569 є таким [9]:

Домен – *Bacteria*

Тип – *Pseudomonadota*

Клас – *Gamma proteobacteria*

Порядок – *Vibrionales*

Родина – *Vibrionaceae*

Рід – *Vibrio*

Вид – *Vibrio cholerae*

Штам – *Vibrio cholerae* JS1569

РОЗДІЛ 3

ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

3.1. Потреба в протихолерній вакцині

V. cholerae, включаючи представників серогруп O1 і O139, які є збудниками холери, є природним мешканцем водного середовища, зокрема солонуватих річкових, гирлових і прибережних вод. Диференціація між глобально поширюваними пандемічними клонами *V. cholerae* та місцевими бактеріальними популяціями є важливою. Існують місцево циркулюючі штами, які викликають синдромну холеру, але не пандемічну холеру [10].

Холера поширюється фекально-оральним шляхом або безпосередньо від людини до людини, або опосередковано через заражені рідини з навколишнього резервуару різної тривалості, їжу та потенційно мух [11].

Середній час від зараження до початку захворювання (інкубаційний період) становить 1,4 дня, при цьому у 5% випадків холери симптоми розвиваються через 12 годин і у 95% через 4,4 дня після зараження [12].

Холера протягом тривалого часу була ендемічною у значних частинах Азії, але нещодавно вона поширилася по всій Африці та на Гаїті. Виходячи з визначення ВООЗ про наявність культурально підтверджених випадків принаймні трьох з останніх п'яти років, холера зараз вважається ендемічною в багатьох регіонах Африки [13]. Спалах холери на Гаїті не реєструвався більше століття, але після її повторної появи в 2010 році ця хвороба стала ендемічною в країні [14].

На сьогодні холера не є ендемією в Європі, але випадки захворювання реєструються, всі зареєстровані випадки мали історію подорожей до ендемічних районів. Ендемічними регіонами холери на сьогодні є країни Азії, Африки та Гаїті [15].

					НУХТ БТЕК 04.03.40 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Дарієнко П.Р.			Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Пенчук Ю.М.				22	74
Консультант					Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Затверд.		Стаблїков В.П.					
РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування							

Враховуючи постійне реєстрування захворювання на дану хворобу (з 24 квітня 2023 року та станом на 30 травня 2023 року в усьому світі було зареєстровано 74 171 новий випадок холери) та можливі спалахи в результаті подорожей до ендемічних регіонів на сьогодні є актуальним створення вакцин для профілактики даного захворювання.

3.2. Розрахунок потужності виробництва протихолерної вакцини

Так як в Україні холера не є притаманною для всієї території а реєструються випадки потрапляння в результаті подорожей, доцільно буде розглядати в якості споживачів, людей які подорожують в ендемічні регіони та виробляти вакцину для них, яку вони будуть використовувати з метою формування імунітету.

Згідно даних Держтуризму в 2021 році кількість закордонних туристичних подорожей становило 14,7 млн [16]. Серед даного значення в ендемічні регіони (країни Африки та Азії) припадає приблизно 2 % подорожей. Отже, потенційна кількість людей в зоні ризику становить:

$$14,7 \text{ млн} \times 2 \% = 294 \text{ 000 людей}$$

Зважаючи, на конкуруючі препарати та недосвідченість людей про проблематику даного захворювання, прийmemo що з даної кількості лише 50 % будуть використовувати профілактичну вакцину.

$$294 \text{ 000 людей} \times 50 \% = 147 \text{ 000 людей}$$

На сьогодні в якості профілактичної вакцини проти холери є лише один засіб, а саме Vaxchoга даний засіб схвалений управлінням з контролю за харчовими продуктами та лікарськими засобами США, він рекомендовану для застосування дорослим які подорожують постраждалими від холери регіонами у віці 18-64 років. Даний препарат необхідно приймати перорально одна доза препарату містить від 4×10^8 до 2×10^9 КУО ослабленого штаму CVD 103-HgR1, лікарський засіб складається з двох компонентів, один це ослаблений мікроорганізм, а другий це буферний розчин в якому необхідно розчинити клітини для подальшого прийому.

Активний компонент складає 2 г білого порошку враховуючи що клітини в даному порошку є ліофілізовані а також що в складі є захисний розчин цукрози та лактози, можна припустити що з даної кількості кількість біомаси становить 1,2 г, отже, за один прийом профілактичної вакцини споживається 1,2 г біологічної маси *V. cholerae*. Тоді, для забезпечення визначеної кількості людей необхідно наступна кількість біомаси *V. cholerae*:

$$147\ 000 \text{ людей} \times 1,2 \text{ г} = 176,4 \text{ кг}$$

Кількість культуральної рідини при культивування *Vibrio cholerae* JS1569 становитиме:

$$176\ 400 / 22,9 \text{ г/л} = 7\ 703 \text{ л культуральної рідини}$$

Після отримання культуральної рідини необхідно отримати готовий продукт з неї, для чого необхідно провести виділення та очищення цільового продукту, під час якого відбувається втрата культуральної рідини та цільового продукту, тому слід врахувати 25 % втрат

$$10\ 270 \text{ л} / (1 - 0,25) = 10\ 270 \text{ л}$$

3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів

Прийmemo, що виробничий процес триватиме 32 трудоднів, в результаті кількість КР за цикл буде:

$$10\ 270 \text{ л} / 32 = 321 \text{ л/добу}$$

Визначимо кількість КР за цикл, для цього прийmemo що коефіцієнт нестерильних операцій становить 1,2 а виробничий цикл становить (12 год синтез + 8 год підготовка ферментера) 20 год:

$$1,2 \times 321 \text{ л/добу} \times (20) / 24 = 321 \text{ л/цикл}$$

Визначимо об'єм ферментера:

$$321 \text{ л/цикл} / 0,55 = 583,6 \text{ л,}$$

прийmemo стандартний за геометричними розмірами ферментер об'ємом 630 л, перерахуємо коефіцієнт заповнення:

$$321 / 630 = 0,51,$$

дане значення знаходиться в допустимому діапазоні, тому даний ферментер задовольняє наші вимоги.

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу *Vibrio cholerae*

Визначивши кількість культуральної рідини за цикл та об'єм ферментера, необхідно розрахувати кількість стадій отримання посівного матеріалу, щоб забезпечити засівання виробничого ферментера.

В кінці одного виробничого циклу на виході отримуємо 321 л культуральної рідини, так як під час вирощування культури відбувається її втрата в результаті креплєвиносу, яка становить приблизно 10 %, необхідна кількість КР буде становити:

$$321 \text{ л} / 0,9 = 356,7 \text{ л}$$

Процес надсинтезу біомаси *Vibrio cholerae* JS1569 відбувається з дробним внесенням глюкози, тому за правилом хреста необхідно розрахувати кількість початкового об'єму поживного середовища та об'єм розчину глюкози який будуть вносити дробно:

$$510 \quad 50/50 = 1 \text{ частин} - \text{розчину підживлення}$$

$$60$$

$$10 \quad 450/50 = 9 \text{ частин} - \text{початкове поживне середовище}$$

$$(510 - 60 = 450, 60 - 10 = 50)$$

Відношення початкового об'єму КР до розчину підживлення 9 до 1

1 частина культуральної рідини складає $356,7 / (9 + 1) = 35,67 \text{ л}$

Об'єм розчину підживлення складає $V_{\text{ж.сум.}} = 1 \cdot 35,67 = 35,7 \text{ л}$

Початковий об'єм культуральної рідини складає $V_{\text{п.кр.}} = 9 \cdot 35,67 = 321 \text{ л}$

Встановивши початковий об'єм культуральної рідини, визначимо яка кількість посівного матеріалу та поживного середовища знаходиться в 321 л культуральної рідини.

Зазвичай кількість посівного матеріалу становить 10 % від кількості поживного середовища, тому кількість ПС буде:

$$321 \text{ л} / 1,1 = 291,82 \text{ л (поживне середовище)}$$

Визначивши кількість поживного середовища можна встановити кількість посівного матеріалу, яка буде складати:

$$321 \text{ л} - 291,82 \text{ л} = 29,18 \text{ л (посівного матеріалу)}$$

Розрахунок стадії отримання посівного матеріалу в посівному апараті

В виробничий ферментер необхідно внести 29,18 л посівного матеріалу, для отримання даної кількості ПС необхідно визначити робочий об'єм посівного апарату, який буде використовуватись, для цього слід прийняти що коефіцієнт втрат через краплевиніс становить 0,13:

$$29,18 \text{ л} / (1 - 0,13) = 33,54 \text{ л (робочий об'єм посівного апарату)}$$

Розрахувавши робочий об'єм посівного апарату встановимо, яка кількість поживного середовища та посівного матеріалу знаходиться в даному об'ємі культуральної рідини (приймаємо що кількість посівного матеріалу становить 10 % від кількості поживного середовища):

$$33,54 \text{ л} / 1,1 = 30,5 \text{ л (поживне середовище)}$$

Визначивши кількість поживного середовища можна встановити кількість посівного матеріалу, яка буде складати:

$$33,54 \text{ л} - 30,5 \text{ л} = 3,04 \text{ л (посівного матеріалу)}$$

Розрахувавши кількість культуральної рідини необхідно визначити об'єм посівного апарату який задовольнить наші потреби (коефіцієнт заповнення 0,55)

$$33,54 \text{ л} / 0,55 = 60,98 \text{ л (геометричний об'єм посівного апарату)}$$

прийемо стандартний за геометричними розмірами посівний апарат об'ємом 60 л, перерахуємо коефіцієнт заповнення:

$$33,54 / 60 = 0,56,$$

дане значення знаходиться в допустимому діапазоні, тому даний посівний апарат задовольняє наші вимоги.

Розрахунок стадії отримання посівного матеріалу в інокуляторі

В посівний апарат об'ємом 60 л необхідно внести 3,04 л посівного матеріалу, для отримання даної кількості ПС необхідно визначити робочий об'єм інокулятора, який буде використовуватись, для цього слід прийняти що коефіцієнт втрат через краплевиніс становить 0,05:

$$3,04 \text{ л} / (1 - 0,05) = 3,2 \text{ л (робочий об'єм інокулятора)}$$

Розрахувавши робочий об'єм інокулятора встановимо, яка кількість поживного середовища та посівного матеріалу знаходиться в даному об'ємі культуральної рідини (приймаємо що кількість посівного матеріалу становить 10 % від кількості поживного середовища):

$$3,2 \text{ л} / 1,1 = 2,9 \text{ л (поживне середовище)}$$

Визначивши кількість поживного середовища можна встановити кількість посівного матеріалу, яка буде складати:

$$3,2 \text{ л} - 2,9 \text{ л} = 0,3 \text{ л (посівного матеріалу)}$$

Розрахувавши кількість культуральної рідини необхідно визначити об'єм інокулятора який задовольнить наші потреби (коефіцієнт заповнення 0,55)

$$3,2 \text{ л} / 0,55 = 5,81 \text{ л (геометричний об'єм інокулятора)}$$

прийmemo стандартний за геометричними розмірами інокулятора об'ємом 6 л, перерахуємо коефіцієнт заповнення:

$$3,2 / 6 = 0,53,$$

дане значення знаходиться в допустимому діапазоні, тому даний посівний апарат задовольняє наші вимоги.

Розрахунок стадії отримання посівного матеріалу в колбах на качалці

В посівний апарат об'ємом 6 л необхідно внести 0,3 л посівного матеріалу, через невеликий об'єм доцільно проводити вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці. Втратами нехтуємо через невеликий об'єм, тому робочий об'єм буде відповідати необхідній кількості посівного матеріалу

$$0,3 \text{ л (робочий об'єм качалочних колб)}$$

Розрахувавши робочий об'єм качалочних колб встановимо, яка кількість поживного середовища та посівного матеріалу знаходиться в даному об'ємі культуральної рідини (приймаємо що кількість посівного матеріалу становить 10 % від кількості поживного середовища):

$$0,3 \text{ л} / 1,1 = 0,27 \text{ л (поживне середовище)}$$

Визначивши кількість поживного середовища можна встановити кількість посівного матеріалу, яка буде складати:

$$0,3 \text{ л} - 0,27 \text{ л} = 0,03 \text{ л (посівного матеріалу)}$$

В якості качалочних колб використовуємо стандартні колби об'ємом 750 мл з коефіцієнтом заповнення 0,2, тоді необхідна кількість колб для отримання 0,3 л посівного матеріалу буде становити:

$$0,3 \text{ л} / (0,75 \times 0,2) = 2 \text{ колби.}$$

Підсумовуючи вище проведені розрахунки, для засіву ферментера об'ємом 630 л, необхідно пройти 3 стадії отримання посівного матеріалу *Vibrio cholerae* JS1569, узагальнена таблиця розрахунків наведена в табл. 3.1.

