

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ**

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

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

«__» червня 2022 р.

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

«__» червня 2022 р.

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА**

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код та назва спеціальності)

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

на тему: Біосинтез стрептокінази *Escherichia coli*

Виконала: здобувачка 4 курсу, групи 1

ЗАГОРОДНЮК Тетяна Євгенівна

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Керівник КРАСІНЬКО Вікторія Олегівна

(прізвище, ім'я та по батькові повністю)

(підпис)

Консультанти

(ім'я та прізвище)

(підпис)

(ім'я та прізвище)

(підпис)

(ім'я та прізвище)

(підпис)

Рецензент Андрій КОТИНСЬКИЙ

(ім'я та прізвище)

(підпис)

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

Здобувачка

(підпис)

Київ - 2022р.

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

“ 04 ” квітня 20 22 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

ЗАГОРОДНІЮК Тетяни Євгеніївни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Біосинтез стрептокінази *Escherichia coli*

керівник роботи КРАСІНЬКО Вікторія Олегівна
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

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

2. Строк подання здобувачем роботи 03.06.2022

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Escherichia coli* BL 21 (DE3),
цільовий продукт: фермент стрептокіназа, річна потужність проєктованого
виробництва стрептокінази становитиме 22,2 кг., кількість трудоднів – 60
кількість продукту за один цикл – 1,07 м³/цикл.

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту, РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента, РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування, РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору стадій виробництва, РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання, РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми процесу отримання стрептокінази за культивування *e.coli* bl21 (de3), РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва стрептокінази, РОЗДІЛ 8. Охорона довкілля

5. Перелік графічного матеріалу
Технологічна схема виробництва стрептокінази – 2 аркуші формату А1.
Апаратурна схема виробництва стрептокінази – 2 аркуші формату А1.

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання _____ 04 квітня 2022 року _____

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Характеристика цільовго продукту	04.04.22 - 11.04.22	
2	Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	11.04.22 - 18.04.22	
3	Техніко-економічне обґрунтування	18.04.22 - 25.04.22	
4	Обґрунтування вибору стадій виробництва	25.04.22 - 02.05.22	
5	Специфікація обладнання	02.05.22 - 10.05.22	
6	Виконання графічної частини проекту	02.04.22 - 10.05.22	
7	Опис технологічної схеми процесу	10.05.22 - 17.05.22	
8	Контроль виробництва стрептокінази	17.05.22 - 24.05.22	
9	Охорона довкілля	24.05.22 - 01.06.22	
10	Оформлення пояснювальної записки	17.05.22 - 01.06.22	

Здобувачка _____
(підпис)

Тетяна ЗАГОРОДНЮК
(ім'я та прізвище)

Керівник роботи _____
(підпис)

Вікторія КРАСІНЬКО
(ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Даний проект присвячено розробленню виробничого біосинтезу стрептокінази штамом *Escherichia coli* BL21 (DE3).

Технологічний процес складається з допоміжних (підготовка аераційного повітря, приготування та стерилізація поживного середовища, титрувальних розчинів, приготування підживлюючих розчинів глюкози, мікроелементів заданих об'ємів) та основних робіт (вирощування інокуляту в колбах на качалках, інокуляторі та посівному апараті, та виробничий біосинтез в біореакторі об'ємом 2м³ з коефіцієнтом заповнення 0,65). Технологія біосинтезу стрептокінази передбачає використання культивування з підживленням. Розрахована потужність виробництва складає 39,6 м³ культуральної рідини за 60 днів, інші дні будуть відведені на біосинтез другого компонента препарату «Стрептокіназа-Стрептодорназа» - стрептодорназу.

Кваліфікаційна робота складається з реферату, змісту, переліку умовних позначень, вступу, восьми розділів, списку використаних джерел з 101 найменування та додатків, АС та ТС (4 креслення формату А1). Загальний обсяг роботи – 126 сторінок, 12 рисунків, 14 таблиць.

Ключові слова: стрептокіназа, запальні захворювання органів малого таза (ЗЗОМТ), штам- продуцент, БГКП, *E. coli* BL21 (DE3), оптимальні умови, стадії виробництва, техніко-економічне обґрунтування, виробничий біосинтез, контроль.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ЗЗОМТ	–	Запальні захворювання органів малого таза
СК	–	Стрептокіназа
СД	–	Стрептодорназа
ДНК	–	Дезоксирибонуклеїнова кислота
КР	–	Культуральна рідина
ПАР	–	Поверхнево-активні речовини

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	5
ЗМІСТ	6
ВСТУП.....	8
ВСТУП.....	8
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	10
РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА.....	12
2.1. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА ТА ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ЙОГО КУЛЬТИВУВАННЯ	12
2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента	19
2.2.1. Морфолого-цитологічні ознаки <i>E.coli</i>	19
2.2.2. Культуральні ознаки <i>E.coli</i>	21
2.2.3. Біохімічні властивості <i>Escherichia coli</i>	22
2.2.4. Стійкість <i>Escherichia coli</i>	23
2.3. Таксономічний статус біологічного агента	23
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ.....	24
3.1. Потреба населення України в стрептокіназі.....	24
3.2. Розрахунок потужності виробництва стрептокінази.....	26
3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів для біосинтезу стрептокінази.....	27
3.4 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для біосинтезу стрептокінази <i>E. COLI</i> BL21 (DE3)	28
РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ СТАДІЙ ВИРОБНИЦТВА.....	31
4.1. ОБҐРУНТУВАННЯ ДОФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ТА ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ	31
4.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера	31
4.1.2 Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря	34
4.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів	38
4.1.4 Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища.....	53
РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ.....	59
РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ПРОЦЕСУ ОТРИМАННЯ СТРЕПТОКІНАЗИ ЗА КУЛЬТИВУВАННЯ <i>E. COLI</i> BL21 (DE3)	69
РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА СТРЕПТОКІНАЗИ.....	86
7.1. Мікробіологічний контроль	86
7.2. Показники росту і синтезу цільового продукту	88
7.2.1 Визначення концентрації біомаси	88

7.2.2. Визначення активності стрептокінази	89
7.2.3. Визначення концентрації джерел карбону та азоту	93
7.2.4. Визначення амонійного азоту	94
РОЗДІЛ 8. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ.....	105
8.1. АНАЛІЗ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ НА МІСЦЯ ЕМІСІЇ ТВЕРДИХ, РІДКИХ ТА ГАЗОПОДІБНИХ ВІДХОДІВ.....	106
8.2 ПЕРСПЕКТИВИ ВПРОВАДЖЕННЯ СИСТЕМИ ЕКОЛОГІЗАЦІЇ ВИРОБНИЦТВА.....	109
8.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів	109
8.2.2. Система знешкодження та утилізації твердих відходів	111
8.2.3. Система знешкодження газоповітряних викидів	112
8.2.4. Заходи щодо зменшення об'ємів відходів.....	114
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	117

ВСТУП

Актуальність теми. У структурі гінекологічної захворюваності провідне місце посідають запальні захворювання органів малого таза (ЗЗОМТ), які є основною причиною порушення репродуктивної функції у жінок.

Установлено, що ефективним засобом лікування даної патології є застосування комплексної терапії.

Комплексне лікування передбачає застосування антибіотиків широкого спектру дії, антимікотиків, дезінтоксикаційної симптоматичної терапії у поєднанні з призначенням ректальних супозиторіїв (діюча речовина стрептокіназа та стрептодорназа).

Вибір зумовлений лікувальними властивостями складових препарату – стрептокінази і стрептодорнази.

Стрептокіназа (СК) є активатором проензиму плазміногену, що міститься в крові людини і під впливом стрептокінази перетворюється на плазмін, який має властивість розчиняти згортки крові. Стрептодорназа (СД) є ензимом, який має здатність розчиняти маси нуклеопротейнів, мертвих клітин або гною, не впливаючи при цьому на живі клітини та їхні фізіологічні функції. Препарат полегшує доступ антибіотиків та хіміотерапевтичних засобів до вогнища запалення. Саме тому, **метою даної роботи** є розробка ділянки виробництва для біосинтезу стрептокінази для її подальшого використання як складової препарату ректальних супозиторіїв «Стрептокіназа-Стрептодорназа».

Новизна роботи. Новизна роботи полягає у тому, що було створено новий підхід для продукування ферменту стрептокінази. А саме: був використаний рекомбінантний штам *E. coli* BL21 (DE3), який вирощували на простому поживному середовищі з додаванням антибіотика ампіциліну та індуктора IPTG.

					<i>НУХТ БТЕК 04.02.07 ДР ПЗ</i>			
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дат</i>		<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Разробив</i>		<i>Загороднюк Т.Е.</i>					8	
<i>Керівник</i>		<i>Красінько В.О.</i>						
<i>Затвердив</i>		<i>Стадніков В.П.</i>			<i>ВСТУП</i>			<i>Кафедра БТМ</i>

Процес культивування також змінили з періодичного на періодичний з підживленням, що показує найкращі характеристики виходу даного продукту, а саме концентрація даного ферменту була найбільшою, 1120 мг/мл, а тривалість культивування найменшою 24 год. [1].

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

Механізм дії препарату «Стрептокіназа-Стрептодорназа» ґрунтується на поєднанні активних компонентів: стрептокіназа і стрептодорназа, які володіють вираженим тромболітичними (фібринолітичними) і протеолітичними ефектами, сприяють ліквідації сладж-синдрому, поліпшують мікроциркуляцію та зменшують набряк у вогнищі ураження за рахунок зростання концентрації макрофагів, збільшують доступ антибактеріальних препаратів до джерела запалення [2].

Комбінована дія цих ферментів має виражену протизапальну та протиспайкову дію, сприяє зменшенню дизуричних явищ, прискоренню репаративних процесів, знижує ризик розвитку ускладнень (спайкової хвороби, безпліддя тощо) та рецидиву, скорочує терміни терапії, що призводить до зменшення медикаментозного навантаження [3].

Стрептокіназа (КФ 3.4.99.22) - високоочищений фермент з класу гідролаз, одержаний з культивованого штаму β -гемолітичних стрептококів групи С [4].

Молекула СК синтезується у вигляді одноланцюгового поліпептиду, являє собою позаклітинний білок з молекулярною масою приблизно 47 000 - 50 000 дальтон, який складається з 414 амінокислотних послідовностей, і не містить в своєму складі дисульфідних зв'язків [5]. Білки не містять цистину, цистеїну, фосфору, кон'югованих вуглеводів та ліпідів [6].

					<i>НУХТ БТЕК 04.02.07 ДР ПЗ</i>			
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дат</i>	<i>РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту</i>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Разрабив</i>		<i>Загороднюк Т.Е.</i>					10	
<i>Керівник</i>		<i>Красінько В.О.</i>				<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Затвердив</i>		<i>Стадніков В.П.</i>						

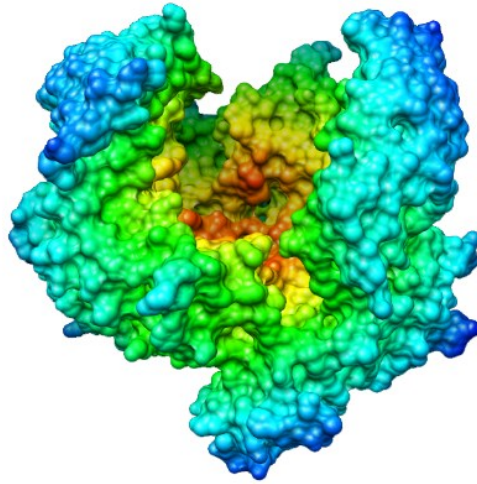


Рис 1.1 Тривимірна структура ферменту СК [7]

Стрептокіназу як базовий Фібрінолітик широко застосовують при лікуванні тромбозів різної локалізації. Вона є активатором проензиму плазміногену, що перетворюється на плазмін і розчиняє згортки крові.

Стрептодорназа є ферментом – ендонуклеазою, яка руйнує ДНК внаслідок її глибокої деполімеризації. Розриває міжмолекулярні зв'язки нуклеопротейдів клітин, що відмерли, і гнійних мас, полегшує резорбцію клітин і олігопротейнів, внаслідок чого вони повністю розчиняються, але це не впливає на здорові клітини й їхні фізіологічні властивості, і тим самим запобігає розвитку спайок.

СК поліпшує доступ інших лікарських препаратів, таких, як антибіотики чи протизапальні засоби, до вогнища запалення, покращує мікроциркуляцію і тим самим зменшує інфільтрацію, набряк і клінічні прояви запалення [2,3,8,9].

СК і СД первинно не проходять печінковий кровотік, а максимально концентруються у вогнищі запалення, внаслідок чого зменшується їхня системна дія та можливість розвитку побічних ефектів [8,10].

РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

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

СК продукується природним шляхом і секретується різними штамми гемолітичних стрептококів разом з декількома іншими небажаними токсичними продуктами, такими як: дезоксирибонуклеази, стрептолізин або гіалуронідаза і протеази, які ускладнюють процес очищення необхідного білка [11].

До цих пір було неможливо отримати генетично вдосконалені штами із зазначених господарів через відсутність розробленої методики перенесення генів[12]. Єдиним варіантом вирішення проблеми є біотехнологічне виробництво рекомбінантної стрептокінази за допомогою штама *Escherichia coli*.

Ця технологія включає:

1. Отримання фрагмента ДНК, що несе генетичну інформацію для продукування стрептокінази, методами рекомбінантних ДНК або синтезу відомими методами. Вбудовування фрагмента ДНК з отриманням плазмідного вектора, здатного продукувати стрептокіназу;
2. Введення плазмідної ДНК у відповідну клітку-господаря;
3. Адаптація клітини-господаря до поживного середовища певного складу, що складається з основних солей, мікроелементів і джерела вуглецю, азоту;
4. Налаштування аерації розчином киснем у кількості 0-100%, перемішування і підтримання рН в межах 5-8;
5. Додавання антибіотика, такого як ампіцилін;
6. Культивування в ферментері протягом певного періоду від 6 до 24

ГОДИН;					НУХТ БТЕК 04.02.07 ДР ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат			
Розробив		Загороднюк Т.Є.			Літ.	Арк.	Аркушів
						12	
Керівник		Красінко В.О.			Кафедра БТМ		
Затвердив		Стадніков В.П.					

7. Обов'язкове введення додаткових поживних речовин в ферментаційне середовище через проміжки часу від 15 до 90 хвилин зі швидкістю від 100 мл / год до 1000 мл / год для збільшення виходу біомаси.

РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ
ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА
БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

8. Збір культури клітин звичайним центрифугуванням і/або мікрофільтрації;

9. Руйнування клітин *E.coli* за допомогою хімічного лізису, обробки ультразвуком;

10. Виділення та очищення білка від домішок. Розлив та ліофілізація готового препарату [12,13].

Виходячи з даних, що зазначені в таблицях 2.1, 2.2, 2.3, хочеться звернути увагу на найбільшу активність СК, що була одержана шляхом біосинтезу штаму *E. coli* BL21 (DE3). Через низьку активність ферменту у біологічних агентів *S.pyogenes*, *S. equisimilis* H46A, а також у *S. agalactiae* EBL-32, пропонується вибрати як продуцента СК *E. coli* BL21 (DE3), незважаючи на необхідне дробне внесення глюкози в середовище, що може призвести до підвищеного ризику контамінації та накопичення продуктів метаболізму, проте за рахунок періодичного культивування з підживленням ми можемо досягти зниження ефекту інгібування продуктами метаболізму, а також за рахунок якісної стерилізації, виключимо ризик контамінації.

Крім цього, *E.coli* є найбільш часто використовуваним господарем для виробництва рекомбінантних білків як у наукових дослідженнях, так і в промисловості.