Таблиця 3.1

Узагальнені дані розрахунків отримання посівного матеріалу *Vibrio cholerae* JS1569 для виробничого синтезу

№ стадії	Геометричний об'єм апарату, V_r , л	Коефіцієнт заповнення, $K_{зап}$, частка	Робочий об'єм апарату, $V_{роб}$, л	Об'єм поживного середовища, $V_{пс}$, л	Об'єм посівного матеріалу, $V_{пм}$, л
1	0,750 × 2 колб	0,2	0,3	0,27	0,03
2	6	0,53	3,2	2,9	0,3
3	60	0,56	33,54	30,5	3,04
4	630	0,56	356,7	321	29,18

РОЗДІЛ 4

ШЛЯХ СИНТЕЗУ БІОМАСИ *VIBRIO CHOLERAЕ* JS1569

Для синтезу біомаси *Vibrio cholerae* JS1569 вирощують на поживному середовищі з глюкозою, яка виступає головним джерелом вуглецю та бере участь в усіх подальших трансформаціях. Переглядаючи базу даних KEGG, можна виявити що шляхи катоболізму для обраного біологічного агента відсутні, тому для встановлення шляхів катаболізму необхідним є розглядання споріднених мікроорганізмів представлених в базі. Тому для визначення шляху трансформації було обрано *Vibrio cholerae* O1 El Tor N16961 [17].

Даний мікроорганізм використовуючи глюкозу для синтезу необхідних подальших інтермедіатів в якості основного шляху використовує гліколіз, схема трансформації глюкози гліколітичним шляхом у *Vibrio cholerae* O1 El Tor N16961 наведено на рис. 4.1.

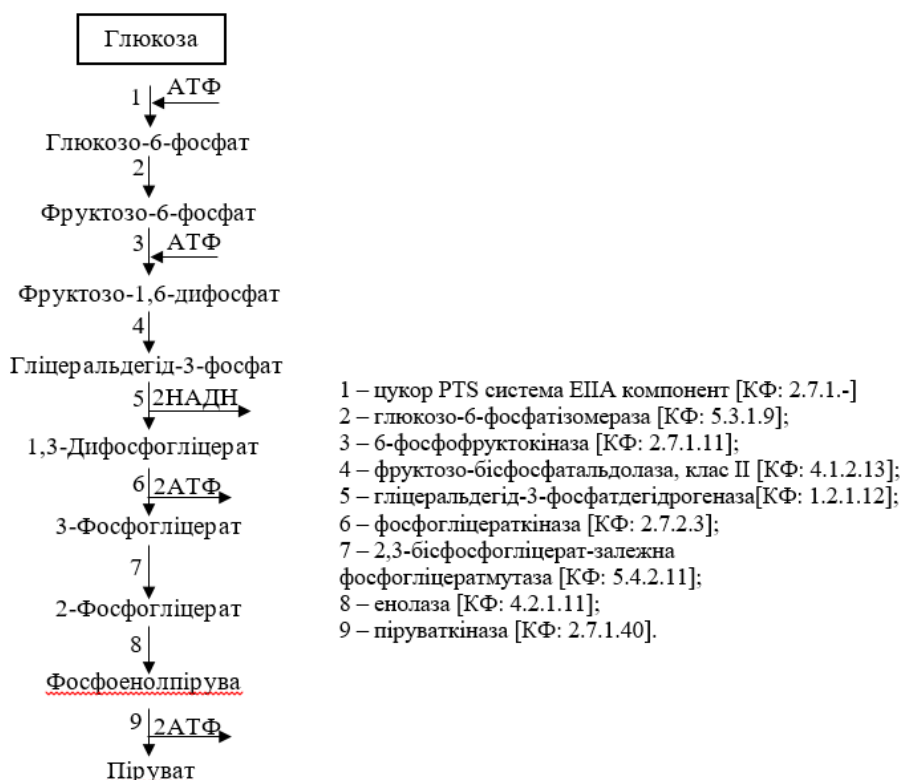


Рис. 4.1. Катаболізм глюкози у *Vibrio cholerae* O1 El Tor N16961

НУХТ БТЕК 04.03.40 КР ПЗ					
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	
Розроб.	Дарієнко П.Р.				
Перевір.	Пенчук Ю.М.				
Консультант					
Н. Контр.					
Затверд.	Стабніков В.П.				
РОЗДІЛ 4. Шлях синтезу біомаси <i>Vibrio cholerae</i> JS1569					
			Літ.	Арк.	Аркушів
			29	74	
Кафедра БТМ					

З отриманого пулу інтермедіатів для синтезу біомаси *Vibrio cholerae* JS1569, біологічний агент повинен синтезувати основні компоненти необхідні для формування грамнегативної клітини: білки, нуклеїнові кислоти, ліпополісахариди, пептидоглікан та ліпіди. Схематичне зображення катаболізму глюкози з утворенням біомаси наведено в додатку 1.

РОЗДІЛ 5

ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого синтезу біомаси *Vibrio cholerae* JS1569

5.1.1. Обґрунтування способу культивування *Vibrio cholerae* JS1569 і типу ферментера

Vibrio cholerae JS1569 можна використовувати в якості компонента протихолерної вакцини, для створення вакцини необхідно отримати біомасу даного мікроорганізму, оптимальними умовами росту *Vibrio cholerae* JS1569 є температура 36 °С та рН 7,5, дані умови вирощування є оптимальними для росту більшості мікроорганізмів, тому слід проводити технологічний процес отримання біомаси *Vibrio cholerae* JS1569 в асептичних умовах.

Зважаючи на необхідність асептичних умов та те що найвища концентрація біомаси спостерігається в стаціонарній фазі росту, для синтезу використовуватиме глибинний метод вирощування з періодичним культивуванням.

По відношенню до кисню *Vibrio cholerae* JS1569 є факультативним анаеробом, то він може рости при кисні так і при його відсутності та враховуючи що синтез біомаси відбувається при кисневих умовах необхідно забезпечити аерацію під час росту мікроорганізму.

Ферментація є визначальною стадією в біотехнологічних виробництвах, протягом якої мікроорганізми ростуть і розмножуються в біореакторах, забезпечуючи накопичення біомаси продуцента і біологічно цінних метаболітів у культуральній рідині [18].

Отже, потрібно обрати відповідне ферментаційне обладнання для виробництва вакцини протихолерної.

					НУХТ БТЕК 04.03.40 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Дарієнко П.Р.			Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Пенчук Ю.М.				31	74
Консультант					Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Затверд.		Стабніков В.П.					

При глибинному культивуванні мікроорганізми використовують кисень, розчинений у воді. Розчинність кисню у воді не досить велика, тому, щоб забезпечити ріст факультативних анаеробів у товщі рідкого середовища, його необхідно штучно аерувати та забезпечувати перемішування для кращої розчинності кисню. Так, у промисловості при вирощуванні мікроорганізмів у ферментерах разом із механічним перемішуванням використовують продування через середовище стерильного повітря [18].

Так, згідно статті [5] вирощування *V. cholerae* JS1569 проводили при перемішуванні 160 об/хв та витраті повітря 0,5 л/(л*хв) середовища.

Тому ферментер слід оснастити барботером для подачі стерильного аераційного повітря в апарат для досягнення ступеня необхідної витрати повітря, а контроль вмісту розчиненого кисню у середовищі буде здійснюватись за допомогою датчика.

В якості перемішуючого пристрою обираємо мішалку лопатевого типу, зважаючи на її простоту та ефективність роботи. За всіма параметрами підходить мішалка пропеллерна 4-х лопатева з нержавіючої сталі діаметром 100 мм компанії «Хімлаборреактив» [19].

Для контролю необхідної температури у ферментері має бути передбачено датчик контролю температур, а підтримання температури буде здійснюватись через сорочку апарату. Окрім цього, контроль рН на рівні 7,5 здійснюють шляхом встановлення рН датчика.

5.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря

Як зазначено в попередньому підрозділі *Vibrio cholerae* JS1569 є факультативним анаеробом, що означає що даний біологічний агент спроможний рости як з доступом кисню так і без нього. Під час перегляду літературних джерел для обрання оптимального біологічного агента для подальшого синтезу протихолерної вакцини, було помічено що для посиленого синтезу біомаси представникам виду *Vibrio cholerae* необхідний доступ кисню, з чого можна зробити висновок що для надсинтезу біомаси необхідно передбачити подачу повітря під час росту продуцента. Зважаючи

що *Vibrio cholerae* JS1569 росте в умовах сприятливих для більшості мікроорганізмів, необхідно передбачити попереднє очищення повітря перед подачею його в культуральне середовище. Процес очищення повітря передбачає наступні стадії:

- Забір повітря
- Очищення від крупних часток
- Компресіювання повітря
- Охолодження
- Видалення вологи
- Стабілізування тиску
- Очищення на головному фільтрі
- Індивідуальне очищення перед подачею в апарати

5.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів на технологічний процес отримання біомаси *Vibrio cholerae* JS1569

Технологічний процес синтезу біомаси *Vibrio cholerae* JS1569 триватиме 32 доби і буде проводитись у ферментері об'ємом 630 л. Попереднє приготування посівного матеріалу відбудеться в посівному апараті об'ємом 60 л, інокуляторі об'ємом 6 л, а також у колбах на качалці. Виробничий процес буде відбуватись у наступних приміщеннях: виробничий цех синтезу біомаси *Vibrio cholerae* JS1569, цех отримання посівного матеріалу *Vibrio cholerae* JS1569, приміщення для вирощування *Vibrio cholerae* JS1569 в колбах на качалці та мікробіологічна лабораторія для проведення мікробіологічного контролю.

На рисунку 5.1 наведено схематичне зображення плану приміщення для виробничого процесу отримання біомаси *Vibrio cholerae* JS1569. План враховує діаметри обладнання та відстань між апаратами та від стін, не менше 1 м та 1-1,5м, відповідно.

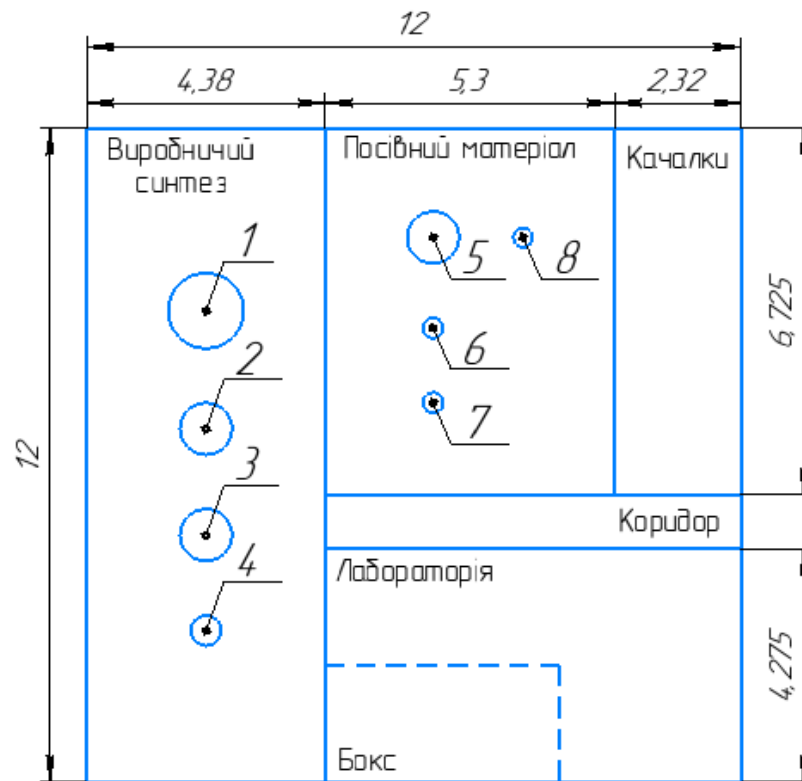


Рис. 5.1. Планування приміщень для синтезу біомаси *Vibrio cholerae* JS1569

В табл 5.1. наведено розміри обладнання зображеного на рис. 5.1.