Таблиця 2.1

Особливості одержання ферменту стрептокінази на суміші ростових субстратів

Біологічний агент	Склад поживного середовища г/л :	Тривалість культивування, год	Особливості культивування	Активність од/мл	Концентрація мг/л	Література
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Дефібринована кінська кров доповнена 1% дріжджового екстракту	24	pH 7,0, 37°C, у колбах	9-132 од/мл	-	McArthur, J. D., McKay, F. C., Ramachandran, V., Shyam, P., Cork, A. J., Sanderson-Smith, M. L., ... & Walker, M. J. (2008). Allelic variants of streptokinase from <i>Streptococcus pyogenes</i> display functional differences in plasminogen activation. <i>The FASEB journal</i> , 22(9), 3146-3153. [14]
<i>Streptococcus equisimilis</i> H46A	KH ₂ PO ₄ 0.4, K ₂ HPO ₄ 0.5, MgSO ₄ 0.4, NaHCO ₃ 1.5, CaCO ₃ 0.04, CH ₃ COONa 1, FeSO ₄ 0.4, MnCl ₂ 0.2, Кукурудзяний екстракт 40, Глюкоза 20, Дріжджовий екстракт 30.	24	Перемішування 120 об/хв., pH 7,0 37°C, у колбах	480 од/мл	-	Zia M. A. et al. Improved streptokinase production; uv irradiation of streptococcus equisimilis //Professional Medical Journal. – 2015. – Т. 22. – №. 5. [15]

Закінчення табл. 2.1

<i>Streptococcus agalactiae</i> EBL-32	Глюкоза -0.5, Дріжджовий екстракт-0.5, K ₂ HPO ₄ -0.25, KH ₂ PO ₄ -0.25, NaHCO ₃ -0.1, MgSO ₄ *7H ₂ O-0.04, CH ₃ COONa *3H ₂ O-0.1, MnCl ₂ * 4H ₂ O-0.002, FeSO ₄ * 7H ₂ O-0.002	36	pH 7,5 37°C, у колбах	168.46 од/мл	-	Arshad A. et al. Enhanced Production Of Streptokinase By Chemical Mutagenesis Of <i>Streptococcus agalactiae</i> EBL-20 //Brazilian Archives of Biology and Technology. – 2019. – Т. 62. [16]
<i>E.coli</i> BL21 (DE3) (<i>Streptococcus equisimilis</i> H46A <i>E. coli</i> - як джерело експресованого гена стрептокінази)	KH ₂ PO ₄ – 1, 2г/л (NH ₄) ₂ HPO ₄ – 4 г/л Глюкоза – 10 г/л; MgSO ₄ *7H ₂ O – 1,2 г/л FeCl ₃ *6H ₂ O – 2,7г CaCl ₃ *2H ₂ O – 2,94 MnCl ₂ *4H ₂ O – 1,98 ZnSO ₄ *7H ₂ O – 2,88 CoCl ₂ *6H ₂ O – 47,6 CuCl ₂ *2H ₂ O – 0,34 NiCl ₂ *6H ₂ O – 0,475 Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O – 0,484 H ₃ BO ₄ – 1,53 г Для стадії напівбезперервного культивування у ферментері на 5м ³ , концентрація певних розчинів буде наступною: Глюкоза – 400 г/л MgSO ₄ *7H ₂ O – 25 г/л Ампіцилін – 0,1 г/л	24	pH 6,8, Перемішування 300-900 об/хв., 37°C, у ферментері на 5л.	-	1120 ± 50 мг/л*	Goyal D., Sahni G., Sahoo D. K. Enhanced production of recombinant streptokinase in <i>Escherichia coli</i> using fed-batch culture //Bioresource technology. – 2009. – Т. 100. – №. 19. – С. 4468-4474. (Додаток А) [1].

* Перерахунок у мг/л зроблено згідно даних статті [Goyal D., Sahni G., Sahoo D. K. Enhanced production of recombinant streptokinase in *Escherichia coli* using fed-batch culture / Bioresource technology. – 2009. – Т. 100. – №. 19. – С. 4468-4474.]

Всі продуктивності в од/мл варто перевести в мг/л (таким чином: 9-132 од/мл = 9000–132000 од/л /10⁵ = 0,09–1,32 мг/л).

Вартість поживних середовищ для культивування продуцентів стрептокінази

Продуцент	Компонент поживного середовища	Концентрація у ПС, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації (1, 2, 3)*
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Дифібринована кінська кров	5	9800 грн/л	49	1
	екстракт дріжджів	1	1100	1,1	3
Вартість 1 л середовища – 84,67 грн					
<i>Streptococcus Equisimilis H46A</i>	KH ₂ PO ₄	0,25	120	0,0048	3
	K ₂ HPO ₄	0,25	119	0,006	
	MgSO ₄	0,04	12	0,0018	
	NaHCO ₃	0,15	14.40	0,0022	
	CaCO ₃	0,04	105	0.0042	
	CH ₃ COONa	0,1	55	0,0055	
	FeSO ₄	0,4	38	0,0015	
	MnCl ₂	0,02	70	0,0014	
	Кукурудз. екстракт	0,4	120	0,048	
	Глюкоза	0,2	50	0,01	
Дріжджовий екстракт	0,3	1100	0,33		
Вартість 1 л середовища – 0,42 грн					
<i>Streptococcus agalactiae EBL-32</i>	Глюкоза	0,5	50	0,025	3
	Дріжджовий екстракт	0,5	1100	0,55	
	K ₂ HPO ₄	0,25	119	0,029	
	KH ₂ PO ₄	0,25	120	0,03	
	NaHCO ₃	0,1	14,40	0,0014	
	MgSO ₄ *7H ₂ O	0,04	12	0,0005	
	CH ₃ COONa *3H ₂ O	0,1	55	0,0055	
	MnCl ₂ * 4H ₂ O	0,002	70	0,00014	
	FeSO ₄ * 7H ₂ O	0,002	38	0,00076	
Вартість 1 л середовища – 0,65 грн					

Закінчення табл. 2.2

<i>Streptococcus agalactiae</i> EBL-32	Глюкоза	0,5	50	0,025	3		
	Дріжджовий екстракт	0,5	1100	0,55			
	K ₂ HPO ₄	0,25	119	0,029			
	KH ₂ PO ₄	0,25	120	0,03			
	NaHCO ₃	0,1	14,40	0,0014			
	MgSO ₄ *7H ₂ O	0,04	12	0,0005			
	CH ₃ COONa *3H ₂ O	0,1	55	0,0055			
	MnCl ₂ * 4H ₂ O	0,002	70	0,00014			
FeSO ₄ * 7H ₂ O	0,002	38	0,00076				
Вартість 1 л середовища – 0,65 грн							
<i>E.coli</i> BL21 (DE3)	KH ₂ PO ₄	1,2	120	0,144	3		
	(NH ₄) ₂ HPO ₄	4	48	0,192			
	Глюкоза	10	50	0,5			
	MgSO ₄ *7H ₂ O	1.2	12	0,0144			
	ЕДТА-0,009	0,009	60	0,00054			
	CoCl ₂ *6H ₂ O -0,0025	0,0025	23	0,0000575			
	MnCl ₂ *4H ₂ O-0,015	0,015	16,80	0,00025			
	CuSO ₄ *5H ₂ O – 0,0022	0,0022	75	0,000165			
	H ₃ BO ₄ – 0,003	0,003	27	0,000081			
	Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O – 0,0025	0,0025	330	0,000825			
	ZnSO ₄ *7H ₂ O	0,475	34	0,01615			
	FeCl ₃ *6H ₂ O	0,484	38	0,0184			
	Ампіцилін	0,1	1,67	0,00016			
	Для стадії напівбезперервного культивування у ферментері на 5м ³ , концентрація певних розчинів буде наступною:						
	Глюкоза	400	50	20			
MgSO ₄ *7H ₂ O	25	12	0,3				
Вартість 1 л середовища – 21,19 грн							

Примітка. * до табл. 2.2. – Ціни наведено станом на лютий 2021 р. 1- https://rockland-inc.com/store/Sterile-Animal-Blood-for-Red-Blood-Cells-RBCs-R107-0050-O4L_19821.aspx/, 2 - <https://www.laboratorii.com/reaktivy/sukhie-pitatelnye-sredy-dlya-mikrobiologii/45331/>, 3- <http://prom.ua>, 4- http://www.rosmedbio.ru/catalog/items/Microbiological_Reagents_and_Consumables/LB-Medium_-_Powder_according_to_Miller_for_biochemistry/

Таблиця 2.3

Умовна вартість 1 мл синтезованого цільового продукту

Біологічний агент	Активність ферменту од/мл	Концентрація ферменту мг/л	Тривалість культивування , год	Утворених активност і ферменту за годину, од/год	Концентрація утвореного ферменту за годину, мг/год	Вартість 1 л середовища , грн/л	Умовна вартість 1 мл цільового продукту, грн/мл
<i>S.pyogenes</i>	9-132	-	24	0,37-5,5	-	84,67	641-9407
<i>S.equisimilis</i> H46A	480	-	24	20	-	0,42	0,88
<i>S. agalactiae</i> EBL-32	168	-	36	4,6	-	0,65	3,9
<i>E.coli</i> BL21 (DE3)	-	1120 ± 50 мг/л	24	-	46,6	40,88	36,5

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

2.2.1. Морфолого-цитологічні ознаки *E.coli*

Форма – кишкова паличка є прямою паличкоподібною бактерією.

Розмір – Розмір кишкової палички становить приблизно 1–3 мкм × 0,4–0,7 мкм.

Розташування клітин – кишкова паличка розташована поодинокі або парами.

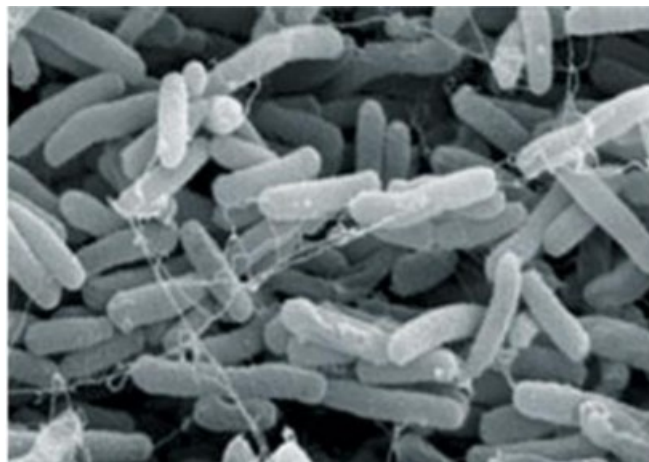


Рис.2.1 Кишкова паличка, скануюча електронна мікроскопія [17]

Рухливість – *Escherichia coli* є рухомою бактерією. Деякі штами *E.coli* є непорушними.

Джгутики – кишкова паличка – це джгутикова бактерія з перитрихальним розташуванням джгутиків.

Спори – кишкова паличка є неспороутворюючою бактерією.

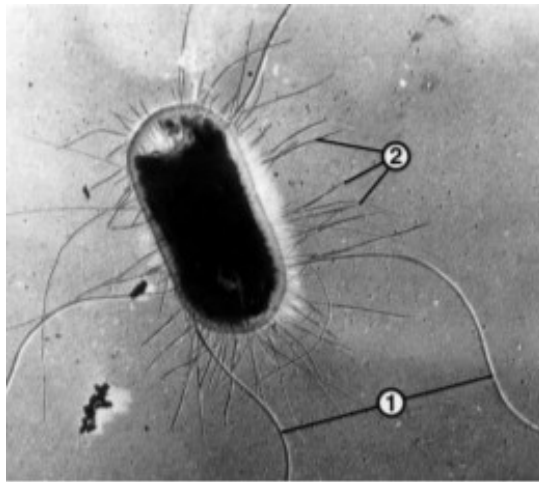


Рис. 2.2 Електронна мікрофотографія клітини кишкової палички:

1 – джгутики, 2 – пілі [17]

Капсула – капсули присутні тільки в деяких штаммах кишкової палички, що можна легко продемонструвати за допомогою індійського чорнильного препарату, мають вигляд чіткого ореола на темному тлі.

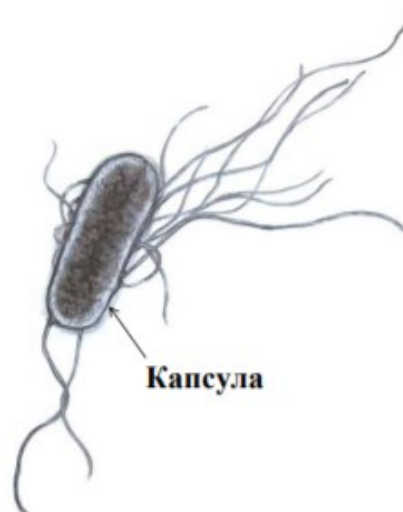


Рис. 2.3 Мікрокапсула кишкової палички [17]

Реакція фарбування за Грамом – кишкова паличка є грамнегативною бактерією [16].

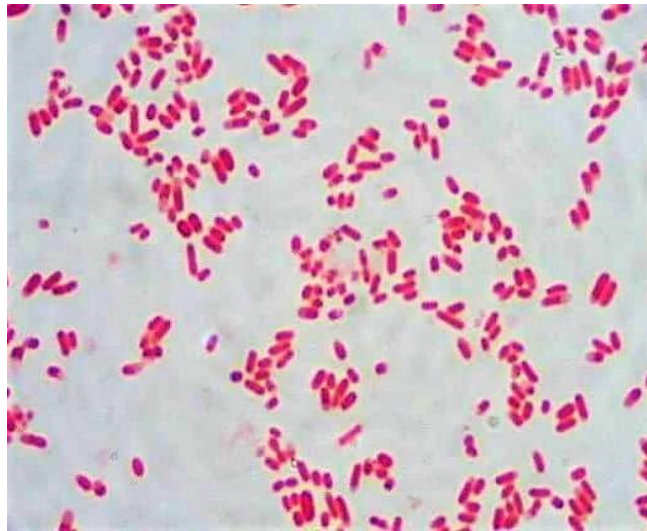


Рис. 2.4 *Escherichia coli*, фарбування за Грамом [18]

2.2.2. Культуральні ознаки *E. coli*

E. coli відносяться до факультативних анаеробів. Вони не потребують складних ПС для забезпечення росту, їм достатньо базових для біотехнології МПА та МПБ.

На агаризованих середовищах бактерії утворюють непрозорі опуклі тонкі S-колонії з дещо хвилястими, а подекуди й рівними краями, довжиною приблизно 3-5 мм.

У рідких середовищах викликають утворення осаду та помутніння середовища, зрідка формуючи поверхневу плівку [18-19].

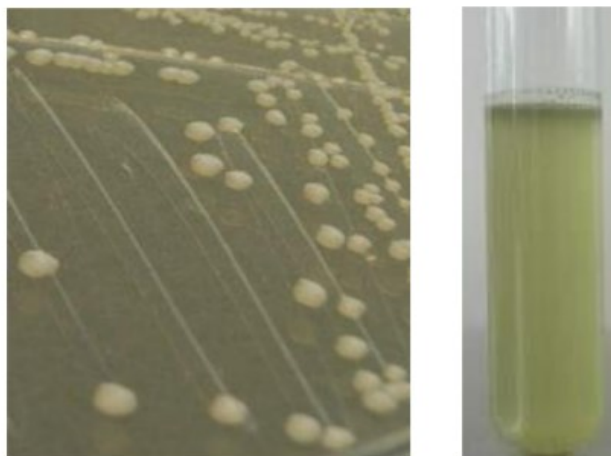


Рис.2.5 Характер росту *Escherichia coli* на середовищах МПА та МПБ [17]

На диференційно-діагностичних середовищах (Ендо, ЕМС) ці бактерії накопичують молочну кислоту, розщеплюючи лактозу, що призводить до зниження показників рН, тому при додаванні індикаторів, колонії мають яскраве забарвлення: на середовищі Ендо малинове з металевим блиском або без нього; на середовищі ЕМС – темно-фіолетове [20].

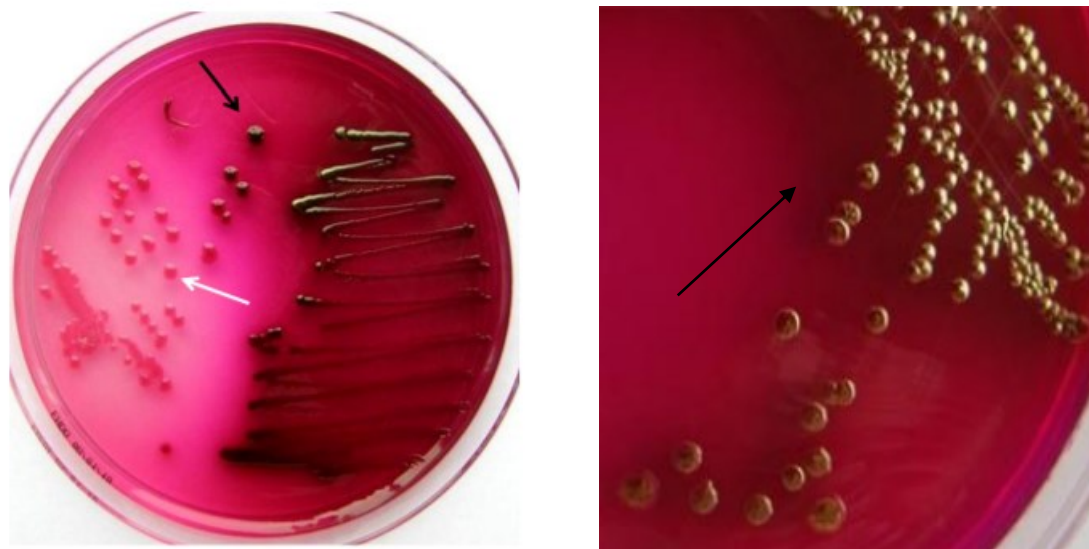


Рисунок 2.6 Характер росту лактозопозитивних (чорна стрілка) та лактозонегативних (біла стрілка) ешерихій на середовищі Ендо [17]

2.2.3. Біохімічні властивості *Escherichia coli*

Більшість бактерій групи кишкових паличок не розріджують желатин, згортають молоко, розщеплюють пептони з утворенням аміаку, амінів, сірководню, мають високу ферментативну активність щодо лактози, глюкози та інших цукрів, а також спиртів. *E.coli* не мають оксидазної активності. За здатністю розщеплювати лактозу при температурі 37°C бактерії групи кишкових паличок (БГКП) ділять на лактозонегативні та лактозопозитивні кишкові палички (ЛКП), або коліформні, які формуються за міжнародними стандартами. З групи ЛКП виділяються фекальні кишкові палички (ФКП), що здатні ферментувати лактозу за температури 44,5°C [21].

2.2.4. Стійкість *Escherichia coli*

У навколишньому середовищі Ешеріхії досить стійкі. У воді, ґрунті зберігають життєздатність місяцями. У молоці зберігають життєздатність понад 30 діб, у дитячих поживних сумішах – більше 3 місяців, на іграшках та предметах побуту – до 3-5 місяців. Пряме сонячне світло викликає загибель ешерихій через кілька хвилин.