Таблиця 5.1

Розміри обладнання для синтезу біомаси *Vibrio cholerae* JS1569

Поз.	Обладнання	Геометричний об'єм, л	Діаметр, м	Висота, м
1	Ферментер для синтезу біомаси <i>Vibrio cholerae</i> JS1569	630	1,38	2,8
2	Реактор для приготування розчину глюкози	63	0,95	1,7
3	Реактор для приготування композиції А	63	0,95	1,7
4	Реактор для приготування композиції Б	40	0,55	0,75
5	Посівний апарат для отримання посівного матеріалу <i>Vibrio cholerae</i> JS1569	60	0,95	2,6
6	Реактор для приготування композиції А	10	0,37	0,5

7	Реактор для приготування композиції Б	10	0,37	0,5
8	Інокулятор для отримання посівного матеріалу <i>Vibrio cholerae</i> JS1569	6	0,35	1,0
Всього		882		

З даних наведених в табл. 5.1, сумарний геометричний об'єм обладнання необхідного для синтезу біомаси *Vibrio cholerae* JS1569 становить 882 л. Окрім об'єму обладнання необхідно розрахувати площу на якій дане обладнання знаходиться, а саме підлогу, стіни враховуючи що висота стін приміщень становить 6 м. Площа підлоги цеху виробничого синтезу біомаси *Vibrio cholerae* JS1569 становить $12 \text{ м} \times 4,38 \text{ м} = 52,56 \text{ м}^2$, а площа стін становить $(12 \text{ м} \times 3 + 4,38 \text{ м} \times 3) \times 2 = 98,28 \text{ м}^2$. Площа підлоги цеху отримання посівного матеріалу *Vibrio cholerae* JS1569 становить $5,3 \times 6,725 = 35,643 \text{ м}^2$, а площа стін $(5,3 \text{ м} \times 3 + 6,725 \text{ м} \times 3) \times 2 = 72,15 \text{ м}^2$. Мікробіологічна лабораторія $7,62 \times 4,275 = 32,756 \text{ м}^2$, а стін – $(7,62 \times 3 + 4,275 \times 3) \times 2 = 71,37 \text{ м}^2$. Площа підлоги приміщення з качалками становить $2,32 \times 6,725 = 15,6 \text{ м}^2$, а стін – $(2,32 \times 3 + 6,725 \times 3) \times 2 = 54,27 \text{ м}^2$, узагальнені дані площ приміщень представлено в табл. 5.2

Таблиця 5.2

Узагальнені дані загальної площі стін та підлоги приміщень для отримання біомаси *Vibrio cholerae* JS1569

Приміщення	Площа підлоги, м ²	Площа стін, м ²	Загальна площа, м ²
Цех виробничого синтезу біомаси	52,56	98,28	150,84
Цех отримання посівного матеріалу	35,643	72,15	107,793
Мікробіологічна лабораторія	32,756	71,37	104,126
Приміщення з качалками	15,6	54,27	69,87
Загальна площа	136,559	296,37	

За 32 доби відбувається 32 виробничих цикла отримання культуральної рідини, враховуючи що миття обладнання відбувається перед початком циклу та після останнього виробничого циклу, сумарна кількість миття обладнання становить 33 рази. З метою забезпечення чистоти приміщень,

підлогу миють щодня, а саме 32 разів. Крім щоденного миття в виробничих приміщеннях раз на місяць проводиться генеральне прибирання, а саме за 32 трудовнів буде проведено 1 генеральне прибирання.

Узагальнена площа обробки за всі виробничі цикли отримання біомаси *Vibrio cholerae* JS1569 представлено в табл. 5.3.

Таблиця 5.3

Узагальнені дані площі миття або дезінфекції оброблюваного об'єкту за технологічний процес отримання біомаси *Vibrio cholerae* JS1569

Об'єкт миття та/або дезінфекції	Площа (об'єм) оброблюваного об'єкту, м ² (м ³)	Кількість процесів миття та/або дезінфекції за весь період виробництва	Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м ² (м ³)
Обладнання	0,882	33	29,106
Підлога	136,559	32	4 369,89
Стіни, двері вікна	296,37	1	296,37

В табл. 5.4 продемонстровано загальне порівняння дезінфекційних засобів.

Таблиця 5.4

Узагальнена характеристика витрат мийних та дезінфікуючих засобів для синтезу біомаси *Vibrio cholerae* JS1569

Назва мийного/дезінфікуючого засобу (діюча речовина)	Об'єкт миття та дезінфекції	Концентрація робочого розчину	Загальна площа (об'єм) миття та дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м ² (м ³)	Кількість робочого розчину за весь період виробництва, л	Вартість 1 л/кг мийного/дезінфікуючого засобу, грн	Вартість 1 л робочого розчину, грн	Загальна вартість миття та дезінфекції за весь період виробництва, грн
«Дезактин» (дихлоранттин) [20]	Підлога, стіни, двері, вікна	0,2%	4 666,26	466,6	430	0,9	491,94
«Dezaldum 20» (глутаровий альдегід алкілдиметилбензиламоній хлорид,) [21]	Підлога, стіни, двері, вікна	1%	4 666,26	466,6	131,25	1,313	612,65
«Ексан Про Дез» (ялицева олія ПАР, етанол,) [22]	Підлога, стіни, двері, вікна	1,5%	4 666,26	466,6	93,5	1,403	654,64
Каустична сода (NaOH) [23]	Обладнання	1%	29,106	5 821,2	57	0,6	3 492,72

Примітка: ПАР – поверхнево-активні речовини.

5.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для синтезу біомаси *Vibrio cholerae* JS1569

Вирощування посівного матеріалу *Vibrio cholerae* JS1569 відбувається на простішому поживному середовищі як за якісним так і за кількісним складом, а саме, г/л:

Глюкоза – 11

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 2,5

K_2HPO_4 – 10,1

KH_2PO_4 – 1,57

Цитрат натрію – 0,5

MgSO_4 – 3

Розчин мікроелементів – 1 мл.

Збільшений синтез біомаси *Vibrio cholerae* JS1569 під час виробничого синтезу відбувається з використанням наступного поживного середовища:

Глюкоза – початкова 10

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 2,5

K_2HPO_4 – 10,1

KH_2PO_4 – 1,57

NH_4Cl – 0,5

Цитрат натрію – 0,5

MgSO_4 – 3

Розчин мікроелементів – 1 мл.

А також для збільшеного синтезу біомаси необхідно використовувати підживлювальний розчин глюкози, з концентрацією 51%, кінцева концентрація глюкози становитиме 60 г/л.

Наявний розчин мікроелементів для отримання посівного матеріалу *Vibrio cholerae* JS1569 та виробничого синтезу *Vibrio cholerae* JS1569 складається з наступних компонентів, г/л:

$\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 8,1,

$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,36,

$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O} - 0,31,$
 $\text{Na}_2\text{-EDTA} \times 2\text{H}_2\text{O} - 1,$
 $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O} - 0,36,$
 $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O} - 0,3,$
 $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O} - 1.$

Приготування та стерилізація поживного середовища на стадії отримання посівного матеріалу *Vibrio cholerae* JS1569

Поділ компонентів на композиції відбувається в результаті економічної доцільності та враховуючи відношення компонентів до температури. Так на стадію отримання посівного матеріалу *Vibrio cholerae* JS1569 в качалочних колбах та інокуляторі об'ємом 6 л, поділ компонентів буде виглядати наступним чином:

Композиція А: Глюкоза (20 хв, 112 °С).

Композиція Б: K_2HPO_4 і KH_2PO_4 (40 хв, 131 °С);

Композиція В: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, цитрат натрію і MgSO_4 (40 хв, 131 °С);

Композиція Г: розчин мікроелементів (40 хв, 131 °С).

Через малий об'єм поживного середовища стерилізувати композиції будуть в автоклаві, а зважаючи на це фосфатні та основні солі розділяють на дві композиції, щоб не утворився осад при нагріванні, термолабільний компонент (глюкоза) стерилізують окремо від солей через різницю температури. Розчин мікроелементів з економічною доцільності готують та стерилізують окремо для задоволення потреб всього технологічного процесу.

Через більший об'єм поживного середовища в посівному апараті об'ємом 60 л поділ компонентів буде трохи видозмінений. Основна відмінність це стерилізація основних та фосфатних солей разом, а для цього необхідно передбачити зменшення рівня рН розчину, щоб не позбутися можливого утворення осаду при нагріванні.

Композиція А: Глюкоза (20 хв, 112 °С).

Композиція Б: K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $(NH_4)_2SO_4$, цитрат натрію і $MgSO_4$ (40 хв, 131 °С);

Композиція В: розчин мікроелементів (40 хв, 131 °С).

Приготування та стерилізація поживного середовища на стадію виробничого синтезу біомаси *Vibrio cholerae* JS1569

Технологічний процес синтезу біомаси *Vibrio cholerae* JS1569 проходить в ферментері об'ємом 630 л, склад поживного середовища майже схожий з поживним середовищем необхідним для отримання посівного матеріалу *Vibrio cholerae* JS1569, відмінність полягає в додатковому дробному внесенні глюкози та наявності NH_4Cl , поділ компонентів для їх стерилізації буде виглядати наступним чином:

Композиція А: Глюкоза (20 хв, 112 °С).

Композиція Б: K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $(NH_4)_2SO_4$, NH_4Cl , цитрат натрію і $MgSO_4$ (40 хв, 131 °С);

Композиція В: розчин мікроелементів (40 хв, 131 °С).

Термолабільна композиція готується та стерилізується в реакторі об'ємом 63 л, солі готують в реакторі а стерилізацію проводять в ферментері, враховуючи економічний аспект доцільно розчинити солі в невеликій кількості води перелити розчин в ферментер в подальшому внести воду до необхідного рівня та провести стерилізацію.

Приготування і стерилізація розчину для дробного внесення глюкози під час синтезу біомаси *Vibrio cholerae* JS1569 відбуватиметься в реакторі об'ємом 63 л. Стерильний розчин подаватимуть в ферментер перистальтичним насосом під час ферментації.

РОЗДІЛ 6
СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДОФЕРМЕНТАЦІЙНИХ
ПРОЦЕСІВ ТА ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ

Таблиця 6.1

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
ПЗ-1	Повітрязабірник	1	Обладнаний металевою сіткою, для вилучення механічних частинок-забруднювачів
ФГО-2	Фільтр грубого очищення	1	Фільтр кишеньковий класу очищення G3 («Техно-Партс», Україна) з рамкою, виготовленою з нержавіючої сталі AISI 304. Початковий перепад тиску становить 40 Па, кінцевий – 250 Па [24].
К-3	Компресор	1	Компресор поршневий Scherppach HC 100DC («Scherppach», Німеччина). Продуктивність до 412 л/хв, робочий тиск – 8 бар, споживана потужність – 2,2 кВт [25].
Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Теплообмінник кожухотрубний ОПЕКС-3-СТ («ОПЕКС Енергосистеми», Україна). Виготовлений з нержавіючої сталі. Номінальний тиск – від 6 до 40 бар, робочі температури – від -60 до 400 °С [26]
Рс-5	Ресивер	1	Ресивер місткістю 100 л, постачається в комплекті з компресором) [25]
Т-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Калорифер паровий з нержавіючої сталі, виконаний на замовлення фірмою «ОПЕКС Енергосистеми» (Україна). Тиск робочого середовища – від 10 до 25 бар, максимальна робоча температура 400 °С [27].
ФТО-7	Фільтр тонкого очищення	1	Фільтр кишеньковий класу очищення G4-F9 («Техно-Партс», Україна) з каркасом, виготовленим з оцинкованого металу. Початковий перепад тиску становить 40 Па, кінцевий – 250 Па [28].
ФІ-8 ФІ-16 ФІ-26	Фільтр індивідуальний	3	Фільтр НЕРА класу очищення H14 («Техно-Партс», Україна). Фільтрувальний матеріал – мікротонкі скляні волокна, упаковані мініофрамами та розділені термопластичними сепараторами [29].

НУХТ БТЕК 04.03.40 КР ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.		Дарієнко П.Р.		
Перевір.		Пенчук Ю.М.		
Консультант				
Н. Контр.				
Затверд.		Стабніков В.П.		
РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу				
		Літ.	Арк.	Аркушів
			41	74
Кафедра БТМ				

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
I-9	Інокулятор	1	Ферментер Solaris S Series («Solaris Biotech», США), виготовлений на замовлення. Геометричний об'єм – 6 л, матеріал корпусу – нержавіюча сталь. Обладнаний сорочкою, барботером, перемішувальним пристроєм, датчиками рН і температури [30].
H-10	Насос перистальтичний для перекачування посівного матеріалу	1	Насос перистальтичний PTL05 (Тарфло, Україна). Частота обертання робочого органу – 40 об/хв, продуктивність – 10 л/год [31]
L-11 L-13 L-15 L-18 L-20 L-22 L-23	Лічильник	7	Дозатор води з діапазоном дозування від 10 мл до 9999 л. Робочий тиск – від 0,5 до 10 атм [32].
P-12	Реактор-змішувач для приготування композиції А	1	Апарат сталевий емальований з механічним змішуючим пристроєм (лопатева мішалка, частота обертання 100 об/хв, споживана потужність 0,75 кВт) виробництва компанії «Єврохіммаш» (Україна). Геометричний об'єм – 10 л. Обладнаний сорочкою. Габаритні розміри: діаметр – 0,25 м, висота – 0,5 м [33].
P-14	Реактор-змішувач для приготування композиції Б	1	Апарат сталевий емальований з механічним змішуючим пристроєм (лопатева мішалка, частота обертання 100 об/хв, споживана потужність 0,75 кВт) виробництва компанії «Єврохіммаш» (Україна). Геометричний об'єм – 10 л. Обладнаний сорочкою. Габаритні розміри: діаметр – 0,25 м, висота – 0,5 м [33].
ПА-17	Посівний апарат	1	Ферментер Solaris S Series («Solaris Biotech», США), виготовлений на замовлення. Геометричний об'єм – 60 л, матеріал корпусу – нержавіюча сталь. Обладнаний сорочкою, барботером, перемішувальним пристроєм, датчиками рН і температури [30].