БГКП знешкоджуються звичайними методами пастеризації (65 - 75 ° С). При 60 ° С кишкова паличка гине через 15 хвилин. 1% розчин фенолу викликає загибель мікроба через 5-15 хвилин, хлорид ртуті в розведенні 1:1000 – через 2 хв., БГКП стійкі до дії багатьох анілінових барвників. Також вони здатні швидко набувати стійкості до антимікробних препаратів за рахунок R-плазмід. [19,21]

2.3. Таксономічний статус біологічного агента

Царство: *Bacteria*

Тип: *Proteobacteria*

Клас: *Gamma**proteobacteria*

Порядок: *Enterobacteriales*

Сімейство: *Enterobacteriaceae*

Рід: *Escherichia*

Вид: *Escherichia coli*

Належать до п'ятої групи за визначником Берджі. [22]

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

3.1. Потреба населення України в стрептокіназі

Запальні захворювання жіночих статевих органів – дуже поширена група гінекологічних патологій. Вони зачіпають всі відділи репродуктивної системи жінки [23]. У структурі гінекологічної захворюваності число пацієнтів з інфекційно-запальними захворюваннями геніталій займає перше місце, складаючи 60,4-65% . За статистикою, запальні захворювання органів малого тазу (запалення яєчників, матки, передміхурової залози та ін.) – найбільш часта проблема пацієнтів репродуктивного (з 16 до 49 років) віку. Такі захворювання дуже підступні і небезпечні через ризик розвитку таких серйозних ускладнень, як безпліддя, позаматкова вагітність, порушення менструальної функції, спайкова хвороба, хронічний тазовий біль. Показник захворюваності ЗЗОМТ за перше десятиліття ХХІ ст. зріс у пацієток 18-24 років в 1,4 рази, а у 25-29-річних - в 1,8. [24-27]

Станом на січень 2021 року в Україні зареєстровано 22 223 341 жінок (без урахування тимчасово окупованої території Автономної Республіки Крим і м. Севастополя). Можемо припустити, що потенційними покупцями нашого препарату є жінки у віці від 15 до 80 років. Таким чином, кількість жінок становить 17 339 737. [28] Кількість хворих на інфекційно-запальні захворюваннями малого тазу становить 60-65%, тобто 10 750 637 жінок. Наш препарат – «Стрептокіназа – Стрептодорназа» відпускається тільки за рецептом, тож можемо припустити, що тільки половина від хворих на ЗЗОМТ звертається до лікаря-гінеколога, щоб отримати рецепт, і це становить 5 375 318 жінок. Враховуючи, що на ринку України присутні тільки імпортовані препарати, і той факт, що в Україні немає жодного підприємства, що випускає подібний препарат, пропонуємо виробляти препарат СК-СД для задоволення потреб 50 % населення (2 687 659 тис. осіб).

					<i>НУХТ БТЕК 04.02.07 ДР ПЗ</i>			
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дат</i>				
<i>Розробив</i>		<i>Загороднюк Т.Е.</i>			<i>РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ</i>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Архувів</i>
<i>Керівник</i>		<i>Красінько В.О.</i>						
<i>Затвердив</i>		<i>Гладников В.П.</i>				<i>Кафедра БТМ</i>		

Цей препарат успішно застосовується для лікування гінекологічної, урологічної патології, а також у проктології. Ректальна форма застосування забезпечує особливу швидкість і безпеку застосування цього препарату. Тривалість прийому препарату становить від 2 до 9 діб, в залежності від ступеня інтенсивності запального процесу. Для лікування ЗЗОМТ використовують стрептокіназу у комбінації зі стрептодорназою у формі супозиторіїв [2].

Добова доза стрептокінази –1,5 мг, курс лікування – 2-9 днів. Кількість препарату на 1 людину становить – 8,25 мг. Отже, для забезпечення даної групи населення препаратом стрептокінази необхідно:

$$8,25 \text{ мг} * 2\ 687\ 659 = 22,2 \text{ кг}$$

Таблиця 3.1

Річна потреба населення в стрептокіназі

Захворювання (профілактика)	Доза препарату на добу, МО	Тривалість прийому, днів	Кількість препарат у на 1 людину, мг	Кількість хворих в Україні за 2021 рік	Загальна маса стрептокінази (кг) на всіх хворих
Лікування ЗЗОМТ	15000 (1,5 мг)*	2-9	8,25	2 687 659	22,2
З яких хворих на:					
Кандидозний вульвовагініт[30,31]	Від 13,5 до 33%				
Бактеріальний вагіноз [32]	Від 15 до 80 %				
Гонорея[32]	Від 1-2 до 25%				
Генітальний герпес[32]	Від 5 до 12%				
Урогенітальний хламідіоз [32]	Від 10 до 15%				
Сечостатевий трихомоніаз[24,32]	Від 2-10% (в розвинених країнах), та від 15-40% (в країнах, що розвиваються)				

Примітка: * - для розрахунку взято до уваги, що для лікування пропонується препарат Стрептокіназа-Стрептодорназа, що випускається у формі супозиторіїв, 1 супозиторій містить стрептокінази 15000 МО, що у перерахунку на масу становить 1,5 мг [1] і стрептодорназу 1250 МО;

* Перерахунок у мг/л зроблено згідно даних статті (Goyal D., Sahni G., Sahoo D. K. Enhanced production of recombinant streptokinase in Escherichia coli

using fed-batch culture //Bioresource technology. – 2009. – Т. 100. – №. 19. – С. 4468-4474.)

3.2. Розрахунок потужності виробництва стрептокінази

Наразі в Україні продається тільки імпортований препарат СК-СД виробник Фарміна, ЛТД (Польща)[29] та препарат Дистрептаза виробник Біомед-Люблін (Польща) [33]

Таблиця 3.2

Лікарські препарати стрептокінази (комбінації з стрептокіназою), зареєстровані в Україні

Препарат	Лікарська форма	Країна-виробник
СК-СД	Супозиторії ректальні	Польща
Дистрептаза	Супозиторії ректальні	Польща

Маючи на увазі те, що на ринку України присутні імпортовані препарати, і той факт, що в Україні немає жодного підприємства, що випускає подібний препарат, пропонуємо виробляти препарат стрептокінази для задоволення 50% від вирахованих раніше потреб (2 687 659 тис. осіб).

Отже, річна потужність проєктованого виробництва СК становитиме 22,2 кг ферменту стрептокінази. Для одержання СК у промислових масштабах принципово важливим є вибір оптимального штаму-продуцента, який повинен бути як економічно вигідним, так і достатньо продуктивним щоб забезпечувати високий вихід цільового продукту. Зважаючи на такі критерії, для отримання СК найдоцільніше використовувати штам-продуцент *E.coli* BL21 (DE3), синтезувальна здатність якого складає 1120 ± 50 мг/л за 24 год культивування.

Маючи такі вихідні дані, ми можемо розрахувати кількість культуральної рідни (КР), необхідної для одержання 22,2 кг стрептокінази:

$$0,00112 \text{ кг} - 1 \text{ л}$$

$$22,2 \text{ кг} - X \text{ л}$$

$$X = 22,2 / 0,00112 = 19,8 \text{ м}^3 \text{ КР.}$$

Необхідно також врахувати, що частка втрат під час виділення і очищення СК складає 50% і тому об'єм КР повинен становити:

$$V_{кр} = 19,8 / (1 - 0,5) = 39,6 \text{ м}^3 \text{ КР.}$$

Отже, для забезпечення обраного сегменту ринку вітчизняними супозиторіями, що містять стрептокіназу, потужність виробництва для отримання даного ферменту повинна складати 22,2 кг/рік, а кількість КР для одержання ферменту з урахуванням втрат під час виділення і очищення становить 39,6 м³.

3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів для біосинтезу стрептокінази

Для лікування ЗЗОМТ населення України ферментними препаратами, що містять СК необхідно одержати (з урахуванням втрат під час виділення і очищення) 39,6 м³ КР.

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

Кількість робочих днів ($T_{\text{рд}}$) становитиме 60 днів, а інші дні будуть відведені на виробництво другого компоненту супозиторія - стрептодорназу.

Таким чином, кількість цільового продукту на добу складатиме:

$$V_{\text{д}} = V_{\text{гп}} / T_{\text{рд}} = 39,6 \text{ м}^3 / 60 \text{ днів} = 0,66 \text{ м}^3 / \text{добу.}$$

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

$$V_{\text{цк}} = (K_1 \cdot V_{\text{д}} \cdot T_{\text{цф}}) / 24 = (1,2 \cdot 0,792 \cdot 32,5) / 24 = 1,07 \text{ м}^3 / \text{цикл.}$$

Цикл роботи ферментера ($T_{\text{цф}}$) включає тривалість ферментації і тривалість підготовчих робіт. Тривалість біосинтезу – 24 год і необхідний час підготовки ферментера до здійснення ферментаційних процесів - 8,5 год.

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

врахування можливості нестерильних операцій (K_1) за 1,2. Так, цикл роботи ферментера становить – 32,5 год.

Розрахуємо геометричний об'єм ферментера (V_r) для одержання необхідної кількості культуральної рідини:

$$V_r = V_{\text{цк}} / K_{\text{зп}} = 1,07 / 0,65 = 1,65 \text{ м}^3.$$

Де $K_{\text{зп}} = 0,6$ – коефіцієнт заповнення ферментера.

Так, оптимальним ферментом для одержання $1,07 \text{ м}^3$ КР за цикл є ферментер з геометричним об'ємом $V_{\text{ф}} = 1,65 \text{ м}^3$.

Перевіримо, чи підійде обраний коефіцієнт заповнення:

$K_{\text{зп}} = V_{\text{цк}} / V_{\text{ф}} = 1,07 / 1,65 = 0,65$, що не перевищує задане значення.

3.4 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для біосинтезу стрептокінази *E.coli* BL21 (DE3)

За один виробничий цикл отримують $1,07 \text{ м}^3$ культуральної рідини.

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

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

$$V_{\text{роб.1}} = V_{\text{кр}} / (1 - E_{\text{ф}}) = 1,07 / 0,9 = 1,2 \text{ м}^3,$$

де $E_{\text{ф}}$ – втрати КР під час біосинтезу, приймаємо 10%.

Отже, робочий об'єм ферментера перед біосинтезом дорівнює $1,2 \text{ м}^3$. За вибраного коефіцієнта заповнення 0,6 геометричний об'єм ферментера становить: $V_{\text{ф}} = 1,2 / 0,6 = 2 \text{ м}^3$. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{сф}} = 2 \text{ м}^3$.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення: $K_{\text{з1}} = 1,2 / 2 = 0,6$. Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах, отже геометричний об'єм ферментера обрано правильно.

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить 10 % від об'єму поживного середовища. Тоді об'єм поживного середовища в ферментері буде становити:

$$V_{\text{пс1}} = V_{\text{роб.1}} / (1 + X_{\text{ф}}) = 1,2 / (1 + 0,1) = 1,09 \text{ м}^3,$$

де $X_{\text{ф}} = 0,1$ – доза посівного матеріалу для ферментера.

Звідси кількість посівного матеріалу:

$$V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб.1}} - V_{\text{пс1}} = 1,2 - 1,09 = 0,11 \text{ м}^3.$$

Врахуємо, що під час одержання $0,11 \text{ м}^3$ інокуляту в посівному апараті 10 % культуральної рідини буде втрачено внаслідок краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря. Тоді об'єм поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становитиме:

$$V_{\text{роб.2}} = V_{\text{пм1}} / (1 - E_{\text{па}}) = 0,11 / 0,9 = 0,12 \text{ м}^3.$$

Об'єм інокуляту $0,12 \text{ м}^3$ за коефіцієнта заповнення $0,6$ можна отримати в посівному апараті об'ємом: $V_{\text{па2}} = 0,12 / 0,65 = 0,19 \text{ м}^3$. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний інокулятор $V_{\text{с.ін1}} = 0,2 \text{ м}^3$.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення: $K_{\text{з1}} = 0,12 / 0,2 = 0,6$. Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах, отже геометричний об'єм ферментера обрано правильно.

Кількість посівного матеріалу для посівного апарата становить 10 % від об'єму поживного середовища. Тоді об'єм поживного середовища в посівному апараті буде становити:

$$V_{\text{пс2}} = V_{\text{роб.2}} / (1 + X_{\text{па}}) = 0,12 / (1 + 0,1) = 0,11 \text{ м}^3,$$

де $X_{\text{ф}} = 0,1$ – доза посівного матеріалу для посівного апарата.

Звідси кількість посівного матеріалу:

$$V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пс2}} = 0,12 - 0,11 = 0,01 \text{ м}^3 = 10 \text{ л}.$$

Врахуємо, що під час одержання 10 л посівного матеріалу в інокуляторі 10 % КР буде втрачено внаслідок краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря. Тоді об'єм поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становитиме:

$$V_{\text{роб.3}} = V_{\text{пм2}}/0,9 = 10/0,9 = 11,11 \text{ л.}$$

Об'єм інокуляту 11,11 л за коефіцієнта заповнення 0,65 можна отримати в інокуляторі об'ємом: $V_{\text{ін1}} = 11,11/0,65 = 17,1 \text{ л}$. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний інокулятор $V_{\text{с.ін2}} = 20 \text{ л}$.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення: $K_{3,3} = 11,11/20 = 0,55$. Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах, отже геометричний об'єм ферментера обрано правильно.

Кількість посівного матеріалу становить 10 % від об'єму поживного середовища. Тоді об'єм поживного середовища в посівному апараті буде становити:

$$V_{\text{пс3}} = V_{\text{роб.3}}/(1+X_{\text{ін}}) = 11,11/(1+0,1) = 10,1 \text{ л,}$$

де $X_{\text{ін}} = 0,1$ – доза посівного матеріалу для інокулятора.

Звідси кількість посівного матеріалу:

$$V_{\text{пм3}} = V_{\text{роб.3}} - V_{\text{пс3}} = 11,11 - 10,1 = 1,01 \text{ л.}$$

Для одержання посівного матеріалу $V_{\text{пм4}} = 1,01 \text{ л}$ для засіву малого інокулятора можна культивувати вибрану культуру *E.coli* BL21 (DE3) у колбах на качалці. Для цього використовують качалочні колби об'ємом $V_{\text{колб}} = 750 \text{ мл}$ з коефіцієнтом заповнення $K_{3к} = 0,2$.

Тоді кількість колб становить:

$$N_{\text{колб}} = V_{\text{пм4}}/(V_{\text{колб}} * K_{3к}) = 1010/(750 * 0,2) = 7 \text{ колб}$$

Отже, за результатами розрахунків для біосинтезу стрептокінази *E.coli* BL21 (DE3) необхідно встановити ферментер для біосинтезу об'ємом $2,0 \text{ м}^3$, інокулятори об'ємом 200 л та 20 л, та 7 качалочних колб.

РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ СТАДІЙ ВИРОБНИЦТВА

4.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу

4.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

На процес біосинтезу ферментів впливають умови зовнішнього середовища, концентрація поживних речовин, їх збалансованість, відвід метаболітів, зміна активної кислотності середовища, температури, насиченість середовища розчиненим киснем, стан і вік культури продуцента. В залежності від способу культивування та фізіологічних особливостей продуцента значимість цих факторів і ступінь їх впливу на процес біосинтезу ферментів різні, проте деякі загальні закономірності можна виділити. Для успішного вирощування мікроорганізмів необхідно забезпечити оптимальні умови культивування, які залежать від їх фізіологічних особливостей. В нашому випадку ми маємо рекомбінантний штам *E.coli* BL21 (DE3) для продукування стрептокінази. Як зазначалося вище, *E. coli* - невибагливий до поживних середовищ, являється факультативним анаеробом, нейтрофільним мезофілом, оптимальною температурою для культивування є 37°C, оптимальний діапазон рН становить від 6,5 до 7,5.

Під час культивування рН змінюється в результаті перетворення субстратів та отримання метаболічних сполук, задля запобігання зміни рН середовища, використовують 6% NaOH та 6% H₂SO₄ [34-36]

Штам *E.coli* BL21 (DE3), вирощують в аеробних умовах, глибинним методом, завдяки чому відзначається більша концентрація продукту 1120 мг/л [1]. Він має ряд очевидних переваг перед поверхневим, оскільки дозволяє значно скоротити виробничі площі, виключити важку непродуктивну ручну працю, поліпшити гігієну праці, спрощує механізацію та автоматизацію виробництва.

					НУХТ БТЕК 04.02.07 ДР ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат			
Розробив		Загороднюк Т.Е.			Літ.	Арк.	Аркушів
						31	
Керівник		Красінко В.О.			РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ СТАДІЙ ВИРОБНИЦТВА Кафедра БТМ		
Затвердив		Стадніков В.П.					

При глибинному способі культивування раціональніше споживаються мікроорганізмами поживні речовини середовищ, що дає можливість значно скоротити відходи виробництва у вигляді нерозчинних осадів твердого поживного середовища, отримувати препарати з меншим вмістом домішок і більшою питомою активністю. Також асептичні умови забезпечуються стерилізацією обладнання і комунікацій, поживного середовища, аераційного повітря. Для запобігання контамінації у ферментері створюється надлишковий тиск. Ферментація проходить в умовах безперервної подачі стерильного повітря через барботер до ферментатора.