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
P-19	Реактор-змішувач для приготування композиції А	1	Апарат сталевий емальований з механічним змішуючим пристроєм (лопатева мішалка, частота обертання 100 об/хв, споживана потужність 0,75 кВт) виробництва компанії «Єврохіммаш» (Україна). Геометричний об'єм – 63 л. Обладнений сорочкою. Габаритні розміри: діаметр – 0,508 м, висота – 2,6 м [33].
P-21	Реактор-змішувач для приготування композиції Б	1	Апарат сталевий емальований з механічним змішуючим пристроєм (лопатева мішалка, частота обертання 100 об/хв, споживана потужність 0,75 кВт) виробництва компанії «Єврохіммаш» (Україна). Геометричний об'єм – 40 л. Обладнений сорочкою. Габаритні розміри: діаметр – 0,4 м, висота – 0,75 м [33].
P-24	Реактор-змішувач для приготування підживлювального розчину глюкози	1	Апарат сталевий емальований з механічним змішуючим пристроєм (лопатева мішалка, частота обертання 100 об/хв, споживана потужність 0,75 кВт) виробництва компанії «Єврохіммаш» (Україна). Геометричний об'єм – 63 л. Обладнений сорочкою. Габаритні розміри: діаметр – 0,508 м, висота – 2,6 м [33].
H-25	Насос перистальтичний для перекачування підживлювального розчину глюкози	1	Насос перистальтичний PTL09 (Тарфло, Україна). Частота обертання робочого органу – 60 об/хв, продуктивність – 60 л/год [31]
Ф-27	Ферментер	1	Ферментер Solaris I Series («Solaris Biotech», США), виготовлений на замовлення. Геометричний об'єм – 630 л, матеріал корпусу – нержавіюча сталь. Обладнений сорочкою, барботером, перемішувальним пристроєм, датчиками рН і температури [30].
H-28	Насос перистальтичний для перекачування культуральної рідини	1	Насос перистальтичний PTL17 (Тарфло, Україна). Частота обертання робочого органу – 80 об/хв, продуктивність – 518 л/год [31]

РОЗДІЛ 7

ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЧОГО СИНТЕЗУ БІОМАСИ *VIBRIO CHOLERAЕ* JS1569

Технологія отримання біомаси *Vibrio cholerae* JS1569 складається з допоміжних робіт які передбачають підготовку повітря, приготування регуляторів рівня рН, приготування та стерилізації розчину мікроелементів, приготування розчину глюкози для дробного внесення на виробничий синтез і приготування поживного середовища та технологічного процесу – отримання посівного матеріалу *Vibrio cholerae* JS1569 та виробничий синтез біомаси *Vibrio cholerae* JS1569. Схеми технологічного процесу (апаратурна та технологічна) наведено в графічній частині роботи.

ДР 1. Підготовка аераційного повітря

ДР 1.1. Забір повітря

Для забору повітря з атмосфери на висоті 15 м використовується вертикальна труба з повітрязабірником (ПЗ-1).

ДР 1.2. Попереднє грубе очищення повітря

Отримане повітря направляють на фільтр грубого очищення (ФГО-2), щоб усунути крупні частинки бруду та пилу (розміром до 1 мкм). Ступінь очищення становить 90 %.

ДР 1.3. Подача повітря на компресор

Очищене повітря (від ДР 1.2) подають в компресор (К-3), в якому відбувається стиснення до тиску 0,3 МПа і паралельно збільшується температура до 220 °С.

ДР 1.4. Охолодження повітря та видалення вологи

Отримане повітря після компресування має збільшений вміст вологи тому для його видалення повітря подають у теплообмінник (Т-4) де відбувається охолодження до 15 °С, а потім в ресивер щоб видалити зайву

					НУХТ БТЕК 04.03.40 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Дарієнко П.Р.			РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми виробничого синтезу біомаси <i>vibrio cholerae</i> js1569	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Пенчук Ю.М.					44	74
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

вологу до вмісту вологи в повітрі $W = 60 \%$.

ДР 1.5. Підігрів повітря

Зменшивши вміст надлишкової вологи, повітря підігривають у теплообміннику (Т-6) до температури $35 \text{ }^\circ\text{C}$, щоб уникнути утворення конденсату на подальших фільтрах, $W = 50\%$.

ДР 1.6. Тонке очищення повітря

Підігріте повітря пропускають через головний фільтр очищення (Ф-7), після проходження якого ступінь очищення становить 92% .

ДР 1.7. Очищення повітря на індивідуальних фільтрах

Перед введенням повітря в апарати для отримання посівного матеріалу і виробничий ферментер, воно проходить через індивідуальні фільтри (ФІ-8, ФІ-16, ФІ-26) щоб досягти ступінь очищення на рівні $E = 99,995\%$.

ДР 2. Приготування регуляторів рівня рН

ДР 2.1. Приготування розчину хлоридної кислоти

Для пониження рівня рН композицій необхідно приготувати розчин 6% хлоридної кислоти об'ємом 724 мл , приготування розчину відбувається в колбі. В колбу об'ємом 1 л з внесеною питною водою об'ємом 603 мл при постійному перемішуванні додають 121 мл 36% хлоридної кислоти. Отримавши 6% розчин хлоридної кислоти його зберігають в даній колбі до використання на подальших стадіях

ДР 2.2. Приготування та стерилізація розчину натрію гідроксиду

Для збільшення рівня рН поживного середовища необхідно приготувати та простерилізувати розчин 6% гідроксиду натрію об'ємом 724 мл , приготування розчину відбувається в колбі, а стерилізація в автоклаві. В колбу об'ємом 1 л вносять 43 г кристалічного гідроксиду натрію та додають 724 мл питної води. Після ретельного перемішування розчин 40 хв стерилізують в автоклаві при $131 \text{ }^\circ\text{C}$.

ДР 3. Приготування та стерилізація розчину мікроелементів

ДР 3.1. Приготування та стерилізація розчину мікроелементів на потреби технологічного процесу

Необхідно приготувати 354,7 мл розчину мікроелементів, враховуючи об'єм розчину стерилізація проходить в автоклаві, в табл. 7.1 наведено кількість компонентів необхідних для приготування розчину даного об'єму.

Таблиця 7.1

Необхідна кількість компонентів для приготування розчину мікроелементів на технологічний процес

Компоненти середовища	Вміст, г/л	Кількість компонентів в 354,7 мл розчину, г	Композиція	Об'єм, мл
FeCl ₃ × 6H ₂ O	8,1	2,873	А	354,7
Na ₂ -EDTA	1	0,355		
CaCl ₂ × 2H ₂ O	1	0,355		
ZnSO ₄ × 7H ₂ O	0,36	0,128		
CoCl ₂ × 6H ₂ O	0,36	0,128		
CuSO ₄ × 5H ₂ O	0,31	0,110		
MnSO ₄ × H ₂ O	0,3	0,106		
Вода		354,7 мл		
Разом:				354,7

На аналітичних вагах формують наважки FeCl₃ × 6H₂O масою 2,873 г, Na₂-EDTA – 0,355 г, CaCl₂ × 2H₂O – 0,355 г, ZnSO₄ × 7H₂O – 0,128 г, CoCl₂ × 6H₂O – 0,128 г, CuSO₄ × 5H₂O – 0,110 г, MnSO₄ × H₂O – 0,106 г. Отримані наважки вносять в колбу об'ємом 0,5 л та додають, відміряної мірним стаканом, 354,7 мл води питної. Внівши компоненти розчин перемішують для розчинення компонентів. Стерилізують в автоклаві 40 хв при 131 °С, перед стерилізацією колбу попередньо закривають ватно-марлевым корком. Отримавши стерильний розчин мікроелементів його зберігають в даній колбі до використання на подальших стадіях.

ДР 4. Приготування розчину глюкози для дробного внесення на виробничий синтез

ДР 4.1. Приготування і стерилізація розчину глюкози для дробного внесення на виробничий синтез

Щоб приготувати 35,7 л 51 % розчину глюкози, сформовану на технічних вагах наважку глюкози масою 18,21 кг поміщають в реактор

об'ємом 63 л (Р-24), та через лічильник (Л-23) подають 32,49 л води питної. Для полегшення розчинення глюкози в сорочку реактора подають гостру пару з метою підігрівання розчину до 40 °С з постійним перемішуванням (75 об/хв). Приготувавши розчин його стерилізують гострою парою 20 хв за температури 112 °С.

ДР 5. Приготування і стерилізація поживного середовища

ДР 5.1. Приготування і стерилізація поживного середовища на стадію отримання посівного матеріалу в качалочних колбах

Щоб отримати посівний матеріал в колбах на качалці підготовлюють 300 мл поживного середовища. У таблиці 7.2 наведено кількість компонентів, необхідних для приготування цього об'єму поживного середовища.

Таблиця 7.2

Композиції та їх склад для приготування поживного середовища на стадію отримання посівного матеріалу *Vibrio cholerae* JS1569 в 3 качалочних колбах

Компоненти середовища	Вміст, г/л	Кількість компонентів в 300 мл середовища, г	Композиція	Об'єм, мл
Глюкоза	11	3,3	А	50
Вода		50 мл		
K ₂ HPO ₄	10,1	3,03	Б	150
KH ₂ PO ₄	1,57	0,41		
Вода		150 мл		
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,5	0,75	В	99,7
Цитрат натрію	0,5	0,15		
MgSO ₄	3	0,9		
Вода		99,7 мл		
Розчин мікроелементів	1 мл	0,3 мл	Г	0,3
Разом:				300 мл

ДР 5.1.1. Приготування і стерилізація композиції А

Сформовану на технічних вагах наважку глюкози масою 8,75 г поміщають в колбу об'ємом 100 мл і вносять відміряну мірним стаканом питну воду об'ємом 50 мл. Вміст колби перемішують та стерилізують в

автоклаві 20 хв при 112 °С, перед стерилізацією колбу попередньо закривають ватно-марлевым корком.

ДР 5.1.2. Приготування і стерилізація композиції Б

Сформовані на технічних вагах наважки K_2HPO_4 масою 3,03 г та KH_2PO_4 – 0,41 г поміщають в колбу об'ємом 500 мл і вносять відміряну мірним стаканом питну воду об'ємом 150 мл. Вміст колби перемішують та стерилізують в автоклаві 40 хв при 131 °С, перед стерилізацією колбу попередньо закривають ватно-марлевым корком.

ДР 5.1.3. Приготування і стерилізація композиції В

Сформовані на технічних вагах наважки $(NH_4)_2SO_4$ масою 3,03 г, цитрату натрію – 0,15 г та $MgSO_4$ – 0,9 г поміщають в колбу об'ємом 250 мл і вносять відміряну мірним стаканом питну воду об'ємом 99,7 мл. Вміст колби перемішують та стерилізують в автоклаві 40 хв при 131 °С, перед стерилізацією колбу попередньо закривають ватно-марлевым корком.

ДР 5.2. Приготування і стерилізація поживного середовища на стадію отримання посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 6 л

Щоб отримати посівний матеріал в інокуляторі об'ємом 6 л (І-9) підготовлюють 3,28 л поживного середовища, через невеликий об'єм стерилізація проходитиме в автоклаві. У таблиці 7.3 наведено кількість компонентів, необхідних для приготування цього об'єму поживного середовища.

Таблиця 7.3

Композиції та їх склад для приготування поживного середовища на стадію отримання посівного матеріалу *Vibrio cholerae* JS1569 в інокуляторі об'ємом 6 л

Компоненти середовища	Вміст, г/л	Кількість компонентів в 2,9 л середовища, г	Композиція	Об'єм, мл
Глюкоза	11	31,9	А	500
Вода		500 мл		
K_2HPO_4	10,1	29,29	Б	1 397
KH_2PO_4	1,57	4,55		

Вода		1 397 мл		
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,5	7,25	В	1 000
Цитрат натрію	0,5	1,45		
MgSO ₄	3	8,7		
Вода		1 000 мл		
Розчин мікроелементів	1 мл	2,9 мл	Г	2,9
Разом:				2 900 мл

ДР 5.2.1. Приготування і стерилізація композиції А

Сформовану на технічних вагах наважку глюкози масою 31,9 г поміщають в колбу об'ємом 750 мл і вносять відміряну мірним стаканом питну воду об'ємом 500 мл. Вміст колби перемішують та стерилізують в автоклаві 20 хв при 112 °С, перед стерилізацією колбу попередньо закривають ватно-марлевым корком.

ДР 5.2.2. Приготування і стерилізація композиції Б

Сформовані на технічних вагах наважки K₂HPO₄ масою 29,29 г та KH₂PO₄ – 4,55 г поміщають в колбу об'ємом 3 000 мл і вносять відміряну мірним стаканом питну воду об'ємом 1 397 мл. Вміст колби перемішують та стерилізують в автоклаві 40 хв при 131 °С, перед стерилізацією колбу попередньо закривають ватно-марлевым корком.

ДР 5.2.3. Приготування і стерилізація композиції В

Сформовані на технічних вагах наважки (NH₄)₂SO₄ масою 7,25 г, цитрату натрію – 1,45 г та MgSO₄ – 8,7 г поміщають в колбу об'ємом 2 500 мл і вносять відміряну мірним стаканом питну воду об'ємом 1 000 мл. Вміст колби перемішують та стерилізують в автоклаві 40 хв при 131 °С, перед стерилізацією колбу попередньо закривають ватно-марлевым корком.

ДР 5.3. Приготування і стерилізація поживного середовища на стадію отримання посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 60 л

Щоб отримати посівний матеріал в посівному апараті об'ємом 60 л (ПА-17) підготовлюють 30,5 л поживного середовища, через більший об'єм стерилізувати будуть в реакторах гострою парою, тому при приготуванні середовища зважають на 10 % конденсату який утвориться під час

стерилізації. У таблиці 7.4 наведено кількість компонентів, необхідних для приготування цього об'єму поживного середовища.

Таблиця 7.4

Композиції та їх склад для приготування поживного середовища на стадію отримання посівного матеріалу *Vibrio cholerae* JS1569 в посівному апараті об'ємом 60 л

Компоненти середовища	Вміст, г/л	Кількість компонентів в 30,5 л середовища, г	Композиція	Об'єм, л
Глюкоза	11	335,5	А	6,2
Вода		6,2 л		
Конденсат		0,62 л		0,62
K ₂ HPO ₄	10,1	308,05	Б	21,5
KH ₂ PO ₄	1,57	47,89		
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,5	76,25		
Цитрат натрію	0,5	15,25		
MgSO ₄	3	91,5		
Вода		21,5 л		
Конденсат		2,15 л		2,15
Розчин мікроелементів	1 мл	30,5 мл	В	0,031
Разом:				30,5 л

ДР 5.3.1. Приготування і стерилізація композиції А

Сформовану на технічних вагах наважку глюкози масою 335,5 г поміщають в реактор об'ємом 10 л (Р-12) і вносять через лічильник (Л-11) питну воду об'ємом 6,2 л. В реакторі вмикають мішалку (75 об/хв) для розчинення глюкози та в подальшому 20 хв проводять стерилізацію подаючи гостру пару в реактор для підтримання температури на рівні 112 °С.

ДР 5.3.2. Приготування і стерилізація композиції Б

Сформовані на технічних вагах наважки K₂HPO₄ масою 308,05 г, KH₂PO₄ – 47,89 г, (NH₄)₂SO₄ - 76,25 г, цитрату натрію – 15,25 г та MgSO₄ – 91,5 г поміщають в реактор об'ємом 10 л (Р-14) і вносять через лічильник (Л-13) питну воду об'ємом 6,5 л. В реакторі вмикають мішалку (75 об/хв) для розчинення солей та в подальшому самоплином вміст реактора переміщують в посівний апарат об'ємом 60 л (ПА-17), через лічильник (Л-15) вносять 15 л

води питної для отримання необхідного об'єму композиції вносять розчин хлоридної кислоти (від ДР 2.1), вмикають мішалку для рівномірного розподілу та в подальшому 40 хв проводять стерилізацію подаючи гостру пару в посівний апарат для підтримання температури на рівні 131 °С.

ДР 5.4. Приготування і стерилізація поживного середовища на стадію синтезу біомаси *Vibrio cholerae* JS1569 в ферментері об'ємом 630 л

Для синтезу біомаси *Vibrio cholerae* JS1569 в ферментері об'ємом 630 л (Ф-27) підготовлюють 321 л поживного середовища, через великий об'єм стерилізувати будуть в реакторах гострою парою, тому при приготуванні середовища зважають на 10 % конденсату який утвориться під час стерилізації. У таблиці 7.5 наведено кількість компонентів, необхідних для приготування цього об'єму поживного середовища.

Таблиця 7.5

Композиції та їх склад для приготування поживного середовища на стадію виробничого синтезу біомаси *Vibrio cholerae* JS1569 в ферментері об'ємом 630 л

Компоненти середовища	Вміст, г/л	Кількість компонентів в 321 л середовища, г	Композиція	Об'єм, л
Глюкоза	10	3210	А	53
Вода		53 л		
Конденсат		5,3 л		
K ₂ HPO ₄	10,1	3242,1	Б	238,6
KH ₂ PO ₄	1,57	503,9		
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,5	802,5		
NH ₄ Cl	0,5	160,5		
Цитрат натрію	0,5	160,5		
MgSO ₄	3	963		
Вода		238,6 л		
Конденсат		23,8 л		
Розчин мікроелементів	1 мл	321 мл	В	0,321
Разом:				327,76

ДР 5.4.1. Приготування і стерилізація композиції А

Сформовану на технічних вагах наважку глюкози масою 3 210 г поміщають в реактор об'ємом 63 л (Р-19) і вносять через лічильник (Л-18) питну воду об'ємом 53 л. В реакторі вмикають мішалку (75 об/хв) для розчинення глюкози та в подальшому 20 хв проводять стерилізацію подаючи гостру пару в реактор для підтримання температури на рівні 112 °С.

ДР 5.4.2. Приготування і стерилізація композиції Б

Сформовані на технічних вагах наважки K_2HPO_4 масою 3 242,1 г, KH_2PO_4 – 503,9 г, $(NH_4)_2SO_4$ – 802,5 г, NH_4Cl - 160,5 г, цитрату натрію – 160,5 г та $MgSO_4$ – 963 г поміщають в реактор об'ємом 40 л (Р-21) і вносять через лічильник (Л-20) питну воду об'ємом 28,6 л. В реакторі вмикають мішалку (75 об/хв) для розчинення солей та в подальшому самоплином вміст реактора переміщують в ферментер об'ємом 630 л (Ф-27), через лічильник (Л-22) вносять 210 л води питної для отримання необхідного об'єму композиції вносять розчин хлоридної кислоти (від ДР 2.1), вмикають мішалку для рівномірного розподілу та в подальшому 40 хв проводять стерилізацію подаючи гостру пару в посівний апарат для підтримання температури на рівні 131 °С.

ТП 6. Отримання посівного матеріалу *Vibrio cholerae* JS1569

ТП 6.1. Підтримання колекційної культури *Vibrio cholerae* JS1569

Зберігають колекційну культуру *Vibrio cholerae* JS1569 на скошеному м'ясо-пептонному агарі (МПА) за температури 4 °С. Через кожні 3 місяці культуру пересівають, при роботі з культурою дотримуються строго асептичних умов.

ТП 6.2. Одержання робочої культури

У стерильних умовах, використовуючи бактеріологічну петлю, колекційну культуру *Vibrio cholerae* JS1569 розсівають методом виснажувального штриха на чашки Петрі з агаризованим середовищем (МПА) з метою отримання ізольованих колоній. Чашки поміщають у термостат і інкубують 18 годин при температурі 36 °С.

ТП 6.3. Вирощування посівного матеріалу *Vibrio cholerae* JS1569 на агаризованих поживних середовищах

У стерильних умовах, отримані на попередній стадії (від ТП 6.2), ізолювані колонії пересівають за допомогою бактеріологічної петлі в пробірки з агаризованим середовищем МПА. Кожна пробірка засівається однією ізолюваною колонією, які розташовуються на відстані не менше 1 см. Після пересівання, пробірки інкубують 18 год в термостаті при 36 °С.

ТП 6.4. Вирощування посівного матеріалу *Vibrio cholerae* JS1569 в качалочних колбах

В строго асептичних умовах до колби з стерильною композиції Б вносять 50 мл стерильної композиції А (від ДР 5.1.1), 99,7 мл стерильної композиції В (від ДР 5.1.3) та 0,3 мл стерильного розчину мікроелементів (від ДР 3.1). Отриманий вміст колби перемішують та переливають в три стерильні колби об'ємом 750 мл по 100 мл.

В асептичних умовах до пробірки з робочою культурою *Vibrio cholerae* JS1569 додають 5 мл фізіологічного розчину для створення клітинної суспензії. Отриману суспензію клітин збирають за допомогою піпетки і вносять у колби з поживним середовищем. Для засіву однієї колби використовується суспензія клітин, отримана з однієї пробірки.

Культивування культури здійснюється в колбі на качалці при швидкості 160 обертів на хвилину, при температурі 36 °С, протягом 18 годин. Після закінчення процесу культивування беруть пробу для мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси (С=5 г/л). В асептичних умовах посівний матеріал з трьох колб переносять в стерильну засівну колбу об'ємом 0,5 л.

ТП 6.5. Вирощування посівного матеріалу *Vibrio cholerae* JS1569 в інокуляторі місткістю 6 л

В простерилізованій інокулятор об'ємом 6 л (І-9) вносять 0,5 л стерильної композиції А (від ДР 5.2.1), 1,397 л стерильної композиції Б (від ДР 5.2.2), 1 л стерильної композиції В (від ДР 5.2.3) та 2,9 мл стерильного

розчину мікроелементів (від ДР 3.1). Вмикають мішалку (75 об/хв) для розподілу композицій і вносять посівний матеріал (від ТП 6.4) за допомогою засівної колби.

Посівний матеріал вирощують 18 год при 36 °С з частотою обертання мішалки 160 об/хв та витратою аераційного повітря 0,5 л/(л·хв). Через кожні 4 год, та по завершенню процесу, беруть пробу для мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси (С=5 г/л).

ТП 6.6. Вирощування посівного матеріалу *Vibrio cholerae* JS1569 в посівному апараті місткістю 60 л

До стерильної композиції Б, яка знаходиться в посівному апараті об'ємом 60 л (ПА-17), самоплином подають 6,82 л стерильної композиції А (від ДР 5.3.1), та в строго асептичних умовах вносять 30,5 мл стерильного розчину мікроелементів (від ДР 3.1) і стерильний розчин гідроксиду натрію для отримання оптимального рівня рН 7,5 (від ДР 2.2). Вмикають мішалку (75 об/хв) для розподілу композицій, перистальтичним насосом (Н-10) подають в посівний апарат отриманий на попередній стадії (від ТП6.5) посівний матеріал.

Посівний матеріал вирощують 18 год при 36 °С з частотою обертання мішалки 160 об/хв та витратою аераційного повітря 0,5 л/(л·хв). Через кожні 4 год, та по завершенню процесу, беруть пробу для мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси (С=5 г/л).

ТП 7. Виробничий синтез біомаси *Vibrio cholerae* JS1569

ТП 7.1. Виробничий синтез біомаси *Vibrio cholerae* JS1569 в ферментері місткістю 630 л

До стерильної композиції Б, яка знаходиться в ферментері об'ємом 630 л (Ф-27), самоплином подають 58,32 л стерильної композиції А (від ДР 5.4.1), та в строго асептичних умовах вносять 321 мл стерильного розчину мікроелементів (від ДР 3.1) і стерильний розчин гідроксиду натрію для отримання оптимального рівня рН 7,5 (від ДР 2.2). Вмикають мішалку (75

об/хв) для розподілу композицій та трубою перетискування вносять в ферментер отриманий на попередній стадії (від ТПБ.6) посівний матеріал.

В процесі культивування для збільшеного синтезу біомаси перистальтичним насосом (Н-25) вносять стерильний розчин глюкози (від ДР 4.1), подача розчину відбувається дробно по 3,5 л, через кожну 1 год.

Вирощування біомаси *Vibrio cholerae* JS1569 відбувається до досягнення концентрації 22,9 г/л, впродовж 12 год при 36 °С з частотою обертання мішалки 160 об/хв та витратою аераційного повітря 0,5 л/(л·хв). Через кожні 4 год, та по завершенню процесу, беруть пробу для мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси, джерела азоту та вуглецю.