Глибинне культивування мікроорганізмів може бути періодичним або безперервним. Оберемо періодичний спосіб культивування з підживленням, за такого способу вдається одержати більший вихід продукту, ніж за умови звичайного періодичного культивування.

Отже, для культивування *E.coli* BL21 (DE3) з метою отримання високих концентрацій стрептокінази було обрано культивування з підживленням глибинним способом при безперервній аерації в асептичних умовах.

При виборі ферментера враховують морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні особливості штаму продуцента, а також економічні аспекти продукції.

Біореактор повинен відповідати таким вимогам:

- мати високу продуктивність та інтенсивність роботи;
- повинен затрачати мінімальну кількість енергії на перемішування;
- бути простим у керуванні та безпечним у роботі;
- мати стабільність режиму;
- бути надійним під час експлуатації;
- мати низьку вартість та за потреби прості та дешеві елементи для ремонту;

У процесі культивування продуцента стрептокінази аеробні умови створюються за рахунок барботера. Який забезпечує оптимальний розподіл

повітря. Ферментер також повинен бути оснащений датчиками температури, рО₂, рН і рівня піни, портами для відбору проб і донним клапаном для відбору готового продукту.

Для прискорення масообмінних процесів та кращої гомогенізації культуральної рідини використовується перемішувач. Виходячи з порівняння типів мішалок по різних критеріях (об'єм рідини, що перемішується, частота обертів, морфологічні ознаки біологічного агента, а також вміст твердої фази під час суспендування) було обрано магнітну мішалку. В ферментері на стінках повинні бути декілька відбійників для підвищення ефективності перемішування.

До ферментера повинні бути підведені лінії пари, води, стисненого повітря, які проходять через індивідуальні повітряні фільтри, задля захисту від небажаної контамінації.

Перистальтичні насоси служать для підтримки певного рівня рН, засіву і подачі підживлення.

Вкрай важливим є забезпечення належного рівня теплообміну в біореакторах, оскільки життєдіяльність і метаболічна активність об'єктів залежить значною мірою від коливань температури. Тому необхідна наявність теплової сорочки, яка дозволить встановлювати і тримати певні температурні режими при культивуванні. Це відбувається за рахунок подачі у сорочку нагрітої води.

Рекомендується використовувати ферментер на 2 м³ від фірми "Sartorius" (Німеччина) моделі Biostat D-DCU MO-2000, який виготовляється на замовлення, габаритні розміри w = 3400, h = 3900, d = 2750; маса – 2045 кг; корпус – нержавіюча електрополірована сталь марки AISI 316L, наявне вікно для проглядання – боросилікатне скло; енерговитрата – 23 А; обладнаний паровою сорочкою і сорочкою для холодної води (матеріал – нержавіюча сталь марки AISI 316L), барботером з мікроотворами, витратоміром "Sparger" або "Overlay" для повітря (30-210 л/хв) точністю до 1%, 3-лопатевою

сегментованою мішалкою зі швидкістю перемішування 20-570 об/хв, 4 зовнішніми входами, автоматичною системою стерилізації SIP (до 130 °C). Також цей апарат оснащений п'єзOMETричним датчиком тиску чутливістю 1,0 мбар; датчиком рН (2-12), чутливістю рН 0,01; платиновим датчиком температури Pt100 (0-150 °C) чутливістю 0,1 °C; полярографічним або оптичним датчиком розчиненого кисню (0-100%). Також містить у своєму складі сенсорну панель керування. [37]

4.1.2 Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря

Однією з важливих задач біотехнологічного виробництва є одержання великої кількості стерильного повітря. У найбільших масштабах стерильне повітря застосовується в процесах ферментації для аерації. В атмосферному повітрі, поряд з інертними газами, N₂, O₂, CO₂, містяться водяна пара і дрібнодисперсні частки. Більш 30% маси цих часток мають розмір 1-2 мкм і близько 50% - менше 0,5 мкм. До складу дисперсних часток, поряд з частками пилу, кіптяви, входять клітини і спори мікроорганізмів як у вільному, так і в сорбованому на пилових частках вигляді.

Температура і вологість зовнішнього повітря, кількість у ньому порошин і мікроорганізмів непостійні, і залежать:

- від часу року (мікроорганізмів влітку в 10 разів більше, ніж узимку), погодних умов – найбільша кількість пилу і, відповідно, мікроорганізмів приходить на суху вітряну погоду;
- від географічного розташування виробництва;
- висоти забору повітря

Особливо багато мікроорганізмів у поверхні землі, з висотою концентрація їх зменшується і стає постійною на рівні близько 20-30 м над землею. Найпростіший спосіб стерилізації повітря полягає у фізичному видаленні мікроорганізмів фільтрацією через волокнисті або мембранні фільтри

(набивні фільтри надтонким волокном, скловолокном, тканиною Петрянова, фільтри з пористого фторопласту) [38].

Способи очистки аераційного повітря

Для виробничого культивування, а також вирощування посівного матеріалу, стиснення та очищення аераційного повітря відбувається за допомогою трьох підсистем:

- очищення від часток пилу та стиснення;
- приведення повітря до термодинамічного стану з певною температурою та вологістю;
- відділення аерозолу у фільтрах грубого та тонкого очищення.

Вітчизняним і закордонним досвідом показано, що технологічно й економічно виправданим у промисловості є спосіб очищення повітря за допомогою *волокнистих і пористих матеріалів*. Таким шляхом вдається одержати повітря зі ступенем чистоти 99,9999%.

I підсистема. Атмосферне повітря збирають турбокомпресором через забірну шахту висотою 20–30 метрів, де концентрація мікроорганізмів стабілізована. Перший етап – повітря попадає в фільтри попереднього очищення, де воно звільняється від грубого аерозолу – пилу. Перевагою використання фільтрів попереднього очищення є те, що вони не тільки захищають компресори від забруднення, але й істотно знижують кількість контамінантів, що могли б потрапити в 2–гу підсистему.

Після цього повітря стискають у турбокомпресорі до 0,35–0,5 Мпа. Тиск стиску повітря в компресорі визначають з розрахунку тиску на подолання опору в системі підготовки повітря, тиску стовпа рідини у ферментаторі і створення в ньому тиску 0,13–0,14 Мпа. Стиснення повітря в компресорі приводить до підвищення його температури до 120–250°C і збільшенню вмісту вологи на одиницю об'єму.

II підсистема. У випадку високого вмісту вологи у вихідному атмосферному повітрі конденсується ще більша кількість вологи при його охолодженні. Випадання вологи на фільтри – неприпустимо, тому що це приводить до злипання волокон і утворенню каналів, в такому випадку гарантія осадження часток на волокні не може бути достеменною. Крім того, на зволжених волокнах фільтрів можливе розмноження осілих мікробів, що приводить до збільшення забрудненості повітря. Щоб забезпечити випадання вологи в каплевловлювачі, повітря «переохолоджують» до температури 25-40°C в теплообмінному апараті. Потім, для забезпечення надійної роботи фільтрів 2-го і 3-го рівнів, повітря нагрівають до температури 70–90°C. При таких температурах виключається конденсація водяної пари на волокнах фільтра. З цією метою повітря після каплевловлювача підігрівають у теплообміннику, при цьому допускається часткове підмішування гарячого повітря після компресора. Кількість повітря, що підмішується, визначається умовами відносної вологості, що не повинна бути більше 40%.

III підсистема складається з двох фільтрів 2-го і 3-го рівнів очищення. Фільтр другого рівня, або головний фільтр звичайно розташований на території заводу поруч з цехом. На головному фільтрі очищають повітря для усіх ферментаторів цеху. З головного фільтра повітря по колектору подається в індивідуальні фільтри третьої рівня, встановлені на кожному ферментаторі, незалежно від його місткості. Конструкція індивідуального фільтра залежить від типу використовуваного фільтруючого матеріалу. При експлуатації фільтрів необхідна їхня стерилізація. Найбільш ефективним методом стерилізації є нагрівання вологою парою і витримка протягом певного часу при температурі 120–130°C. Застосування більш високої температури викликає деструкцію герметизуючих прокладок у фільтрах. Після стерилізації фільтруючий матеріал висушують гарячим повітрям [38,39].

Вибір обладнання для системи фільтрації повітря

Вибір відповідного обладнання для системи фільтрації та їх належне своєчасне обслуговування, ремонт чи заміна зменшує кількість зупинок в процесі експлуатації машин, збільшуючи термін служби рухомих компонентів, покращуючи якість очищеного повітря, підвищуючи рентабельність виробництва. Технологічне повітря використовується у багатьох ділянках виробництва стрептокінази, тому воно повинне бути очищеним для запобігання контамінації кінцевого продукту. Під час культивування аерація необхідна для:

- Безперервного постачання кисню до клітин;
- Видалення вуглекислого газу;
- Швидкої доставки поживних речовин.

Для стерилізації повітря, яке після оброблення буде мати належні характеристики, використовують два методи: знищення мікрофлори за допомогою нагрівання або іонізуючого випромінювання, наприклад, за допомогою ультрафіолетового випромінювання, та вилучення її методом фільтрування. Перший метод є більш надійним та ефективним, але для промислових масштабів є неприйнятним, оскільки у виробничих умовах витрачають занадто великі об'єми повітря, що не говорить про економічну доцільність таких рішень. У промислових умовах використовують в основному метод фільтрування крізь шари насипного, пористого або волокнистого матеріалу [40].

Для очистки повітря може використовуватися уніфікований комірковий масляний фільтр. Такі фільтри заповнюються гофрованими сітками, а також волокнистими та губчастими матеріалами. Комірка фільтрів типу Фк- знімна металева коробка, закріплена в спеціальній рамці за допомогою пружинних защіпок. Знімна коробка складається з корпусу, куди вкладається фільтрувальний шар, і кришки, яка щільно вставляється в корпус і защемляється в ньому. Рамка і кришка можуть обладнуватися опорними решітками, що підтримують фільтрувальний шар від випадання. Ефективність очистки повітря на цій стадії досягає 85%.[41]

Правилами регламентовано очищення масляних фільтрів – один раз на два місяці. Ця робота вимагає зупинки компресорів, розбирання фільтрів, промивання їх гасом від забрудненої вісцинової олії, сушіння змочування фільтру новим вісциновим маслом, складання та монтажу. Тривалість технологічного процесу становить один – два дні. Фільтр чистять зазвичай у машинних залах, що пов'язано з підвищеною пожежонебезпечністю, деякою загазованістю приміщення парами гасу та масел, необхідністю знищення чи утилізації відпрацьованих продуктів [42]. Всі ці недоліки усуваються при заміні масляних фільтрів на фільтри з грубим базальтовим волокном чи з тканиною Камінської, тому на даному етапі обираємо тканину Камінської. Після цього повітря подається на фільтри другого і третього ступенів очистки де очищається на 98 % такий ступінь очистки можуть дати фільтри типу НЕРА, фільтр Петрянова, або фторопластовий фільтр високого тиску. Обираємо фільтр фторопластовий, оскільки він дає досить високий ступінь очистки та може забезпечити стабільну роботу після температурної обробки чи обробки паром та витримує досить високі тиски, що необхідно при подачі аераційного повітря. В якості індивідуального фільтра обираємо індивідуальний картриджний фторопластовий фільтр з діаметром пор 0,22 мкм моделі 5152507Т3-Е-С від компанії Aerosart. [43]

Для підготовки повітря в лабораторії та боксах, де працюють з посівним матеріалом та інокулятом, встановлюють УФ-лампи.

4.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

Загальна характеристика дезінфекційних та миючих засобів

У виробництві, які виготовляють ферментні препарати, що в подальшому використовують як лікарський засіб, важливими є фактори організації виробничих процесів у технологічно стерильному мікрокліматі, де ймовірність появи та поширення інфекцій зведена до мінімуму.

Санітарна обробка на підприємствах включає в себе комплекс заходів по очистці, миттю та дезінфекції приладдя виробництва [44].

Очищення та миття – це фізико-хімічний процес видалення з поверхні різних забруднень, що зазвичай складається з 3-х стадій: видалення бруду з поверхні, розкладання її в мийному розчині та запобігання випадіння бруду, що знаходиться в завислому стані, знову в осад.

Процес видалення бруду відбувається переважно за рахунок механічного впливу на нього за допомогою щіток чи струменю мийного засобу. Під час миття поверхонь устаткування не тільки видаляються залишки продуктів, але й більшість мікроорганізмів. Проте навіть дуже ретельне миття не забезпечує видалення усіх мікроорганізмів, якщо не проведено дезінфекцію. Існує два види прибирання виробничих приміщень: щоденне та генеральне. Щоденне прибирання проводять кожного дня після зміни, вологим способом або впродовж дня на вимогу оператора. Мити поверхні необхідно з кінцевої точки приміщення рухаючись до дверей, поступовими рухами, захоплюючи кожного разу 1/3 раніше протертої площі. Інвентар для прибирання не повинен бути джерелом контамінації, тому використовується окремий для кожного приміщення. Генеральне прибирання проводять при зміні виробничого циклу. Під час генерального прибирання миють стіни, усі виробничі поверхні, стелі, повітроводи та ін.[44-46]

Мийний засіб – поверхнево-активна речовина (ПАР) або суміш поверхнево-активних речовин з «очисними властивостями в розведених розчинах».

Згідно з постановою Кабінету Міністрів України, в Україні мийним засобом є будь-яка речовина або препарат, що містить мило та/або інші поверхнево-активні речовини, призначені для прання або очищення. Мийний засіб може бути у формі рідини, порошку, пасти, бруска, плитки, таблетки тощо. [47]

Мийні й очищуючі засоби можуть бути:

- лужного чи кислого характеру;

- органічні чи неорганічні;
- прості, що складаються з однієї активної речовини (кальцинована сода, каустична сода, сульфанол і т.д.);
- складні, що є композицію різних простих мийних засобів або створюються на основі поверхнево-активних речовин (суміш з фосфорної кислоти, сечовини й лактату кальцію; композиція з кальцинованої соди, тринатрій фосфату і метасилікату натрію). [48]

Ефективний миючий засіб має володіти такими властивостями:

- здатність розчиняти органічні речовини і переводити білки і жири в розчинну форму;
- диспергуючою і суспендууючою здатністю, переводячи нерозчинні забруднення в суспензію і запобігаючи їх повторному відкладенню на вже вимитих поверхнях;
- емульгуючою здатністю, підтримуючи жири і масла в миючому розчині у вигляді емульсії або дисперсії;
- забезпечувати пом'якшення жорсткої води;
- забезпечувати нейтралізацію кислих забруднень та омилення жирів (для лужних мийних засобів);
- здатністю до комплексоутворення, що забезпечує утворення водорозчинних хелатних комплексів (наприклад, з кальцієм і магнієм, що містяться в жорсткій воді), і тим самим їх змивання;
- змочуючою здатністю, зменшуючи поверхневий натяг і забезпечуючи доступ миючого засобу до власне забруднення;
- виявляти низьку агресивність щодо конструкційних матеріалів, які використовують для виготовлення технологічного обладнання, комунікацій, інвентарю та внутрішньоцехової тари;
- змивання - здатністю видалятися повністю, не залишаючи на вимитій поверхні слідів забруднень або залишків миючого засобу. [49]

Миючі засоби не повинні:

- накопичуватися в організмі людини;
- впливати на якість продуктів;
- мати яскраво виражені органолептичні властивості; [50]

Дезінфекція (знезараження поверхні) – заключна стадія санітарної обробки, є активним засобом знищення на поверхні всіляких мікроорганізмів.

Перелік мийних, дезінфікувальних та мийно-дезінфікувальних засобів для обробки посуду, обладнання та тари періодично переглядається МОЗ України. Затверджений перелік є офіційним та керуючим документом при виборі засобу для санітарної обробки. Використовувати нові рецептури мийних та дезінфікувальних засобів можна тільки з дозволу Міністерство охорони здоров'я України після проведення відповідних токсикологічно-гігієнічних досліджень. Дезінфекцію проводять за допомогою механічного, фізичного, хімічного, біологічного та комбінованого методів [51].

Групи хімічних сполук, які використовують для дезінфекції та їх характеристику наведено в табл. 4.1 [52].

Ці речовини мають неоднакові спектри антимікробної дії, різні ступені активності, різну токсичність та корозійну активність і, як наслідок, різне призначення та сфери застосування.