РОЗДІЛ 8

КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

При вирощуванні *Vibrio cholerae* JS1569 кожні 6 год відбирають проби культуральної рідини для здійснення мікробіологічного контролю, визначення концентрації біомаси, концентрації живих клітин, джерела вуглецю (глюкоза) та азоту (сульфат амонію).

8.1. Мікробіологічний контроль

Мікробіологічний контроль проводять шляхом висіву культури на чашки Петрі з агаризованими середовищами і подальшим мікроскопіюванням.

Культуральну рідину розсівають мікробіологічною петлею до ізольованих колоній на чашки Петрі з триптон-соевим агаром (ТСА) або м'ясо-пептонним агаром (МПА) для випробування на наявність бактерій, а також з сусло-агаром (СА) для виявлення присутності дріжджів та грибів. Після засіву чашки поміщають у термостат для інкубування за температури 37 °С протягом 1-2 діб (МПА/ТСА) та за 30 °С протягом 7 діб (СА) [34]. Після інкубування оглядають чашки, на яких мають бути присутні прозорі, з блакитним відтінком, опуклі дископодібні колонії *Vibrio cholerae* JS1569 з рівними краями. Ріст інших мікроорганізмів не допускається.

Мікроскопіювання здійснюють за допомогою світлового мікроскопа з імерсійною системою (збільшення x90). Для приготування препарату на чисте знежирене предметне скло, в асептичних умовах, за допомогою стерильної петлі наносять краплину культуральної рідини. Краплю розподіляють по склу петлею, так, щоб діаметр мазка становив близько 1 см. Мазок висушують за кімнатної температури до повного видалення вологи. Після цього на препарат за скляною паличкою наносять 1-2 краплі імерсійної олії [34]. Спостерігають клітини *Vibrio cholerae* JS1569 (рис. 8.1), які мають форму зігнутих паличок завдовжки 1,5-3,0 мкм і завширшки 0,3 мкм, є рухливими, зазвичай

3

					НУХТ БТЕК 04.03.40 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Дарієнко П.Р.			РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Пенчук Ю.М.					56	74
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

монотрихіяльно розташованими джгутиками, не утворюють спор і капсул [35].



Рис. 8.1. Клітини *Vibrio cholerae* JS1569 під мікроскопом

8.2. Показники росту і синтезу цільового продукту

8.2.1. Концентрація біомаси

Концентрацію біомаси визначають ваговим методом. Пробу культуральної рідини в кількості 10 мл центрифугують за швидкості 10000 об/хв, температури 4 °C протягом 6 хв. Отриманий супернатант вилучають, вологий осад суспендують у 5 мл фосфатного буферного розчину, після чого центрифугують за вищезгаданих умов. Після вилучення супернатанту вологий осад поміщають у попередньо висушений бюкс і зважують. Бюкс із біомасою висушують за температури 105 °C до постійної маси, після досягнення якої бюкс зважують, розраховують різницю мас до та після сушіння, отримане значення ділять на об'єм проби культуральної рідини та множать на 1000 для переведення концентрації в г/л [5].

8.2.2. Концентрація живих клітин

Концентрація живих клітин у культуральній рідині визначається в реальному часі під час культивування за допомогою датчика Incyte Arg, встановленого у ферментері [36]. Принцип дії датчика ґрунтується на вимірюванні діелектричної провідності, яка прямо пропорційна кількості живих клітин, оскільки тільки такі клітини містять електричний заряд за рахунок цілісності цитоплазматичної мембрани (рис. 8.2). На роботу цього

датчика не впливають зміни складу поживного середовища, тип біологічного агента або наявність великої кількості уламків клітин.

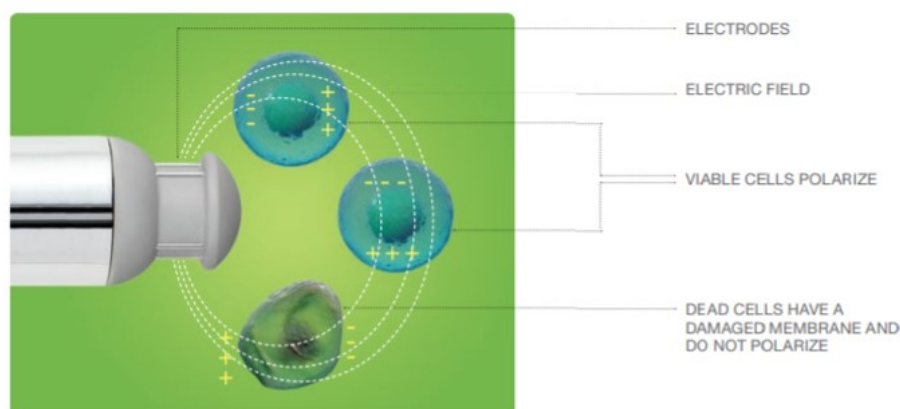


Рис. 8.2. Принцип дії датчика Incyte Arc

8.2.3. Концентрація джерела вуглецю

Джерелом вуглецю в поживному середовищі є глюкоза, концентрацію якої визначають за допомогою набору ab65333 для визначення глюкози [37]. Цим методом можна визначити глюкозу в межах 1-10000 мкМ. Принцип методу полягає в окисненні глюкози сумішшю ферментів з подальшою взаємодією продуктів реакції з барвником OxiRed, результатом чого є утворення забарвленої сполуки, оптичну густину якої визначають за довжини хвилі 570 нм. Реактиви, що входять до складу набору:

- буферний розчин, 25 мл;
- розчин барвника OxiRed, 200 мкл;
- ліофілізована суміш ферментів, 1 флакон;
- стандартний розчин глюкози (100 нмоль/мкл), 100 мкл.

Методика проведення аналізу: пробу культуральної рідини об'ємом 5 мл центрифугують за швидкості 10000 об/хв протягом 5 хв. Отриманий супернатант піддають депротейнізації шляхом додавання 4М розчину перхлоратної кислоти (до концентрації кислоти 1М у суміші) і подальшого витримання суміші за 4 °С протягом 5 хв. Далі суміш центрифугують за 10000 об/хв протягом 5 хв для відділення осаду білків, після чого до отриманого супернатанту додають 2М розчин калію гідроксиду (в кількості, яка становить 34 % від об'єму супернатанту) для осадження надлишку

перхлоратної кислоти та доведення рН суміші до рівня 6,5-8,0. Отриману суміш центрифугують за вищезгаданих умов, супернатант збирають. 1 мл отриманого супернатанту поміщають у мірну колбу об'ємом 100 мл і доводять об'єм розчину до мітки дистильованою водою (для розведення зразка в 100 разів). Відбирають піпеткою 25 мкл утвореного розчину, поміщають у лунку мікропланшета, доводять об'єм розчину до 50 мкл шляхом додавання буферного розчину. Паралельно також готують початковий стандартний розчин глюкози (1 мл, 1 нмоль/мкл) розведенням 10 мкл стандартного розчину глюкози з набору в 990 мкл буферного розчину. З отриманого розчину готують серію з 6 стандартних розчинів з метою отримати концентрації глюкози 0, 2, 4, 6, 8 і 10 нмоль/лунку. Далі готують реакційну суміш змішуванням розчину барвника OxiRed, суміші ферментів і буферного розчину, у розрахунку 50 мкл на кожну лунку (2 мкл барвника, 2 мкл ферментів і 46 мкл буферу). Отриману суміш додають у лунки, мікропланшет інкубують у термостаті за 37 °С протягом 30 хв, після чого здійснюють вимірювання оптичної густини розчинів за допомогою зчитувача мікропланшетів (довжина хвилі 570 нм). За отриманими значеннями оптичної густини стандартних розчинів будують калібрувальний графік, за яким визначають концентрацію глюкози в досліджуваному зразку.

8.2.4. Концентрація джерела азоту

Джерелом азоту в поживному середовищі є амонію сульфат ((NH₄)₂SO₄), отже, здійснюють визначення концентрації катіонів амонію, використовуючи реактив Несслера. Необхідні реактиви:

- концентрована сульфатна кислота;
- перекис водню (29-35 %);
- реактив Несслера;
- розчин сульфату амонію, що містить 0,05 мг/мл азоту [38].

Методика проведення аналізу: пробу культуральної рідини об'ємом 5 мл центрифугують за швидкості 10000 об/хв протягом 5 хв. 1 мл отриманого супернатанту мінералізують на піщаній бані (2 паралельні проби) з 0,1 мл

концентрованої сульфатної кислоти в пробірках зі скляними ковпачками. Паралельно мінералізують контрольну пробу, яка містить 0,1 мл концентрованої сульфатної кислоти. Для прискорення мінералізації в охолоджені випробовувані та контрольні проби періодично додають по 1-2 краплі перекису водню. Спалювання продовжують до знебарвлення вмісту пробірок. До отриманих мінералізаторів додають по 8,9 мл дистильованої води, попередньо обмивши ковпачок, ретельно перемішують розчини. На колориметрування відбирають по 1 мл розчину мінералізатору, до якого додають 8,5 мл дистильованої води, перемішують, а потім вносять по 0,5 мл реактиву Несслера. Проби перемішують і колориметрують на фотоелектроколориметрі за довжини хвилі 400 нм в кюветах товщиною 10 мм. Розчином порівняння служить розчин, приготований аналогічно зразку. Вміст загального азоту в препараті у відсотках (X) обчислюють за формулою:

$$X = (B \times 10 \times 100 \times 100) / 1,0 \times 1,0 \times 1000000 = B/10,$$

де B – кількість азоту, мкг, визначена за калібрувальним графіком; 10 – розведення мінералізатору; 100 – ступінь розведення рідкого гідролізатору; 100 – коефіцієнт перерахунку, %; 1,0 – кількість препарату, мл, взятого для колориметрування; 1,0 – кількість досліджуваного зразка, мл, взятого для мінералізації; 1000000 – коефіцієнт перерахунку, г [38].

8.3. Карта постадійного контролю

Таблиця 8.1

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю та визначуваний показник	Засоби та методи контролю	Періодичність відбору проб	Нормативні значення показника
1	2	3	4	5
1.1 Забір повітря К _т	<u>повітрязабірник</u> висота повітрязабірника	-	Під час придбання та встановлення	H = 15 м
1.2 Попереднє грубе очищення повітря К _т	<u>повітря</u> ступінь очищення	Відповідно до паспорта фільтра	На виході з фільтра	E = 90 %
1.3 Подача повітря на компресор К _т	<u>стиснене повітря</u> тиск, температура	Манометр, термометр	На виході з компресора	t° = 250 °C P = 0,4 МПа

Продовження табл. 8.1

1	2	3	4	5
1.4 Охолодження повітря та видалення вологи K _T	<u>повітря</u> температура, вологість	Термометр, психрометр	На виході з теплообмінника	W = 60 % t° = 15 °C
1.5 Підігрів повітря K _T	<u>повітря</u> температура, вологість	Термометр, психрометр	На виході з теплообмінника	W = 50 % t° = 35 °C
1.6 Тонке очищення повітря K _T	<u>повітря</u> ступінь очищення	Відповідно до паспорта фільтра	На виході з фільтра	E = 92 %
1.7 Очищення повітря на індивідуальних фільтрах K _T	<u>повітря</u> ступінь очищення	Відповідно до паспорта фільтра	На виході з фільтра	E = 99,995 %
2.1 Приготування розчину хлоридної кислоти K _X	<u>розчин хлоридної кислоти</u> вміст HCl	Хімічне визначення з використанням натрію тетраборату та метилового червоного	Після приготування розчину	C = 6 %
2.2 Приготування та стерилізація розчину натрію гідроксиду K _T , K _M	<u>розчин натрію гідроксиду</u> час, тиск, температура, стерильність	Годинник, манометр, датчик температури, мікробіологічний контроль	Тиск, температура – автоматично; час – безперервно під час стерилізації; мікробіологічний контроль – після стерилізації	t° = 131 °C P = 0,15 МПа t = 40 хв стерильність
3.1 Приготування та стерилізація розчину мікроелементів на потреби технологічного процесу K _T , K _M	<u>розчин мікроелементів</u> час, тиск, температура, стерильність	Годинник, манометр, датчик температури, мікробіологічний контроль	Тиск, температура – автоматично; час – безперервно під час стерилізації; мікробіологічний контроль – після стерилізації	t° = 131 °C P = 0,15 МПа t = 40 хв стерильність
4.1 Приготування і стерилізація розчину глюкози для дробного внесення на виробничий синтез K _T , K _M	<u>розчин глюкози</u> температура розчинення, швидкість обертання мішалки, тиск, температура та час стерилізації, стерильність	Годинник, манометр, тахометр, датчик температури, мікробіологічний контроль	Швидкість обертання мішалки, тиск, температура – автоматично, мікробіологічний контроль – після стерилізації	n = 75 об/хв t° (розч.) = 40 °C P = 0,05 МПа t° (стер.) = 112 °C t = 30 хв стерильність
5.1.1, 5.2.1 Приготування і стерилізація композиції А K _T , K _M	<u>композиція А</u> тиск, температура, час	Манометр, датчик температури, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск і температура підтримуються автоматично; час вимірюється безперервно під час стерилізації; мікробіологічний контроль – після стерилізації	P = 0,05 МПа t° = 112 °C t = 20 хв стерильність