Таблиця 4.1

Сполуки, які використовують для дезінфекції та їх характеристики

Назва групи	Представники	Переваги	Недоліки
Галогени	-хлорамін хлорпохідні гідантоїну -гіпохлорити -похідні ціанурової кислоти -йод	- висока активність до всіх патогенних мікроорганізмів -дешевизна	-викликають корозію металів -небезпечний контакт з слизовими оболонками і шкірою - погана розчинність та нестабільність -висока чутливість до сонячного світла, розкладаються за підвищеної температури

Продовження табл. 4.1

Окисники	-пероксидводню -надоцтова к-та -надмолочна к-та - солі надоцтової та молочної к-т	-швидко розкладаються у довіллі на нетоксичні продукти -мають високі бактерицидні, вірулецидні, туберкулоцидні, фунгіцидні та спороцидні властивості -не токсичні -вимагають короткого часу контакту	- низька стабільність викликають корозію металів -мають подразню-вальнудію на слизові та шкірні покриви людини
ЧАС та похідні гуанідину	-алкілдиметил-бензиламоній хлорид -діоктилди-метиламоній хлорид -дідецилметил-амоній хлорид	-висока розчинність -гарний мийний ефект -антикорозійні та антистатичні властивості -невибагливість до температури -пролонгований знезаражуючий ефект	-інактивуються омилувачами -вужький спектр протимікробної активності
Альдегіди та діальдегіди	-формальдегід -гліоксалевий та глутаровий альдегіди	- сильна бактерицидна, туберкулоцидна, вірулецидна, фунгіцидна та спороцидна дії -антикорозійні властивості	-подразнювальний вплив на слизові оболонки, навіть за дуже низьких концентрацій, -канцерогенні, мутагенні і тератогенні властивості -інактивується холодом та за тривалого зберігання - високотоксичні
Фенольнісполуки	-фенол -лізол -неочищена карболова кислота - крезол	-	- неприємний запах - подразнювальна та сенсibiliзуюча дія окремих фенольних сполук - негативний вплив на довілля - слабка активність

Кислоти, луги та їх солі	-фосфорнакислота -каустична та кальцинована сода	- гарні мийні властивості	- високий вміст діючих речовин і підвищена температура розчинів - руйнування металів - небезпечність для здоров'я
Спирти та спиртовмісні дезінфектанти	- етанол - ізопропіловий спирт - пропанол-1 - пропанол-2 - 2-етилен-гексанол - н-пропанол - композитивні засоби	- бактеріостатичні властивості - туберкулоцидні властивості - фунгіцидні властивості - швидке зниження концентрації при зберіганні	- резистентність спор бактерій та грибів - не мають миючих властивостей - фіксують органічні забруднення - можуть пошкоджувати вироби з пластмас та гуми

Механічний - механічні засоби забезпечують видалення, але не знищення мікроорганізмів. Це чищення, протирання, миття, прання, витрушування, підмітання, провітрювання. При використанні пилотягів видаляється до 98% мікроорганізмів. Вентиляція достатньо ефективна, коли її тривалість не менша, ніж 30-60 хв.

Фізичний ґрунтується на застосуванні високих та низьких температур, а саме:

- гаряче повітря,
- водяна пара,
- кип'ятіння,
- пастеризація,
- спалювання,
- пропалювання,
- заморожування,
- висушування.

Хімічний – знайшов широке застосування на практиці. В його основі лежить використання різних хімічних речовин, які вбивають мікроорганізми. Хімічні речовини мають різну дію на мікроорганізми:

- бактерицидну – здатність вбивати бактерії;
- бактериостатичну – пригнічують їх життєдіяльність;
- віруліцидну – здатність вбивати віруси;
- фунгіцидну – здатність вбивати грибки.

Серед хімічних дезінфікуючих засобів виділяють засоби м'якої дезінфекції, які використовують для дезінфекції шкіри рук, одягу, білизни, і сильної - для знезараження дуже забруднених матеріалів (взуття, туалетів тощо).

Біологічний метод дезінфекції полягає у знищенні збудників інфекційних захворювань мікробами-антагоністами. Цей метод використовується при знезараженні стічних вод на полях зрошування і фільтрації, при компостуванні сміття і відходів, при дезінвазії побутового сміття у біотермічних камерах.

Комбінований метод ґрунтується на поєднанні декількох вищевказаних методів дезінфекції [53,54].

Існує кілька підходів до маркування хімічних препаратів.

1. Маркування упаковки миючих засобів в залежності від складу:

- кислотні - червоний;
- лужні - синій;
- хлорвмісні - зелений;
- нейтральні - білий.

2. Широке поширення отримало таке маркування кольором:

- для санітарних приміщень - червоний;
- для звичайних підлог і поверхонь - блакитний;
- містять в собі «доглядають компоненти» - зелений [55].

Із метою охорони безпеки життєдіяльності людини і тварин, і запобігання небажаних для людини наслідків до дезінфікуючих речовин, які використовуються у фармацевтичній і харчовій промисловостях, висувається ряд вимог:

- широкий спектр антимікробної дії;
- безпека для людей і тварин;
- мінімальні корозійна активність та агресивність;
- легка розчинність у воді;
- відсутність різкого запаху;
- стійкість при зберіганні, використанні, придатність до транспортування;
- висока активність;
- низька ціна та висока доступність;
- здатність до очищення та відбілювання [56].

Обґрунтування вибору дезінфікуючих засобів для виробництва стрептокінази

Промислове виробництво стрептокінази здійснюється протягом 60 днів. Приміщення для виготовлення ферменту повинне бути обладнане наступними агрегатами: ферментер об'ємом 2,0 м³, інокулятор об'ємом 200 л, інокулятор об'ємом 20 л, а також збірники відповідних об'ємів для підготовки поживного середовища.

Кількість цільового продукту за один виробничий цикл становить 1,07 м³. Загальна кількість циклів за 60 робочих днів складає: $60 / 1,07 = 56$ циклів.

Обладнання необхідно мити та дезінфікувати перед кожним виробничим циклом, тобто 56 раз на рік (кількість циклів на рік).

Підлогу необхідно мити та дезінфікувати кожного дня по одному разу – всього 60 разів (відповідно до кількості трудоднів).

Стіни, двері та вікна миють та дезінфікують раз на місяць в якості генеральних прибирань. Кількість генеральних прибирань становитиме 2 рази.

Враховуючи те, що стандартна норма витрат робочого розчину мийного та/або дезінфікуючого засобу складає 100 мл на 1 м² площі, витрати робочих розчинів миючих засобів для підготовки виробничого приміщення для біосинтезу стрептокінази будуть становити для одного циклу: для підлоги – 4,2 л; для стін, дверей, вікон – 6,5 л.

Санітарну обробку необхідно проводити в найкоротший проміжок часу після використання обладнання та закінчення технологічного процесу. У випадку безперервної роботи санітарну обробку проводять після закінчення робочого циклу [57].

Засоби варто застосовувати з інтервалом в 3 місяці для запобігання розвитку стійких штамів мікроорганізмів. Виробництво триває 60 трудоднів, отже необхідно підібрати 2-3 різних миючих засобів для оброблення поверхонь.

Обладнання, яке не використовується після миття і дезінфекції більше 6 годин, повторно споліскується та дезінфікується перед початком роботи. Контроль якості миття і дезінфекції здійснює лабораторія підприємства безпосередньо перед початком роботи [57].

Миття і дезінфекція обладнання

Для миття і дезінфекції обладнання найкращим вибором є використання СІР-мийки. Автоматизована система мийки призначена для забезпечення безрозбірного миття обладнання і трубопроводів миючими розчинами ополіскування, хімічної і термічної дезінфекції в автоматичному режимі.

Установка СІР-мийки дає змогу контролювати:

- температуру;
- тиск;
- об'єм води;
- концентрацію;
- швидкості потоку;
- рівні миючих розчинів в ємностях;

- час мийки;
- спостерігати стан клапанів, насосів, аварії та ін. [49,58].

Циркуляція розчинів через циркуляційний резервуар і нагрівання в пластинчастому теплообміннику, в потоці забезпечує як велику гнучкість мийки, так і економію енергії, води і миючих засобів (зокрема можливість багаторазового використання їх розчинів). Наявність власних дозуючих насосів і датчиків концентрації на подачі в кожному контурі забезпечує підтримання необхідної концентрації як в малому, так і у великому контурі під час всього процесу мийки, тому підготовчий етап можна виключити [50].

Технологічні операції СІР-мийки.

Процеси мийки складаються з виконуваних послідовно операцій або їх циклів [46]:

- видалення залишків продукту;
- попереднє ополіскування;
- рециркуляція миючого розчину;
- проміжне ополіскування;
- повторна рециркуляція миючого розчину (при необхідності);
- проміжне ополіскування;
- дезінфекція;
- остаточне ополіскування.

Вимоги до миючих засобів, що застосовуються у СІР-станціях [49]:

До складу забруднень обладнання і поверхонь приміщень входять білки, вуглеводи, жири та мінеральні речовини в комплексі з білками. Тому в якості миючих засобів доцільно використовують лужні та кислотні речовини. Білки та жири гідролізуються лугами, а комплекси мінеральних речовин розчиняються та видаляються з поверхні обладнання з допомогою кислот [59].

Виходячи з вищесказаного для ефективного і економічно вигідного очищення внутрішніх поверхонь СІР – мийкою, доцільно використати наступні миючі засоби:

Каустична сода (їдкий натр, NaOH) - являє собою безбарвну кристалічну речовину. Добре розчиняється у воді. Водні розчини мають лужну реакцію. Гарячі (1-2) % розчини каустичної соди добре обмилюють жири, гідролізують білки, розщеплюють вуглеводи. Засіб належить до високонебезпечних речовин (2 клас небезпеки по ГОСТ 12.1.007). При використанні необхідний спецодяг. Рекомендується використовувати 1-2 % розчини температурою (55 + /- 5) для миття технологічного обладнання та комунікацій. Перевагою даного засобу є дешевизна і додаткова дезінфікуюча дія [46].

Біомой – мийний засіб, що містить синтетичні поверхнево активні речовини (алкілбензолсульфонат натрію (сульфонол)) та протеолітичні ферменти (лужна фосфатаза). Являє собою порошок світлого кольору (від білого до світло-жовтого), який має помірний запах використаної сировини.. Водні розчини біомою безбарвні, прозорі, виявляють мийні, емульгуючі та диспергуючі властивості, легко видаляють білково-жирову плівку з поверхонь технологічного обладнання, легко змиваються, не залишають нальоту. На відміну від інших мийних засобів, біомой виявляє високу мийну активність при температурі не вище (40 + - 5) градусів Цельсію. Розчини біомою не ушкоджують об'єкти з нержавіючої сталі, чорного металу з антикорозійним покриттям, алюмінію, скла, гуми, полімерних матеріалів, кахлю, емалі. Засіб належить до малонебезпечних речовин (4 клас небезпеки по ГОСТ 12.1.007). Рекомендується 0.15-0.3 % розчин температурою (40+/-5) градусів Цельсію для миття технологічного обладнання і комунікацій та миття скляної і полімерної тари. Має властивості дезінфектанта [46, 60].

Об'єми миючого засобу при циркуляційній мийці складає 20% від об'єму обладнання.

Після миття та ополіскування обладнання необхідно дезінфікувати.

Для обладнання найвигідніше буде застосовувати в якості дезінфекції – стерилізацію обладнання підведенням гострої пари до внутрішньої поверхні через інертність до матеріалів обладнання, високу ефективність знищення мікроорганізмів, можливість реалізації в великих об'ємах обладнання і економічну вигідність і порівнянні з іншими засобами [61]. Здійснити це можливо також за допомогою СІР-станції (для великого обладнання) та автоклаву (для інокулятора об'ємом 10 л)

Миття і дезінфекція підлоги, стін, дверей і вікон

В якості миючого засобу для підлоги, стін, дверей пропонується використання **кальцинованої соди**, що являє собою зневоднений вуглекислий натрій (Na_2CO_3). Має вигляд білого дрібнокристалічного порошку, який добре розчиняється у воді. У водних розчинах кальцинована сода частково розкладається з утворенням їдкого луку та гідрокарбонату, які зумовлюють мийні властивості. Гарячі (55 ± 5) градусів Цельсію розчини кальцинованої соди добре обмилюють жирові забруднення на поверхнях та руйнують білки. При зменшенні температури розчинів до (45 ± 5) градусів Цельсію їх мийна здатність різко падає. Розчини кальцинованої соди викликають корозію у об'єктів, які виготовлені з алюмінію. Засіб належить до помірно небезпечних речовин (3 клас безпеки по ГОСТ 12.1.007). У нативному вигляді та концентрованих розчинах подразнює шкіру і слизову оболонку очей. Зберігають в пакуванні виробника в критих складських приміщеннях. Рекомендується використовувати 0,5 % розчини температурою (55 ± 5) градусів Цельсію для миття. Серед переваг кальцинованої соди є її дешевизна і додаткова дезінфікуюча дія [46].

Подальша обробка підлоги, стін, дверей та вікон здійснюється дезінфектантами. Забезпечити їх ефективну і економічно вигідну дезінфекцію здатен лише хімічний метод.

Важливо згадати те, що використання деззасобів на основі діючих речовин з деяких вказаних груп упродовж тривалого часу може призвести до формування стійкості (резистентності) до нього. Експериментальні дослідження і клінічні спостереження переконливо свідчать про порівняно швидке формування резистентності мікроорганізмів до ЧАС і до таких хлорактивних засобів, як хлорне вапно і моноклорамін [50]. Тому необхідно використовувати кілька різних дезінфектантів на рік(а саме 3-4) для обробки приміщення.

На сьогоднішній день, також дуже часто використовуються дезінфікуючі засоби які комбінують в собі декілька речовин з різних груп сполук, щоб зменшити негативні впливи, розширити спектр протимікробної дії та сприяти меншим витратам речовин, що призводить до зменшення ціни на засіб.

Отже, на основі цих даних можемо обрати наступні деззасоби:

«**DEZALDUM 20**» Засіб для дезінфекції та миття поверхонь, для боротьби з пліснявими грибами та для дезінфекції, чистки і миття сміттєприбирального обладнання та сміттєзбірників на підприємствах комунально-побутового обслуговування, громадського харчування, торгівлі, промислових ринках, на об'єктах харчопереробної промисловості та підприємствах агропромислового комплексу, фармацевтичної, хімічної, біотехнологічної промисловості, у закладах освіти, соціального забезпечення, культури, відпочинку, спорту. Засіб ефективний проти грампозитивних і грамнегативних бактерій, виявляє противірусну дію до вірусу поліомієліту та, відповідно, до менш стійких вірусів, зокрема - грипу, вірусу імунодефіциту людини, кору, епідемічного паротиту, вірусних гепатитів А, В, С, D, коро-, аденовірусів, ротавірусних гастроентеритів, ЕСНО, Коксакі, коронавірусів людини, в тому числі SARS-CoV-2, що викликає COVID-19, та інших вірусів.

Склад: вода підготовлена; >15% бензалконію хлорид; > 10 % глутаровий альдегід, ізопропіловий спирт; н-ПАР, регулятор кислотності, комплексоутворювач. [62]

«Лізоформін 3000». Має бактерицидні, фунгіцидні, спороцидні властивості. До складу входить 9,5% глутарового альдегіду, 7,5% гліоксалу, 9,6 додецилдиметиламонію хлориду, допоміжні речовини (включаючи стабілізатори та антикорозійні речовини). Використовується в робочій концентрації 0,25% [63].

«Секусепт актив». Містить 50% пероксигідрат карбонату натрію, 25% - тетраацетилетилендіамін. Має антимікробну дію відносно грамнегативних та грампозитивних бактерій (включаючи мікобактерії туберкульозу), вірусів (тестовано на вірус поліомієліту 1 типу), грибів, та спороцидну дію. Пропонується використовувати 0,5 % робочий розчин [64].

Рекомендується 100 мл робочого розчину деззасобу до обробки 1 м² поверхонь

Узагальнена характеристика витрат мийних та дезінфікувальних засобів представлена у таблиці 4.2.

Таблиця 4.2

Узагальнена характеристика миючих та дезінфікуючих засобів для виробництва стрептокінази

Назва мийного/дезінфікуючого засобу	Об'єкт миття/або дезінфекції	Концентрація робочого розчину, %
Каустична сода ¹	Обладнання	1
Біомой ³	Обладнання	0,3
Кальцинована сода ⁴	Підлога, стіни, двері, вікна	0,5
DEZALDUM 20 ⁵	Стіни, підлога, вікна, двері	0,5
Лізоформін 3000 ⁶	Стіни, підлога, вікна, двері	0,25
Секусепт актив ⁷	Стіни, підлога, вікна, двері	0,5

4.1.4 Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища.

Для отримання максимальної кількості цільового продукту, а саме стрептокінази, для продуцента *E.coli* BL21 (DE3) було обране оптимальне поживне середовище, склад якого наведено у таблиці 4.3.

Таблиця 4.3

Склад поживного середовища для одержання стрептокінази *E.coli* BL21 (DE3) [1].

Компоненти ПС	Вміст компоненту, г/л
Глюкоза	10
KH_2PO_4	13,3
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	4
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,2
Ампіцилін	0,1
Концентрований розчин мікроелементів – 25 мл/л:	
ЕДТА	0,42
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,125
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,75
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,11
H_3BO_4	0,15
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,125
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,85
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	5

Для стадії культивування з підживленням у ферментері на 2 м³, концентрація компонентів підживлюючого розчину буде наступною:

Глюкоза – 400 г/л

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 25 г/л

ПТГ (індуктор ізопропіл- β -тіогалактопіранозид) - 0.2383 г/л, (кінцева концентрація 1мМ) [1].

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

Для проведення стерилізації потрібно розділити поживне середовище на композиції, оскільки воно має термостабільні та термолабільні компоненти, які не можна стерилізувати разом.

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

Композиція А: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв).

Композиція Б: ампіцилін (мембранна фільтрація, розмір пор 0,22 мкм)хв).

Композиція В: KH_2PO_4 , $(NH_4)_2HPO_4$, (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв).

Композиція Г: Концентрований розчин глюкози, (режим стерилізації: 112 °С, 0,05 Мпа, 30 хв).

А також готують запасний розчин мікроелементів ($EDTA$, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, H_3BO_4 , $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) об'ємом 100 мл і з концентрацією, збільшеною у 100 разів - так зручніше робити наважку солей. Тоді для 1000 мл ПС для колб на качалках треба буде $0,25 \times 1,0 = 0,25$ мл об'єму конц.розчину мікроелементів, для 11 та 120 л ПС 2,75 мл та 30 мл об'єму конц.розчину мікроелементів відповідно. На стадію біосинтезу об'єм конц.розчину мікроелементів буде становити 300 мл. А також готують розчин $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, як складову розчину мікроелементів, у концентрації 5 г/л р-ну мікроелементів, для стадій на колбах на качалках, в посівних апаратах 20 л, 200 та для ферментера об'ємом 2 м³

Розчин мікроелементів стерилізують в автоклаві при 131°С упродовж 40 хв.

Основні солі (композиція А) стерилізують при 131°С протягом 40 хв окремо від фосфатних солей (композиція В) з метою уникнення утворення осаду при нагріванні. Стерилізацію композицій А та В та здійснюють в автоклаві.

Композиція Г готується наступним чином: на технічних вагах зважують 10 г глюкози і поміщають в колбу об'ємом 1л. Додають 25 мл дистильованої води і перемішують. Кінцева концентрація глюкози - 40%, після чого закривають ватно-марлевою пробкою. Після цього стерилізують в автоклаві при 112°C С і тиску 0,05 МПа упродовж 30 хв, як термолабільну речовину.

Розчин антибіотика стерилізують холодною стерилізацією крізь мембранні фільтри, з розміром пор 0,22 мкм

Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в інокуляторах та посівних апаратах

Стерилізація 11,1л, 120 л поживного середовища, необхідних для цих стадій, здійснюється у відповідних посівних апаратах, що потребує перескладання композицій поживного середовища:

Композиція А: KH_2PO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв., рН 4,0–4,5).

Композиція Б: ампіцилін (мембранна фільтрація, розмір пор 0,22 мкм)

Композиція В: Концентрований розчин глюкози (автоклав, режим стерилізації: 112°C, 0,05МПа, 30 хв.)

Оскільки для даної стадії біосинтезу потрібно велика кількість поживного середовища, тому основні і фосфорні солі об'єднують в одну композицію А, готують у збірнику з сорочкою і мішалкою, а стерилізують в інокуляторі при рН 4,5, щоб уникнути випадання осаду. Для цього середовище підкислюють 6%-м розчином сульфатної кислоти. Режим стерилізації: 131 °С, 40 хв.

Розчин антибіотика (Композиція Б) стерилізують холодною стерилізацією крізь мембранні фільтри, з розміром пор 0,22 мкм

Композицію В готують наступним способом: на технічних вагах зважують 110 г глюкози і поміщають в колбу об'ємом 1л. Додають 275 мл дистильованої води і перемішують. Кінцева концентрація глюкози - 40%, після чого закривають ватно-марлевою пробкою. Після цього стерилізують в автоклаві при 112°C 30 хв.

Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу

Середовище ділять на такі композиції:

Композиція А: $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв., рН 4,5).

Композиція Б: ампіцилін (мембранна фільтрація, розмір пор 0,22 мкм)

Композиція В: глюкоза (режим стерилізації: 112 °С, 0,05 МПа, 30 хв).

Основні і фосфорні солі об'єднують в одну композицію А, готують у реакторі-змішувачі з сорочкою і мішалкою, а стерилізують в біореакторі при рН 4,5, щоб уникнути випадання осаду. Для цього середовище підкислюють 6%-м розчином сульфатної кислоти. Режим стерилізації: 131 °С, 40 хв.

Розчин антибіотика (Композиція Б) стерилізують холодною стерилізацією крізь мембранні фільтри, з розміром пор 0,22 мкм

Розчин глюкози (Композиція В) готують і стерилізують окремо у збірнику за наступних режимів: 112°С, 0,05 МПа упродовж 30 хв.

Також для цієї стадії потрібен підживлюючий розчин глюкози 400 г/л, солі магнієвої 25 г/л та індуктора ШТГ з концентрацією 1 мМ.

Стерилізацією цих 3 компонентів проводять окремо. Розчин глюкози стерилізують у збірнику за наступних режимів: 112°С, 0,05 МПа упродовж 30 хв., Розчин магнієвої солі стерилізують у збірнику, режим стерилізації: 131 °С, 40 хв. ШТГ стерилізують холодною стерилізацією крізь мембранні фільтри, з розміром пор 0,22 мкм, в асептичних умовах.

Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН

Під час процесу біосинтезу рівень рН має бути одним із стабільних показників та повинен становити 6,5 – 7,5, адже саме при цьому значенні біологічний агент синтезує найбільшу кількість цільового продукту – стрептокінази.

Регулюють рівень рН за допомогою кислот і лугів. Найоптимальніше використовувати 6% розчин NaOH та 6% розчин H₂SO₄ тому що дані хімічні реактиви є недорогими та виконують свою функцію.

Приготування та стерилізація розчинів лугу та кислоти відбувається у спеціальних реакторах-змішувачах. Розчин лугу стерилізують при 131 °С, 40 хв.. Стерильний розчин кислоти готується за допомогою додавання стерильної води в асептичних умовах та додаткової стерилізації не потребує.

РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Таблиця 5.1

Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу стрептокінази

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
ПЗ-1	Повітрязабірник	1	Повітрязабірник фірми HangYan (Китай) моделі YWL4E-200, max швидкість - 1360 об/хв, максимальна продуктивність - 1500 м ³ /год, робочий тиск – 325 Па, напруга – 220 В, частота – 50 Гц, вхідна потужність – 310 Вт, габаритні розміри: h = 372 м, w = 332 м [65]
Ф-2	Фільтр грубої очистки	1	Фільтр повітряний ВЕНТС ФБК 100 з полімерних волокон фірми «VENTBAZAR» E= 90 % [66]
К-3	Компресор	1	Компресор – модель VEGA 200 Матеріал – сталь, продуктивність – 1730 м ³ /год, ширина – 2,5 м, висота – 2,115 м. [67]
Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Потужність - 46,5 кВт; Пропускна здатність – 190 л/хв, Виробник : «PASKAL» (Туреччина, Італія) [68]

					<i>НУХТ БТЕК 04.02.07 ДР ПЗ</i>				
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дат</i>					
<i>Разробив</i>		<i>Загороднюк Т.Є</i>			<i>РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ</i>		<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Керівник</i>		<i>Красінько В.О.</i>						59	
<i>Затвердив</i>		<i>Стадніков В.П.</i>			<i>Кафедра БТМ</i>				

Продовження таблиці 5.1

P-5	Ресивер-вологівідділювач	1	Повітряний ресивер фірми ТОВ "Летісс Компресор" (Україна) моделі РВ 500.15.00, робочий об'єм – 500 л, робочий тиск – до 15 атм, оснащений запобіжним клапаном на 16 атм та манометром вхід/вихід – 1 ¼ дюйма, габарити (мм): 700x700x1800, вага – 150 кг [69]
T-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Теплообмінник КС 1750 Кількість повітря - 4500 м3/год, Конструктивно корпус виконаний з оцинкованої сталі, колектори виконані з мідної труби, теплообмінні пластини з алюмінію. Габаритний розмір: 1000 x 500 x 200 мм, приєднання труб муфтове G1. «Виробнича компанія Галактик» (Україна). [70]
Ф-7	Фільтр тонкої очистки	1	Фільтр моделі ФСВ-М-60 матеріал фторопласт , Е=99,996, величина пор 0,25 мкм, робочий тиск бар, 150 °С, продуктивність 3600 м ³ /год. Виробник: «ОМІ» (Італія) [71]
Ф-9	Фільтр індивідуальної очистки	1	Фільтр «5152507Т3-Е-С» компанії Aergosart термостійкий , температура до 150 0С матеріал- поліпропілен. Розмір пор- 0,2мкм.Е=99,999[72]

Продовження таблиці 5.1

ІН-10	Інокулятор об'ємом 20 л	1	<p>Біореактор фірми "Sartorius" (Німеччина) моделі Biostat CPlus (№ RCP-M20L), геометричний об'єм – 20 л, габаритні розміри: w = 1000мм, h = 1900мм, d = 750мм; маса – 215 кг; корпус – нержавіюча сталь марки AISI 316L, обладнаний паровою сорочкою і сорочкою для холодної води, барботером з мікроотворами, 3-лопатевою сегментованою мішалкою зі швидкістю перемішування 20-570 об/хв, 4 з'ємними відбійниками, 3 клапанами Sacova для подачі матеріалу з колб, манометром (3 бар надл.), 2 перистальтичними насосами для подачі титрувальних агентів, автоматичною системою стерилізації SIP (до 130 °С), витратоміром "Sparger" або "Overlay" для повітря; апарат оснащений датчиком рН (2-12), чутливістю рН 0,01; датчиком температури Pt100 (0-150 °С) чутливістю 0,1 °С; датчиком розчиненого кисню (0-100%); Також апарат має дистанційний сенсорний блок управління. [73]</p>
Р-11	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації підживлюючого розчину глюкози для стадії біосинтезу	1	<p>Об'єм апарату – 100 л; матеріал – нержавіюча сталь; оснащений перемішуючим пристроєм – 200 об/хв; витримує тиск – 0,39 МПа; діаметр – 450 мм, висота – 970 мм; виробник – МашХим. [74]</p>

Продовження таблиці 5.1

Р-12	Реактор-змішувач для підготування та стерилізації композиції В для інокулятора об'ємом 200, Для приготування та стерилізації підживлюючого розчину солі для стадії біосинтезу	1	Об'єм апарату – 50 л; матеріал – нержавіюча сталь 316L; температура стерилізації до +143°C, діаметр – 500 мм, висота – 1500 мм; виробник – BioTechno Group [75]
Д-13	Об'ємно- ваговий дозатор	1	Ваговий дискретний дозатор- витратомір для сипких продуктів НВП "Техноваги" призначений для дозування сипких продуктів по вазі. Точність зважування становить 0,1%. Продуктивність: від 0,01 до 0,5 м куб./год [76]
Ф-14	Фільтри індивідуальної очистки	1	Фільтр «5152507Т3-Е-С» компанії Aerosart термостійкий, температура до 150 0С матеріал- поліпропілен. Розмір пор- 0,2мкм.Е=99,999[72]
ІН-15	Інокулятор об'ємом 200 л	1	Біореактор фірми “Sartorius” (Німеччина) моделі Biostat D-DCU МО (№ RDD-M2HL), геометричний об'єм – 200 л, мінімальний робочий об'єм – 47 л, габаритні розміри (мм): h = 2400, d = 1200; маса – 600 кг; корпус – нержавіюча сталь марки AISI 316L [77]

Продовження таблиці 5.1

Н-16	Насос відцентровий	1	Насос відцентровий фірми CP Pump System (Німеччина) моделі МКР Віо, потужність - від 0,5 до 60 м ³ /год, клас тиску – PN 16, робоча температура -20...+150°C, допустима кінематична в'язкість рідини – 0,5-350 мм ² /с, матеріал корпусу – нержавіюча сталь марки 316L, матеріал ущільнювальних прокладок – EPDM, FEP/FKM [78]
Д-17	Об'ємно- ваговий дозатор	1	Ваговий дискретний дозатор- витратомір для сипких продуктів НВП "Техноваги" призначений для дозування сипких продуктів по вазі. Точність зважування становить 0,1%. Продуктивність: від 0,01 до 0,5 м куб./год [76]
Р-18	Реактор-змішувач для розчину солі	1	Об'єм апарату – 630 л; матеріал – нержавіюча сталь AISI 304; частота обертання лопатевої мішалки – 150 об/хв.; товщина ковдри – 2 мм; товщина ізоляційного матеріалу – 40 мм; витримує тиск – 0,4 МПа; діаметр – 710 мм, висота – 1300 мм; виробник – Єврохиммаш. [79]

Н-19	Насос відцентровий	1	Насос відцентровий гігієнічний фірми JABSCO (Німеччина) моделі 282ХО(30550), max потужність – 58 л/хв, max тиск – 3 бар, max швидкість 2500 об/хв, робоча температура до +120°С, , матеріал корпусу – нержавіюча сталь марки 316L, габаритні розміри: h = 146 мм, w = 165мм, l = 114мм; маса – 2,9 кг.[80]
Д-20	Об'ємно- ваговий дозатор	1	Ваговий дискретний дозатор- витратомір для сипких продуктів НВП "Техноваги" призначений для дозування сипких продуктів по вазі. Точність зважування становить 0,1%. Продуктивність: від 0,01 до 0,5 м куб./год [76]
Р-21	Реактор-змішувач для приготування композиції В для стадії біосинтезу	1	Реактор-змішувач РВ – 0,5; робочим об'ємом 500 л; габаритні розміри (мм): d=1185, h=2385; оснащений сорочкою та перемішувачем – рамною мішалкою зі скребком, швидкість перемішування 100 об./хв, матеріал – сталь AISI 316L. [81]
Н-22	Насос відцентровий	1	Насос відцентровий гігієнічний фірми JABSCO (Німеччина) моделі 283ХО(30560), max потужність – 128 л/хв, max тиск – 4,5 бар, max швидкість 2500 об/хв, робоча температура до +120°С, , матеріал корпусу – нержавіюча сталь марки 316L, габаритні розміри: h = 159мм, w = 216мм, l = 127мм; маса – 4,4 кг. 80]

Продовження таблиці 5.1

Д-23	Об'ємно- ваговий дозатор	1	Ваговий дискретний дозатор- витратомір для сипких продуктів НВП "Техноваги" призначений для дозування сипких продуктів по вазі. Точність зважування становить 0,1%. Продуктивність: від 0,01 до 0,5 м куб./год [76]
Р-24	Реактор-змішувач для підготування та стерилізації композиції В для інокулятора об'ємом 200, Для приготування та стерилізації підживлюючого розчину солі для стадії біосинтезу	1	Об'єм апарату – 50 л; матеріал – нержавіюча сталь 316L; температура стерилізації до +143°C, діаметр – 500 мм, висота – 1500 мм; виробник – BioTechno Group [82]
Р-25	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації розчину солі для інокулятора 20 л Та розчинів лугу та кислоти для підлужнення/підкислення середовища в ферментері об'ємом 2м ³	1	Реактор сталевий об'ємом 10 л , виконаний на замовлення в «Машхим» (Росія); оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм , швидкість перемішування від 25 до 3000 об/хв.; потужність двигуна 0,18-0,25 кВт Габаритні розміри: висота = 1175 мм, ширина 430 мм. [74]

Продовження таблиці 5.1

Р-26	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації розчину солі для інокулятора 20 л Та розчинів лугу та кислоти для підлужнення/підкислення середовища в ферментері об'ємом 2м ³	1	Реактор сталевий об'ємом 10 л , виконаний на замовлення в «Машхим» (Росія); оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм , швидкість перемішування від 25 до 3000 об/хв.; потужність двигуна 0,18-0,25 кВт Габаритні розміри: висота = 1175 мм, ширина 430 мм. [74]
Д-27	Об'ємно- ваговий дозатор	1	Ваговий дискретний дозатор- витратомір для сипких продуктів НВП "Техноваги" призначений для дозування сипких продуктів по вазі. Точність зважування становить 0,1%. Продуктивність: від 0,01 до 0,5 м куб./год [76]
Р-28	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації підживлюючого розчину глюкози для стадії біосинтезу	1	Об'єм апарату – 100 л; матеріал – нержавіюча сталь; оснащений перемішувальним пристроєм – 200 об/хв; витримує тиск – 0,39 МПа; діаметр – 450 мм, висота – 970 мм; виробник – МашХим. [74]
Ф-29	Фільтри індивідуальної очистки	1	Фільтр «5152507Т3-Е-С» компанії Aerosart термостійкий , температура до 150 0С матеріал- поліпропілен. Розмір пор- 0,2мкм.Е=99,999[72]

Продовження таблиці 5.1

ФВ-30	Ферментер виробничий	1	<p>Ферментер фірми “Sartorius” (Німеччина) моделі Biostat D-DCU MO-2000 (під замовлення), геометричний об’єм – 2 м³, габаритні розміри (включаючи платформу) (мм): w = 3400, h = 3900, d = 2750; маса – 2045 кг; корпус – нержавіюча електрополірована сталь марки AISI 316L, вікно для проглядання – боросилікатне скло; електропостачання – 208 Впс, частота – 60 Грц, енерговитрата – 23 А; обладнаний паровою сорочкою і сорочкою для холодної води (матеріал – нержавіюча сталь марки AISI 316L), барботером з мікроотворами, мішалкою зі швидкістю перемішування 20-570 об/хв, 4 зовнішніми входами, автоматичною системою стерилізації SIP (до 130 °С), апарат оснащений датчиком рН (2-12), чутливістю рН 0,01; платиновим датчиком температури Pt100 (0-150 °С) чутливістю 0,1 °С; п’єзометричним датчиком тиску чутливістю 1,0 мбар; полярографічним або оптичним датчиком розчиненого кисню (0-100%). Апарат оснащений дистанційним сенсорним блоком управління (Siemens) [77,83]</p>
-------	----------------------	---	---

Закінчення таблиці 5.1

Н-31	Насос відцентровий	1	Насос відцентровий гігієнічний фірми JABSCO (Німеччина) моделі 284ХО(30570), максимальна потужність – 225 л/хв, максимальний тиск – 4,5 бар, максимальна швидкість 1800 об/хв, робоча температура до +120°С, , матеріал корпусу – нержавіюча сталь 316L, габаритні розміри (мм): h = 178, w = 260, l = 159; маса – 9,1 кг. [80]
------	--------------------	---	--

РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ПРОЦЕСУ ОТРИМАННЯ СТРЕПТОКІНАЗИ ЗА КУЛЬТИВУВАННЯ *E. COLI* BL21 (DE3)

Технологічна схема синтезу стрептокінази бактеріями *E.coli* BL21 (DE3) включає в себе допоміжні роботи (підготовка і стерилізація поживних середовищ, приготування титрувальних агентів, приготування та стерилізація підживлюючого розчину глюкози) та технологічний процес (підготовка посівного матеріалу і біосинтез цільового продукту).