Продовження табл. 8.1

1	2	3	4	5
5.1.2, 5.2.2 Приготування і стерилізація композиції Б K _T , K _M	<u>композиція Б</u> тиск, температура, час	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск і температура підтримуються автоматично; час вимірюється безперервно під час стерилізації; мікробіологічний контроль – після стерилізації	P = 0,15 МПа t° = 131 °C t = 40 хв стерильність
5.1.3, 5.2.3 Приготування і стерилізація композиції В K _T , K _M	<u>композиція В</u> тиск, температура, час	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск і температура підтримуються автоматично; час вимірюється безперервно під час стерилізації; мікробіологічний контроль – після стерилізації	P = 0,15 МПа t° = 131 °C t = 40 хв стерильність
5.3.1, 5.4.1 Приготування і стерилізація композиції А K _T , K _M	<u>композиція А</u> швидкість обертання мішалки, тиск, температура, час	Тахометр, манометр, датчик температури, годинник, мікробіологічний контроль	Швидкість обертання мішалки, тиск і температура підтримуються автоматично; час вимірюється безперервно під час стерилізації; мікробіологічний контроль – після стерилізації	n = 75 об/хв P = 0,05 МПа t° = 112 °C t = 20 хв стерильність
5.3.2, 5.4.2 Приготування і стерилізація композиції Б K _T , K _M	<u>композиція Б</u> швидкість обертання мішалки, рН, тиск, температура, час	Тахометр, манометр, датчики температури та рН, годинник, мікробіологічний контроль	Швидкість обертання мішалки, тиск і температура підтримуються автоматично; рН – перед стерилізацією; час вимірюється безперервно під час стерилізації; мікробіологічний контроль – після стерилізації	n = 75 об/хв рН = 4,0 P = 0,15 МПа t° = 131 °C t = 40 хв стерильність
6.1 Підтримання колекційної культури <i>Vibrio cholerae</i> JS1569 K _T , K _M	<u>колекційна культура <i>Vibrio cholerae</i> JS1569</u> температура, мікробіологічна чистота	Датчик температури, мікробіологічний контроль	Температура – автоматично; мікробіологічний контроль - кожні 3 місяці	t° = 4 °C t = 3 місяці мікробіологічна чистота
6.2 Одержання робочої культури K _T , K _M	<u>робоча культура <i>Vibrio cholerae</i> JS1569</u> температура, час, мікробіологічна чистота	Датчик температури, годинник, мікробіологічний контроль	Температура – автоматично; час – безперервно під час інкубування; мікробіологічний контроль - кожні 3 місяці	t° = 36 °C t = 18 год мікробіологічна чистота

1	2	3	4	5
6.3 Вирощування посівного матеріалу <i>Vibrio cholerae</i> JS1569 на агаризованих поживних середовищах К _Т , К _М	<u>робоча культура</u> <u><i>Vibrio cholerae</i></u> <u>JS1569</u> температура, час, мікробіологічна чистота	Датчик температури, годинник, мікробіологічний контроль	Температура – автоматично; час – безперервно під час інкубування; мікробіологічний контроль - кожні 3 місяці	t° = 36 °C t = 18 год мікробіологічна чистота
6.4 Вирощування посівного матеріалу <i>Vibrio cholerae</i> JS1569 в качалочних колбах К _Т , К _М	<u>посівний матеріал</u> температура, швидкість обертання колб, час, концентрація біомаси, мікробіологічна чистота	Термометр, тахометр, годинник, фотоелектроколориметр, мікробіологічна чистота	Температура, швидкість обертання колб – автоматично; час – безперервно під час культивування, мікробіологічний контроль і концентрація біомаси – після культивування	t° = 36 °C t = 18 год n = 160 об/хв C (біомаси) = 5 г/л мікробіологічна чистота
6.5 Вирощування посівного матеріалу <i>Vibrio cholerae</i> JS1569 в інюкуляторі місткістю 6 л К _Т , К _М	<u>посівний матеріал</u> температура, швидкість обертання мішалки, швидкість аерації, час, концентрація біомаси, мікробіологічна чистота	Датчик температури, тахометр, ротаметр, годинник, фотоелектроколориметр, мікробіологічна чистота	Температура, швидкість обертання мішалки та швидкість аерації – автоматично; час – безперервно під час культивування, мікробіологічний контроль і концентрація біомаси – кожні 6 год і після культивування	t° = 36 °C t = 18 год n = 160 об/хв v (аераційного повітря) = 0,5 л/(л*хв) C (біомаси) = 5 г/л мікробіологічна чистота
6.6 Вирощування посівного матеріалу <i>Vibrio cholerae</i> JS1569 в посівному апараті місткістю 60 л К _Т , К _М	<u>посівний матеріал</u> температура, рН, швидкість обертання мішалки, швидкість аерації, час, концентрація біомаси, мікробіологічна чистота	Датчики температури та рН, тахометр, ротаметр, годинник, фотоелектроколориметр, мікробіологічна чистота	рН – перед культивуванням, температура, швидкість обертання мішалки та швидкість аерації – автоматично; час – безперервно під час культивування, мікробіологічний контроль і концентрація біомаси – кожні 6 год і після культивування	pH = 7,5 t° = 36 °C t = 18 год n = 160 об/хв v (аераційного повітря) = 0,5 л/(л*хв) C (біомаси) = 5 г/л мікробіологічна чистота

1	2	3	4	5
<p>7.1 Виробничий синтез біомаси <i>Vibrio cholerae</i> JS1569 в ферментері місткістю 630 л K_T, K_M, K_X</p>	<p><u>культуральна</u> <u>рідина</u> температура, рН, швидкість обертання мішалки, швидкість аерації, час, концентрація біомаси, мікробіологічна чистота</p>	<p>Датчики температури та рН, тахометр, ротаметр, годинник, фотоелектроколориметр, мікробіологічна чистота</p>	<p>рН – перед культивуванням, температура, швидкість обертання мішалки та швидкість аерації– автоматично; час – безперервно під час культивування, мікробіологічний контроль і концентрація біомаси – кожні 6 год і після культивування</p>	<p>рН = 7,5 t° = 36 °С t = 12 год n = 160 об/хв v (аераційного повітря) = 0,5 л/(л*хв) С (біомаси) = 22,9 г/л мікробіологічна чистота</p>

РОЗДІЛ 9

АНАЛІЗ ПЕРСПЕКТИВ ВПРОВАДЖЕННЯ СИСТЕМИ ЕКОЛОГІЗАЦІЇ ВИРОБНИЦТВА

У результаті виробництва біомаси *Vibrio cholerae* JS1569 утворюються рідкі, газоподібні та тверді відходи. До рідких належать відпрацьовані розчини мийних і дезінфекційних засобів, а також титрувальних агентів. Газоподібні відходи – це відпрацьоване повітря, що виводиться з посівних апаратів і виробничого ферментера під час культивування. Твердими відходами є пакування від використовуваної сировини (компонентів поживного середовища). З метою захисту довкілля від негативного впливу згаданих відходів на підприємстві необхідно встановити системи їх знешкодження/утилізації.

9.1. Система знешкодження рідких відходів

Усі рідкі відходи виробництва збираються в одній ємності, після чого утворену суміш, за потреби, нейтралізують (до рН 7,0) шляхом додавання хлоридної кислоти або натрію гідроксиду. Для подальшої обробки суміші можна використовувати систему (рис. 9.1), яка складається з ємності, в якій відбувається попередня солюбілізація можливих нерозчинних компонентів, та метантенка (у якому відбувається метаногенез у термофільних умовах) з мембранним біореактором. За допомогою такої системи можна не тільки ефективно очистити рідкі відходи, а й отримати біогаз, який може бути повторно використаний на підприємстві [39].

					НУХТ БТЕК 04.03.40 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Дарієнко П.Р.			РОЗДІЛ 9. Аналіз перспектив впровадження системи екологізації виробництва	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Пенчук Ю.М.					65	74
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

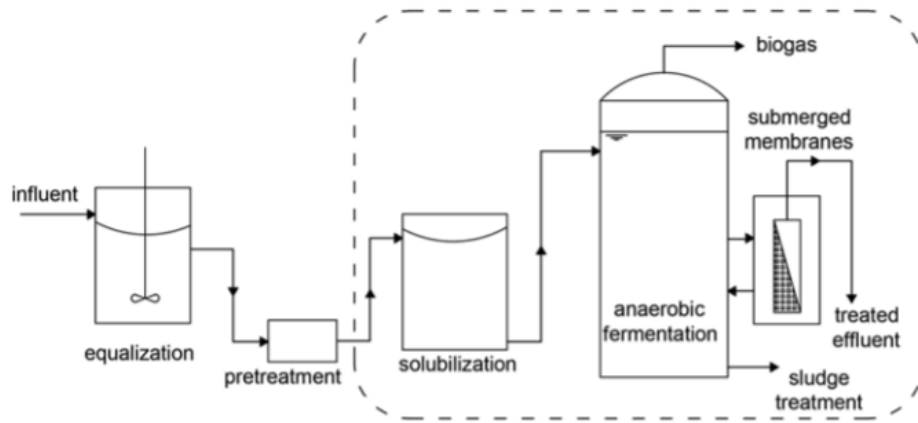


Рис. 9.1. Система знешкодження рідких відходів з мембранним біореактором

9.2. Система знешкодження газоподібних відходів

Газоподібні відходи (відпрацьоване повітря, що відводиться від ферментаційного обладнання) можуть бути очищені за допомогою системи, схема якої наведена на рис. 9.2 [40].

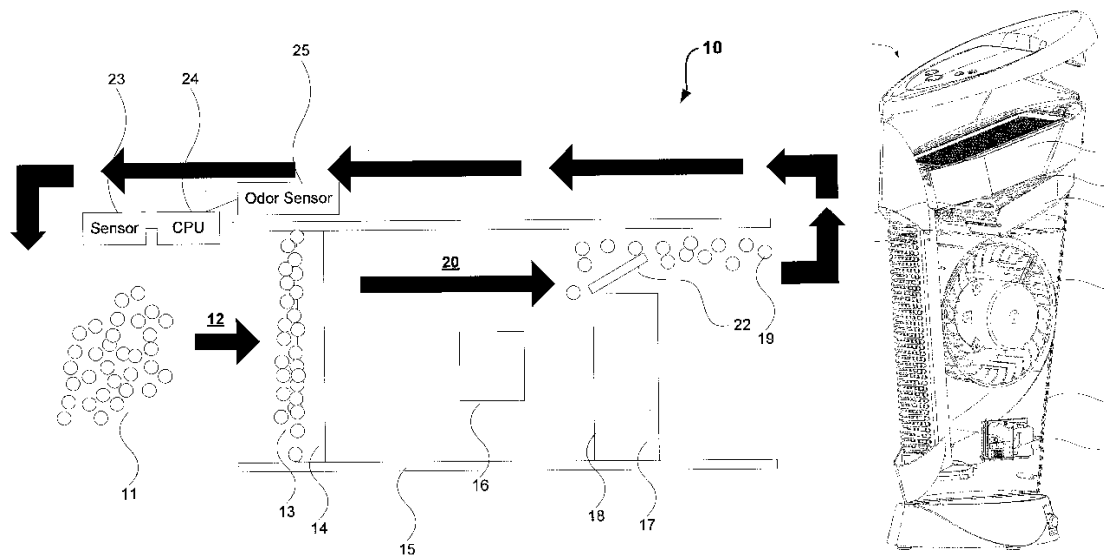


Рис. 9.2. Система знешкодження газоподібних відходів

Наведена система містить корпус (15), компонент для видалення пилу (14) – електростатичний осаджувач або фільтр типу НЕРА, клапан для керування потоком повітря всередині пристрою (22), УФ-лампа (16), молекулярне сито з діоксидом титану(IV) (17), датчик пилу (23) і центральний процесор (24). Датчик пилу (23) підключений до центрального процесора (24). Центральний процесор (24) підключений до клапана (22) і контролює його закритий і відкритий стан. УФ-лампа (16) опромінює

поверхню НЕРА-фільтра (14), чим запобігає накопиченню клітин мікроорганізмів на його поверхні. Витяжний вентилятор втягує повітря з положення (12). Більші частинки пилу (11) видаляються, коли повітря проходить через НЕРА-фільтр (14). Частинки ж меншого розміру, що залишилися, проходять через УФ-лампу (16) і виводяться з апарата, коли клапан (22) відкритий і залишають апарат (19). За умов високого вмісту пилу в повітрі клапан (22) відкривається та дозволяє повітрю обходити молекулярне сито (17), що сприяє захисту та подовженню терміну служби цього елемента системи.