Технологічну схему біосинтезу стрептокінази наведено у графічній частині проекту.

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

ДР 1.1.1. Миття

Миття здійснюють за допомогою розчину мийного засобу (від ДР 1.1.2). Все обладнання миють з використанням СІР-мийки. Через всю апаратуру прокачують миючий засіб, потім ополіскують водою. Відпрацьовану воду зливають в каналізацію.

Технічний огляд здійснюють візуально. У разі знаходження видимих неущільнень в комунікаціях та запірній арматурі проводять підтягування різьбових з'єднань.

ДР 1.1.3 Дезінфекція та ополіскування обладнання і комунікацій

Дезінфекцію та ополіскування обладнання і комунікацій здійснюють за допомогою розчину відповідного дез.розчину та після завершення змивають його водою. Відпрацьовану воду зливають в каналізацію.

					<i>НУХТ БТЕК 04.02.07 ДР ПЗ</i>			
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дат</i>	<i>РОЗДІЛ 6. ОПИС ТС ПР-СУ ОТРИМАННЯ СТРЕПТОКІНАЗИ</i>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розробив</i>		<i>Загороднюк Т.Е.</i>						69
<i>Керівник</i>		<i>Красінко В.О.</i>				<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Затвердив</i>		<i>Стадников В.П.</i>						

ДР 1.1.4. Перевірка на герметичність

На апараті закривають усю запірну арматуру, подають аераційне повітря до надлишкового тиску $P = 0,1-0,2$ МПа.

Перекривають вентиль подачі повітря та фіксують покази манометра та час витримки (30–60 хв) в операційному журналі. Якщо падіння тиску не перевищує 0,01 МПа, вважають, що апарат герметичний. У випадку перевищення цього значення здійснюють пошук неущільнень в апараті та місцях з'єднання запірної арматури з комунікаціями галогеновими течієпошукачами. Перед набором тиску вносять чотирихлорний карбон, закривають всю запірну арматуру, апарат нагрівають (до 80°C) та збільшують тиск в апараті (до 0,2 МПа). При цьому пари чотирихлорного карбону проникають через неущільнення і виявляються у разі наближення щупа течієпошукача до них. Тривалість перевірки одного апарату становить 60 хв.

ДР 1.1.5. Стерилізація

В сорочку апарата подають насичену пару та прогрівають апарат до температури 80–90°C. Відкривають усю запірну арматуру на відкритих трубних закінченнях та підведених до апарата комунікаціях і подають гостру пару безпосередньо в апарат через барботер або нижній спуск, попередньо відкривши вентиль виходу відпрацьованого повітря для видалення повітря з апарату. При досягненні в апараті температури стерилізації ($t = 130-135$ °C) закривають усю запірну арматуру на апараті, крім парової, і витримують заданий час стерилізації (60 хв). При стерилізації апарата паралельно стерилізують індивідуальні фільтри стерильного та відпрацьованого повітря. Закривають усю запірну арматуру та арматуру подачі пари в апарат. У сорочку подають холодна вода. Для компенсації падіння тиску (утворення вакууму при конденсації пари в апараті) в апарат подають стерильне повітря. Процес охолодження здійснюють до досягнення температури 30–40°C і надлишкового тиску $P = 0,003-0,005$ МПа.

ДР 2. Підготовка стерильного аераційного повітря

ДР 2.1. Забір атмосферного повітря

Забір атмосферного повітря здійснюють за допомогою повітрязабірника (ПЗ-1) на висоті, яка складає не менше 30 м від поверхні землі.

ДР 2.2. Очищення повітря від пилу і механічних часток

Повітря очищається від грубого аерозолю (пилу) на фільтрі грубої очистки (Ф-2). Ступінь очищення $E=95\%$.

ДР 2.3. Стиснення повітря

Повітря стискають у турбокомпресорі (К-3) до 0,4-0,5 МПа. Стиснення повітря в компресорі призводить до підвищення його температури до 250°C і збільшення вмісту вологи на одиницю об'єму

ДР 2.4. Охолодження повітря та видалення вологи

Для відведення надлишкової вологи стисненого повітря його «переохолоджують» в охолоджувачі повітря (Т-4) до температури $18-19^{\circ}\text{C}$ і подають на ресивер (Р-5) для згладжування пульсацій і відділення зайвої вологи ($W = 60-65\%$).

ДР 2.5. Нагрівання повітря

З метою запобігання утворення конденсату пари, на волокнах головного та індивідуальних фільтрів, охоложене повітря у теплообміннику(Т-6) нагрівають до $45-50^{\circ}\text{C}$.

ДР 2.6. Очищення повітря в головному фільтрі

Попереднє очищення повітря від мікроорганізмів здійснюють в головному фільтрі (Ф-7), в якому фільтрувальним матеріалом є поліестер. Ступінь очищення становить 95% .

ДР 2.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

Кожен інокулятор, ферментер оснащують індивідуальним фільтром (Ф-9, Ф-14, Ф-29). Складається з поліпропілену, ущільнений фторопластом. Ефективність очисти становить $99,995\%$.

ДР 3. Приготування та стерилізація титрувальних розчинів

ДР 3.1. Приготування 6% розчину H_2SO_4

ДР 3.1.1. Приготування 6% розчину H_2SO_4 для підкислення середовища в посівному апараті об'ємом 20 л

Потрібно приготувати 40 мл розчину 6% розчину H_2SO_4 для підкислення поживного середовища на стадії приготування ПС в інокуляторі ІН-10 об'ємом 20 л.

Для цього в простерилізовану колбу об'ємом 100 мл наливають 37,5 мл стерильної води і за допомогою раніше простерилізованої піпетки, при постійному перемішуванні під витяжною шафою, додають 2 мл 98% H_2SO_4 . Рідини обов'язково змішують в такому порядку, а не навпаки з метою уникнення сильної екзотермічної реакції. Колбу закривають стерильною скляною пробкою.

ДР 3.1.2. Приготування 6% розчину H_2SO_4 для підкислення середовища в посівному апараті об'ємом 200 л

Для приготування 400 мл 6% розчину H_2SO_4 в простерилізовану колбу об'ємом 1 л вносять 375 мл стерильної води і додають при постійному перемішуванні під витяжною шафою 20 мл 98% H_2SO_4 , відміряної мірним циліндром. Рідини обов'язково змішують в такому порядку, а не навпаки з метою уникнення сильної екзотермічної реакції. Колбу закривають стерильною скляною пробкою.

ДР 3.1.3. Приготування 6% розчину H_2SO_4 для підкислення середовища в ферментері об'ємом $2m^3$

Для приготування 4 л 6% розчину H_2SO_4 , у попередньо простерилізований збірник об'ємом 10 л додають 3,75 л стерильної води і 200 мл 98%-го розчину H_2SO_4 при постійному перемішуванні. Рідини обов'язково змішують в такому порядку, а не навпаки з метою уникнення сильної екзотермічної реакції.

ДР 3.2. Приготування 6%-го розчину NaOH

ДР 3.2.1. Приготування 6%-го розчину NaOH для вирощування в інокуляторі об'ємом 20 л

Розчин лугу готується аналогічно, як і розчин кислоти.

Потрібно приготувати 40 мл розчину 6%-го розчину NaOH для підлужнення поживного середовища на стадії приготування ПС в інокуляторі ІН-10 об'ємом 20 л.

Для цього в колбу об'ємом 100 мл наливають 30 мл дистильованої води і за допомогою шпателя, додають 10 мг NaOH. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою. Розчин стерилізують при температурі 131 °С упродовж 40 хв, P = 0,15 МПа.

ДР 3.2.2. Приготування 6%-го розчину NaOH для підлужнення середовища в посівному апараті об'ємом 200 л

Для приготування 400 мл 6%-го розчину NaOH в колбу об'ємом 1 л вносять 330 мл дистильованої води і додають при постійному перемішуванні, попередньо зважений на технічних вагах 70 мг NaOH. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою. Розчин стерилізують при температурі 131 °С упродовж 40 хв, P = 0,15 МПа.

ДР 3.2.3. Приготування 6%-го розчину NaOH для підлужнення середовища в ферментері об'ємом 2м³

Для приготування 4 л 6%-го розчину NaOH, у збірник об'ємом 10л додають 3,3 л дистильованої води і попередньо зважений на технічних вагах 700 мг NaOH. Розчин стерилізують при температурі 131 °С упродовж 40 хв, P = 0,15 МПа.

ДР 4. Приготування підживлюючих розчинів

ДР 4.1. Приготування та стерилізація підживлюючого розчину глюкози для ферментера об'ємом 2м³

Для 1200 л ПС із розрахунку 4,5 г/л на годину упродовж 7 годин, (оскільки обрано спосіб біосинтезу із внесенням індуктора) кількість внесеної із підживленням глюкози має становити: $4,5 \times 1200 \times 7 = 37,8$ кг глюкози

Для приготування підживлюючого розчину на технічних вагах зважують 37,8 кг глюкози, поміщають у збірник об'ємом 100 л і додають 40 л питної води при постійному перемішуванні. Стерилізують в реакторі змішувачі Р-28 при 112°C протягом 30 хв. Готовий розчин подають на стадію виробничого біосинтезу, коли концентрація глюкози в середовищі культивування зменшиться до концентрації 60 г/л (до ТП 7).

ДР 4.2. Приготування та стерилізація підживлюючого розчину солі для ферментера об'ємом 2м³

Для приготування підживлюючого розчину солі на технічних вагах зважують 2,4 кг $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ і поміщають у збірник-змішувач Р-24 об'ємом 50л, доливають 40 л питної води і перемішують до повного розчинення солі. Стерилізують при 131°C протягом 40 хв. Готовий розчин подають на стадію виробничого біосинтезу (до ТП 7).

ДР 4.3. Приготування та стерилізація підживлюючого розчину та ферментера об'ємом 2м³

На технічних вагах зважують 300 г ППТГ, переносять у колбу 1 л і додають 500 мл стерильної дистильованої води, перемішують. В асептичних умовах ППТГ стерилізують крізь мембранний фільтр. Готовий розчин антибіотика подають на стадію виробничого біосинтезу (до ТП 7).

ДР 5. Приготування та стерилізація поживних середовищ

ДР 5.1. Приготування і стерилізація концентрованого розчину глюкози для колб на качалках та для посівного апарату об'ємом 20 л

ДР 5.1.1 Приготування і стерилізація концентрованого розчину глюкози для колб на качалках

На технічних вагах зважують 10 г глюкози і поміщають в колбу об'ємом 1л. Додають 25 мл дистильованої води і перемішують. Кінцева концентрація глюкози - 40%, після чого закривають ватно-марлевою пробкою. Після цього стерилізують в автоклаві при 112°C 30 хв.

ДР 5.1.2 Приготування і стерилізація концентрованого розчину глюкози для посівного апарату об'ємом 20 л

На технічних вагах зважують 110 г глюкози і поміщають в колбу об'ємом 1л. Додають 279 мл дистильованої води і перемішують. Кінцева концентрація глюкози - 40%, після чого закривають ватно-марлевою пробкою. Після цього стерилізують в автоклаві при 112°C 30 хв.

ДР 5.2. Приготування і стерилізація запасного розчину мікроелементів для колб на качалках, для посівних апаратів об'ємом 20 л, 200л, та ферментера об'ємом 2м³

Окремо готують запасний концентрований розчин мікроелементів (ЕДТА, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, H_3BO_4 , $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) об'ємом 100 мл для стадій на колбах на качалках, в посівних апаратах 20л, 200л та об'ємом 300 мл для ферментера об'ємом 2м³. А також готують розчин $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, як складову розчину мікроелементів, у концентрації 5 г/л р-ну мікроелементів, для стадій на колбах на качалках, в посівних апаратах 20л, 200л, та для ферментера об'ємом 2м³

Для приготування 1,2 л поживного середовища необхідно 0,3 мл концентрованого розчину мікроелементів; 11 л – 3 мл; 120 л – 30 мл. Об'єм конц.розчину мікроелементів становить 100 мл, в ньому: 4,2г ЕДТА, 1,25 г $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 7,5 г $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1,1 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 1,5г H_3BO_4 , 1,25 г $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 8,5 г $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, також у цей розчин вносять 0,15 г $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ для об'єма середовища в 1,2 л, 1,5 г -20л; 15 г-200л; поміщають у колбу на 250 мл, додають 100 мл дистильованої води, перемішують та закривають колбу ватно-марлевою пробкою. Розчин мікроелементів стерилізують в автоклаві при 131°C упродовж 40 хв. Для приготування 1200 л поживного середовища необхідно

300 мл концентрованого розчину мікроелементів, в якому: 12,6 г ЕДТА, 3,75 г $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 22,5 г $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 3,3 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 4,5 г H_3BO_4 , 3,75 г $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 25,5 г $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Наважки поміщають у колбу на 750 мл, додають 200 мл дистильованої води, перемішують та закривають колбу ватно-марлевою пробкою. Розчин мікроелементів стерилізують в автоклаві при 131°C упродовж 40 хв. Також у цей розчин вносять 150 грам на літр розчину мікроелементів $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ об'єма середовища в 1200л. Наважку поміщають у колбу на 750 мл, додають 200 мл дистильованої води, перемішують та закривають колбу ватно-марлевою пробкою. Розчин мікроелементів стерилізують в автоклаві при 131°C упродовж 40 хв.

ДР 5.3 Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках

Вміст компонентів для приготування 1000 мл середовища наведено в таблиці 6.1.

Таблиця 6.1

Розрахунок вмісту компонентів поживного середовища для приготування 1000 мл субстрату

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонентів у 1000 мл середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, мл
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,2	1,2	А	200
Вода		200 мл		
Ампіцилін	0,1	0,1	Б	200
Вода		200 мл		
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	4	4	В	550
KH_2PO_4	13,3	13,3		
Вода		550 мл		
Глюкоза	10	40% концентрований р-н	Г	35 мл
Вода		25 мл		
Розчин мікроелементів*	25 мл/л	(0,25 мл/л концентрату)		0,25 мл концентрату

*Примітка - *: Від ДР.5.2 додають запасний розчин і мікроелементів*

ДР 5.3.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 1,2 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ і поміщають в колбу об'ємом 250 мл, доливають 200 мл дистильованої води і перемішують до повного розчинення солі, колбу закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізують у автоклаві при 131°C протягом 40 хв.

ДР 5.3.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 0,1 г ампіциліну і поміщають в колбу об'ємом 250 мл, доливають 200 мл стерильної дистильованої води і перемішують до повного розчинення антибіотику, стерилізують фільтрацією через мембранний фільтр, з розміром пор 0,22 мкм

ДР 5.3.3. Приготування і стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 4 г $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ і 13,3 г KH_2PO_4 і поміщають в колбу об'ємом 1л. Додають 550 мл дистильованої води і перемішують до розчинення солі після чого закривають ватно-марлевою пробкою. Після цього стерилізують в автоклаві при 131°C 40 хв.

ДР 5.3.4. Приготування і стерилізація композиції Г

На технічних вагах зважують 10 г глюкози і поміщають в колбу об'ємом 1л. Додають 25 мл дистильованої води і перемішують. Кінцева концентрація глюкози - 40%, після чого закривають ватно-марлевою пробкою. Після цього стерилізують в автоклаві при 112°C 30 хв.

ДР 5.4. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 20 л

Для одержання посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 20 л, потрібно приготувати 11 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 11 л середовища наведено у табл. 6.2.

Для засіву даного інокулятора потрібно внести 3 л посівного матеріалу, також враховується конденсат (10%), оскільки стерилізація гострою парою проходить у посівному апараті.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 11 л середовища

Компоненти поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонентів у 11 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
MgSO ₄ *7H ₂ O	1,2	13	А	8
(NH ₄) ₂ HPO ₄	4	44		
KH ₂ PO ₄	13,3	146		
Вода		7,2		
Конденсат		0,8		0,8
Ампіцилін	0,1	1,1	Б	1,5
Вода		1,5 л		
Глюкоза	111	40% концентрований р-н	В	390 мл концентрованого р-ну
Вода		279 мл		
Розчин мікроелементів*	25 мл/л (0,25 мл/л концентрату)	2,75 мл концентрату		2,75 мл концентрату

Від ДР.5.2. додають запасний р-н мікроелементів

ДР 5.4.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 13 г MgSO₄*7H₂O , 44 г (NH₄)₂HPO₄, 146 г KH₂PO₄. Наважки переносять у реактор-збірник Р-8 на 10л, додають 7,2 л води питної (враховуючи 10 % конденсату при подальшій стерилізації), вмикають перемішувач до повного розчинення компонентів, потім подають самопливом в інокулятор ІН-10 об'ємом 20 л, До отриманого розчину при перемішуванні додають 6 %-й розчин сульфатної кислоти (від ДР 3.1.1) до рН 4,5, стерилізацію проводять при 131°C (0,15 МПа) упродовж 40 хв.