9.3. Знешкодження твердих відходів

Пакування від використаної сировини збирають у спеціально відведеному на підприємстві місці та передають на вторинну переробку компанії, з якою укладено угоду про утилізацію твердих відходів.

РОЗДІЛ 10

НОРМАТИВНО-ТЕХНІЧНА ДОКУМЕНТАЦІЯ, ВИКОРИСТАНА ПІД ЧАС ПРОЕКТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВА

Обов'язковим для виробництва є використання нормативно-технічної документації, для виробничого синтезу біомаси *Vibrio cholerae* JS1569 застосовується низка технічної документації, декілька прикладів яких наведено далі.

ДСТУ 3803-98 Біотехнологія. Терміни та визначення [41]

ДСТУ EN 12683:2019 Біотехнологія. Змінені організми для використання в довкіллі. Настанови щодо складання характеристики генетично зміненого організму через аналізування тривкості зміни геному на молекулярному рівні (EN 12683:1998, IDT) [42]

ДСТУ EN 12460:2019 Біотехнологія. Великосерійна технологія та виготовлення. Настанови щодо вибирання та встановлення устаткування відповідно до біологічного ризику (EN 12460:1998, IDT) [43]

ДСТУ EN 12689:2019 Біотехнологія. Настанови щодо оцінювання чистоти, біологічної активності та тривкості продуктів на основі мікроорганізмів (EN 12689:1998, IDT) [44]

ДСТУ Б А.3.2-12:2009 Системи вентиляційні. Загальні вимоги [45]

ДСТУ 8828:2019 Пожежна безпека. Загальні положення [46]

ДСТУ 4462.0.01:2005 Охорона природи. Поводження з відходами. Терміни та визначення понять [47]

ДСТУ ISO 9001:2015. Системи управління якістю. Вимоги (ISO 9001:2015, IDT) [48]

ДСТУ ISO 14001:2015 Системи екологічного управління. Вимоги та настанови щодо застосовування (ISO 14001:2015, IDT) [49]

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	НУХТ БТЕК 04.03.40 КР ПЗ			
Розроб.		Дарієнко П.Р.			РОЗДІЛ 10. Нормативно-технічна документація, використана під час проектування виробництва	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Пенчук Ю.М.					68	74
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

ЛИТЕРАТУРА

1. Pezzoli L. Global oral cholera vaccine use, 2013–2018. *Vaccine*. 2019. doi:10.1016/j.vaccine.2019.08.086
2. Song KR, Lim JK, Park SE, Saluja T, Cho S-I, Wartel TA, Lynch J. Oral Cholera Vaccine Efficacy and Effectiveness. *Vaccines*. 2021, 9(12):1482. <https://doi.org/10.3390/vaccines9121482>.
3. Shaikh H., Lynch J., Kim, J., & Excler, J.-L. (2019). Current and future cholera vaccines. *Vaccine*. doi:10.1016/j.vaccine.2019.12.011
4. Sit B., Fakoya B. Emerging Concepts in Cholera Vaccine Design. *Annual Review of Microbiology*. 2022, 76: 681-702. doi: 10.1146/annurev-micro-041320-033201
5. Amulya K. Panda, Anuja Ghorpade, Asok Mukhopadhyay, Talwar G. P., Garg L. C. High cell density fermentation of recombinant *Vibrio cholerae* for the production of B subunit of *Escherichia coli* enterotoxin. 1995, 45 (3): 245–250. doi:10.1002/bit.260450309.
6. de Maré L.; Andersson L.; Hagander P. Probing control of glucose feeding in *Vibrio cholerae* cultivations. 2003, 25(4): 221–228. doi:10.1007/s00449-002-0304-y.
- 7.
8. *Vibrio* [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781118960608.gbm01078>
9. *Vibrio cholerae* [Электронный ресурс] // Режим доступа: https://en.wikipedia.org/wiki/Vibrio_cholerae
10. Cholera: Environmental Reservoirs and Impact on Disease Transmission. (n.d.). *One Health*, 149–165. doi:10.1128/microbiolspec.oh-0003-2012
11. Sack, D. A., Sack, R. B., Nair, G. B., & Siddique, A. (2004). Cholera. *The Lancet*, 363(9404), 223–233. doi:10.1016/s0140-6736(03)15328-7
12. Azman, A. S., Rudolph, K. E., Cummings, D. A. T., & Lessler, J. (2013). The incubation period of cholera: A systematic review. *Journal of Infection*, 66(5), 432–438. doi:10.1016/j.jinf.2012.11.013

13. Sauvageot, D., Njanpop-Lafourcade, B.-M., Akilimali, L., Anne, J.-C., Bidjada, P., Bompangue, D., ... Mengel, M. A. (2016). Cholera Incidence and Mortality in Sub-Saharan African Sites during Multi-country Surveillance. PLOS Neglected Tropical Diseases, 10(5), e0004679. doi:10.1371/journal.pntd.0004679

14. Guillaume, Y., Ternier, R., Vissieres, K., Casseus, A., Chery, M. J., & Ivers, L. C. (2018). Responding to Cholera in Haiti: Implications for the National Plan to Eliminate Cholera by 2022. The Journal of Infectious Diseases, 218(suppl_3), S167–S170. doi:10.1093/infdis/jiy491

15. Cholera worldwide overview [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://www.ecdc.europa.eu/en/all-topics-z/cholera/surveillance-and-disease-data/cholera-monthly>

16. В Держтуризму розповіли, скільки українців минулого року відпочивали за кордоном [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://www.unian.ua/tourism/news/ukrajinci-turisti-u-2021-roci-zdiysnili-mayzhe-15-milyoniv-podorozhey-za-kordon-novini-11679538.html>

17. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes [Електронний ресурс] // Режим доступу: https://www.kegg.jp/kegg-bin/search_pathway_text?map=vch&keyword=glucose&mode=1&viewImage=true

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

19. Мешалка Пропеллерная 4-Х Лопастная С Диагональными Лопастями, Нержавеющая Сталь 1.4404, 8 Мм, 540 Мм [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://lab-shop.com.ua/9197009-meshalka-propellernaya-4-h-lopastnaya-s-diagonalnymi-lopastyami-nerjaveyushchaya-stal-14404.html>

20. Дезактин [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://oazistd.all.biz/uk/dezaktin-g24691556>

21. Методичні рекомендації [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://atma.ua/download/?id=183>

22. Антимікробна дія, Ексан Про Дез [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://novahim.com.ua/eksan-pro-dez-mojushchee-sredstvo-dlja-udaleniya-zhirovyh-zagrjaznenij-2>
23. Каустик [Електронний ресурс] // Режим доступу: https://klebrig.com.ua/ua/p902982226-kausticheskaya-soda-klebrig.html?source=merchant_center&utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=Perf_Max-Turboweb&gclid=CjwKCAjwvpCkBhB4EiwAujULMnM1gBLHg-f0SqxdhF4eAyjL4cF_r0ge4w8aGrgoiDvDydEshR4VUhoCXYQQA_vD_BwE
24. Кишеньковий фільтр для вентиляції (G3) [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://tehno-parts.com.ua/ua/karmannyi-filtr-dlia-ventiliatsii-g3>
25. Компресор Scheppach HC 100DC (412 л/мин, 100 л) [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://fajno.in.ua/ua/p680680328-kompressor-scheppach-100dc.html>
26. Кожухотрунні охолоджувачі [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://opeks.ua/ua/kozhuxotrubni-oxolodzhuvachi>
27. Парові калорифери (нагрівачі) [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://opeks.ua/ua/parovi-kaloriferi-nagrivachi>
28. ФВК 490x592x300x5xF6 Фільтр кишеньковий [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://tehno-parts.com.ua/ua/fvk-490x592x300h5hf6-filtr-karmannyi>
29. HEPA фільтр 305*610*78 H14 ФяС [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://tehno-parts.com.ua/ua/hepa-filtr-30561078-h14-fias>
30. Solaris Industrial S-I SERIES [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://www.solarisbiotech.com/en/fermenters-bioreactors-pilot-industrial-customizable>
31. Перистальтичні насоси [Електронний ресурс] // Режим доступу: https://tapflo.ua/images/pt_ptl_ua_rev1_2019.pdf
32. Дозатор води і рідин [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://agro-teh.com.ua/ua/p370228267-dozator-vody-zhidkostej.html>

33. Апарати сталіні емальовані з механічним змішуючим пристроєм [Електронний ресурс] // Режим доступу: http://euromash.kiev.ua/ua/aparati_emal_mehanicheskim_perem_ustroystvom_ua.php

34. Загальна мікробіологія і вірусологія: Лабораторний практикум для студентів напрямку 6.051401 «Біотехнологія» денної форми навчання / Уклад. Т.П. Пирог, М.М. Антонюк, С.В. Ігнатенко. – К.: НУХТ, 2010. – 129 с.

35. ХОЛЕРА [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/224/xolera>.

36. Incyte Arc Sensors [Електронний ресурс] // Режим доступу: https://assets-sensors.hamiltoncompany.com/File-Uploads/10072078-02_Manual_IncyteArc-Sensors_LR.pdf?v=1625551224

37. ab65333 – Glucose Assay kit (Colorimetric/Fluorometric) [Електронний ресурс] // Режим доступу: [https://www.abcam.com/ps/products/65/ab65333/documents/Glucose-Assay-kit-protocol-book-v14-ab65333%20\(website\).pdf](https://www.abcam.com/ps/products/65/ab65333/documents/Glucose-Assay-kit-protocol-book-v14-ab65333%20(website).pdf)

38. Методы контроля бактериологических питательных сред. Методические указания. МУК 4.2.2316–08/ Информационно–правовой портал «BestPravo». – 2011. – [Електронний ресурс] Режим доступу до док.: <http://www.bestpravo.ru/rossijskoje/bs-gosudarstvo/a3g/index.htm>.

39. Dezotti M., Lippel G., Bassin J. P. (2018). Advanced Biological Processes for Wastewater Treatment. doi:10.1007/978-3-319-58835-3

40. Chan Y. W., Law S. C. Air purification apparatus: пат. US8211208B2. Опубл. 03.07.2012. <https://patents.google.com/patent/US8211208B2>

41. ДСТУ 3803-98 [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://national_standards_ukr.academic.ru/20655/%D0%94%D0%A1%D0%A2%D0%A3_3803-98

42. ДСТУ EN 12683:2019 Біотехнологія. Змінені організми для використання в довкіллі. Настанови щодо складання характеристики генетично зміненого організму через аналізування тривкості зміни геному на

молекулярному рівні (EN 12683:1998, IDT) [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://online.budstandart.com/ua/catalog/doc-page.html?id_doc=84130

43. ДСТУ EN 12460:2019 Біотехнологія. Великосерійна технологія та виготовлення. Настанови щодо вибирання та встановлення устаткування відповідно до біологічного ризику (EN 12460:1998, IDT) [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://online.budstandart.com/ua/catalog/doc-page.html?id_doc=84126

44. ДСТУ EN 12689:2019 Біотехнологія. Настанови щодо оцінювання чистоти, біологічної активності та тривкості продуктів на основі мікроорганізмів (EN 12689:1998, IDT) [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://online.budstandart.com/ua/catalog/doc-page.html?id_doc=84132

45. ДСТУ Б А.3.2-12:2009 Системи вентиляційні. Загальні вимоги [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://ksv.do.am/GOST/DSTY_ALL/DSTY4/dsty_b_a.3.2-12-2009.pdf

46. ДСТУ 8828:2019 Пожежна безпека. Загальні положення [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://online.budstandart.com/ua/catalog/doc-page.html?id_doc=82138

47. ДСТУ 4462.0.01:2005 Охорона природи. Поводження з відходами. Терміни та визначення понять [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://online.budstandart.com/ua/catalog/doc-page.html?id_doc=51368

48. ДСТУ ISO 1042:2005 Посуд лабораторний скляний. Колби мірні з однією позначкою (ISO 1042:1998, IDT) [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://online.budstandart.com/ua/catalog/doc-page.html?id_doc=53493

49. ДСТУ ISO 14001:2015 Системи екологічного управління. Вимоги та настанови щодо застосовування (ISO 14001:2015, IDT). [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://quality.nuph.edu.ua/wp-content/uploads/2018/10/%D0%94%D0%A1%D0%A2%D0%A3-ISO_14001-2015-.pdf