ДР 5.4.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 1,1 г ампіциліну поміщають у простерилізовану колбу з об'ємом 2л, доливають 1,5 л стерильної дистильованої води і перемішують до повного розчинення антибіотику, стерилізують фільтрацією через мембранний фільтр, з розміром пор 0,22 мкм

ДР 5.4.3. Приготування і стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 111 г глюкози і поміщають в колбу об'ємом 1 л. Додають 279 мл дистильованої води і перемішують. Кінцева концентрація глюкози - 40%, після чого закривають ватно-марлевою пробкою. Після цього стерилізують в автоклаві при 112°C 30 хв.

ДР 5.5 Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 200 л

Для одержання посівного матеріалу в посівному апараті ІН-15 об'ємом 200 л потрібно приготувати 120 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 120 л середовища наведено у табл. 6.3.

Для засіву даного інокулятора потрібно внести 120 л посівного матеріалу, також враховується конденсат (10%), оскільки стерилізація гострою парою проходить у посівному апараті.

Таблиця 6.3

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 120 л середовища

Компоненти поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонентів у 120 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
MgSO ₄ *7H ₂ O	1,2	144	А	68
(NH ₄) ₂ HPO ₄	4	480		
KH ₂ PO ₄	13,3	1596		
Вода		62		
Конденсат				6,8
Ампіцилін	0,1	12 г	Б	1
Вода		1 л		
Конденсат				0,1
Глюкоза	10	1200	В	40
Вода		36		
Конденсат		4		
Розчин мікроелементів*	25 мл/л (0,25 мл/л концентрату)	30 мл концентрату		4

*Примітка - *: Від ДР.5.2. додають запасний розчин мікроелементів*

ДР 5.5.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 144 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 480 г $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 1596 г KH_2PO_4 . Наважки спочатку розчиняють у збірнику Р-11, додають 62 л води питної (враховуючи 10 % конденсату при подальшій стерилізації) вмикають перемішувач до повного розчинення компонентів. Потім перекачують у інокулятор ІН-15 об'ємом 200 л. До отриманого розчину при перемішуванні додають 6 %-й розчин сульфатної кислоти (від ДР 3.1.2.) до рН 4,5, стерилізацію проводять при 131°C (0,15 МПа) упродовж 40 хв.

ДР 5.5.2 Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 12 г ампіциліну поміщають у простерилізовану колбу об'ємом 2 л, доливають 1 л стерильної дистильованої води і перемішують до повного розчинення антибіотику, стерилізують фільтрацією через мембранний фільтр, з розміром пор 0,22 мкм.

ДР 5.5.3 Приготування і стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 1,2 кг глюкози, наважку поміщають у збірник Р-12 об'ємом 50 л і через об'ємно-ваговий дозатор Д-13 додають 36 л води.

Стерилізують композицію Б при 112°C упродовж 30 хв. Після стерилізації, через відцентровий насос подають в інокулятор ІН-15.

ДР 5.6. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в ферментері об'ємом 2 м³

Для одержання посівного матеріалу в посівному апараті ФВ-30 об'ємом 2 м³, потрібно приготувати 1200 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 1200 л середовища наведено у табл. 6.4.

Для засіву даного інокулятора потрібно внести 1200 л посівного матеріалу, оскільки стерилізація гострою парою проходить у посівному апараті.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 1200 л середовища

Компоненти поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонентів у 1200 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
MgSO ₄ *7H ₂ O	1,2	1,5 кг	А	630
(NH ₄) ₂ HPO ₄	4	5 кг		
KH ₂ PO ₄	13,3	16 кг		
Вода		592л		
Конденсат		6,3		6,3
Ампіцилін	0,1	120 г	Б	2
Вода		2 л		
Конденсат				0,2
Глюкоза	10	12 кг	В	400
Вода		360 л		
Конденсат				40
Розчин мікроелементів*	25 мл/л (0,25 мл/л концентрату)	300 мл концентрату		

Примітка - *: Від ДР.5.2. додають запасний розчин мікроелементів

ДР 5.6.1 Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 1,5 кг MgSO₄*7H₂O, 5 кг (NH₄)₂HPO₄, 16 кг KH₂PO₄. Наважки спочатку розчиняють у збірнику Р-18, через об'ємно-ваговий дозатор Д-17 додають 592 л води питної (враховуючи 10 % конденсату при подальшій стерилізації) вмикають перемішуючий пристрій до повного розчинення компонентів. Потім насосом Н-19 перекачують у виробничий ферментер ФВ-30 об'ємом 2м³. До отриманого розчину при перемішуванні додають 6 %-й розчин сульфатної кислоти (від ДР 3.1.3.) до рН 4,5, стерилізацію проводять при 131°C (0,15 МПа) упродовж 40 хв.

ДР 5.6.2 Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 120 г ампіциліну поміщають у простерилізовану колбу об'ємом 2,5 л, доливають 2 л стерильної дистильованої

води і перемішують до повного розчинення антибіотику, стерилізують холодною стерилізацією крізь мембранні фільтри в асептичних умовах, з розміром пор 0,22 мкм.

ДР 5.6.3 Приготування і стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 12 кг глюкози, наважку поміщають у реактор-збірник Р-21 на 500 л, і через об'ємно-ваговий дозатор Д-20 додають 360 л води, перемішують та піддають стерилізації при 112°C упродовж 30 хв. Після стерилізації проводять мікробіологічний, технологічний та хімічний контроль композиції. Потім насосом Н-22 перекачують у виробничий ферментер ФВ-30 об'ємом 2м³.

ТП 6. Підготовка посівного матеріалу

ТП 6.1. Підтримання колекційної культури

Колекційну культуру *E.coli* BL21 (DE3) зберігають під шаром вазелінового масла за температури +4°C. Всі роботи з колекційною культурою проводять в строго асептичних умовах.

*ТП 6.2. Одержання *E.coli* BL21 (DE3) на агаризованому середовищі*

Колекційну культуру, що зберігається в пробірках під шаром вазелінового масла, розморожують в асептичних умовах і розсівають петлею на чашки Петрі з бульйоном Лурія та ампіциліном і вирощують при температурі 37°C упродовж 14-16 годин.

*ТП 6.3. Вирощування робочої культури *E.coli* BL21 (DE3) на агаризованому середовищі*

Ізольовані колонії від ТП 6.2 в асептичних умовах пересівають петлею у до середовища Лурія, інкубують на роторному шейкері при 37 °C і 200 об / хв протягом 6–8 год. Відбирають попередній посівний матеріал і переносять до основного середовища, інкубують протягом 12–14 год. при 37 °C.

ТП 6.4. Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках

В асептичних умовах у колбу об'ємом 1000 мл вносять простерилізовані: композиція А (від ДР 5.3.1), композиція Б (від ДР 5.3.2) композицію В (від ДР

5.3.3), 40% розчин глюкози (ДР 5.1.1) та розчин мікроелементів (від ДР 5.2.), перемішують і розливають по 250 мл у 7 качалочних колб об'ємом 750 мл. У пробірку з робочою культурою *E.coli* BL21 (DE3) (від ТП 6.3) вносять 5 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини, піпеткою відбирають одержану бактеріальну суспензію і переносять у колбу. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою. Для засіву однієї колби використовують суспензію однієї пробірки. Вирощують на качалках (200 об/хв) при $T = 37^{\circ}\text{C}$ упродовж 4 годин, рН = 6,8.

Після закінчення терміну вирощування вміст качалочних колб з дотриманням правил асептики переносять до засівної колби.

ТП 6.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 20 л

Для вирощування інокуляту у попередньо простерилізований інокулятор об'ємом 20 л ІН-10 вносять 7,2 л композиції А (від ДР 5.4.1), де проходить його стерилізація. Далі у інокулятор в асептичних умовах переносять колби із стерильною композицією Б (від ДР 5.4.2.) та композицією В - сконцентрований 40% розчин глюкози (від ДР 5.4.3.) та розчин мікроелементів (від ДР 5.2.).

Після встановлення оптимального рН 6,8, завдяки гідроксиду натрію та розчину сульфатної кислоти (від ДР 3.2.1. та ДР 3.1.1. відповідно), через засівну колбу вносять посівний матеріал (від ТП 6.4). Включають перемішувач, аерацію, в сорочку інокулятора подають насичену пару. Швидкість перемішування - на початок культивування досягає 300 об/хв, на кінець – 900 об/хв, $T = 37^{\circ}\text{C}$, тривалість культивування – 8 годин, рН = 6,8.

Відбирають пробу 1 раз в середині культивування і здійснюють мікробіологічний, технологічний та хімічний контроль культуральної рідини.

ТП 6.6. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 200 л

Для вирощування інокуляту у попередньо простерилізований інокулятор ІН-15 об'ємом 200 л вносять композицією А у кількості 62 л (від ДР 5.5.1.), композицією Б (від ДР 5.5.2) у кількості 1 л , композицією В (від ДР 5.5.3) у кількості 36 л, а також запасний розчин мікроелементів (від ДР 5.2)

Обов'язковою умовою для культивування культури рН середовища має становити 6,8. Після встановлення оптимального рН, завдяки розчину сульфатної кислоти або гідроксиду натрію (*ДР 3.1.2., ДР 3.2.2. відповідно*)

Після цього в посівний апарат ІН-15 через трубу перетискання вносять посівний матеріал (від *ТП 6.5*). Включають перемішуючий пристрій, аерацію, в сорочку інокулятора подають насичену водяну пару.

Культивування здійснюють при температурі 37°C упродовж 4 год, швидкість перемішування залежить від оптичної щільності клітин, яка повинна становити $OD_{600}=3,8-4,2$, та становить 300-900 об/хв при сталому рівню аерації 1,25 vvm. Потім додатково культивують протягом 4 год.

Кожні 4 год відбирають пробу і здійснюють мікробіологічний, технологічний та хімічний контроль культуральної рідини.

ТП 7. Виробничий біосинтез

ТП 7.1 Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 2м³

Для вирощування інокуляту у попередньо простерилізований ферментер ФВ-30 об'ємом 2м³ вносять композицію А (від *ДР 5.6.1.*) у кількості 630 л, композицію Б (від *ДР 5.6.2*) у кількості 2 л, композицію В(від *ДР 5.6.3*) у кількості 400 л, а також запасний розчин мікроелементів (*від ДР 5.2*)

Обов'язковою умовою для культивування культури рН середовища має становити 6,8. Після встановлення оптимального рН, завдяки розчину сульфатної кислоти або гідроксиду натрію (від *ДР 3.1.3.* та *ДР 3.2.3.*), через трубу перетискання вносять посівний матеріал. У сорочку ферментера подається насичена водяна пара, вмикається перемішуючий пристрій і аерація.

Культивування здійснюють при температурі 37°C упродовж 24 год, Швидкість перемішування залежить від оптичної щільності клітин, яка повинна становити $OD_{600}=3,8-4,2$, та становить 300-900 об/хв при сталому рівню аерації 1,25 vvm, рН = 6,8. Підживлюючий розчин глюкози та солі додають до середовища через 4, 8, 12,16 та 20 год. (від *ДР 4.1, ДР 4.2.*) Розчин індуктору

ПТГ та розчин ампіциліну (від ДР 4.3, ДР 5.6.2) додають один раз всередині культивування на 12 год..

Кожні 8 год відбирають пробу і здійснюють мікробіологічний, технологічний та хімічний контроль культуральної рідини.

Закінчення культивування характеризується найбільшою концентрацією фермента. А саме: за 24 год. культивування нашого продуцента, концентрація ферменту повинна становити 1120 ± 50 мг/л.

РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА СТРЕПТОКІНАЗИ

Упродовж культивування періодично відбирають проби культуральної рідини для мікробіологічного контролю, визначення концентрації біомаси , а також вмісту джерела вуглецю (глюкози) і азоту (гідрофосфату амонію).

Після закінчення ферментації відбирають пробу для визначення концентрації стрептокінази.

7.1. Мікробіологічний контроль

Мікробіологічний контроль чистоти культури проходить в два етапи:

1. Прямий висів на поживні середовища;
2. мікроскопіювання.

Прямий висів здійснюється посівом культуральної рідини до ізольованих колоній на чашки Петрі з м'ясо–пептонним агаром (МПА) для виявлення бактерій та сусло–агаром (СА) – грибів та дріжджів.

Прямий висів. Стерильною піпеткою відбирають 0,1 мл з об'єма проби культуральної рідини і наносять її на поверхню відповідного поживного середовища, що знаходиться в чашці Петрі. Внесену пробу рівномірно розподіляють по поверхні середовища за допомогою шпателя Дригальського. Чашки з посівами завертають у папір та поміщають у термостат для інкубації при температурі 32-34 °С протягом 1-2 діб для МПА. При рості на поживних середовищах розвиваються колонії з рівними краями (S-, гладенька форма) блілого жовтуватого або кремового кольору. (рис. 7.1)

					<i>НУХТ БТЕК 04.02.07 ДР ПЗ</i>			
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дат</i>				
<i>Розробив</i>		<i>Загороднюк Т.Е.</i>			<i>РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА СТРЕПТОКІНАЗИ</i>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
							86	
<i>Керівник</i>		<i>Красінько В.О.</i>				<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Затвердив</i>		<i>Стедніков В.П.</i>						

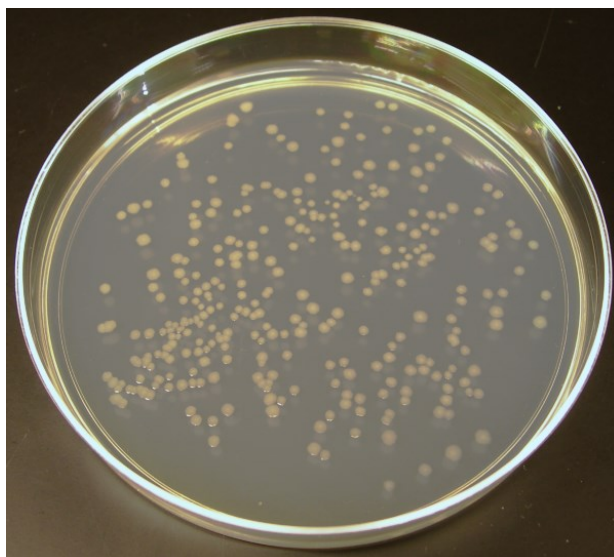


Рис. 7.1. Ріст *E.coli* на поживному середовищі МПА [84]

Мікроскопіювання проводять у світловому мікроскопі з імерсійною системою. Для приготування препарату на чисте знежирене предметне скло, в умовах асептики, стерильною петлею наносять невелику краплину культуральної рідини. Краплю, яка містить мікроорганізми, розподіляють по склу за допомогою бактеріальної петлі. Мазок висушують при кімнатній температурі, обов'язково до повної відсутності вологи. Потім фарбують за грамом. Грам (-) бактерії, при промиванні знебарвлюються. Після промивання розчинником при фарбуванні по Граму додається контрастний червоний барвник, який забарвлює всі грамнегативні бактерії в червоний або рожевий колір. Потім на абсолютно сухий препарат за допомогою скляної палички наносять 1–2 краплини імерсійного масла. Після роботи за допомогою етилового спирту, знімають залишки масла з імерсійного об'єктиву [85]. За відсутності у зразку сторонньої мікробіоти під час мікроскопіювання можна побачити клітини *E.coli*. Ешерихії представляють собою поліморфні прямі або злегка зігнуті палички з заокругленими кінцями середніх розмірів (довжина 2-6 мкм і ширина 0,4-0,6 мкм). Палички розташовуються поодинокі, рідше - попарно. [17]

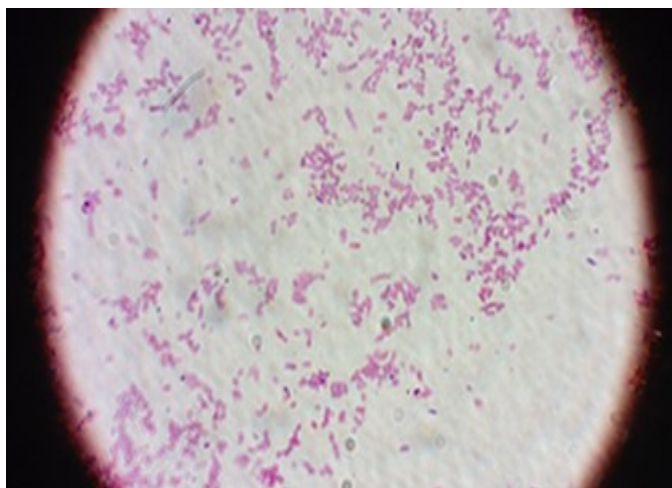


Рис. 7.2. Клітини *Escherichia coli* під мікроскопом [18]

7.2. Показники росту і синтезу цільового продукту

7.2.1 Визначення концентрації біомаси

Оптичний (нефелометричний) метод визначення концентрації біомаси дозволяє швидко і досить точно визначити концентрацію клітин в суспензії або культуральній рідині.

В основі методу лежить вимірювання зменшення кількості світла при його проходженні через суспензію клітин. У певних межах воно обумовлене переважно розсіянням світла клітками і пропорційно їх концентрації.

Живильне середовище для культивування мікроорганізмів, в якій передбачається визначати число клітин по світлорозсіюванню, повинне бути оптично прозорим.

Методика: У пробірки із 9 мл стерильної питної води вносять по 1 мл культуральної рідини, суміш збовтують, а потім вимірюють оптичну густину за допомогою фотоелектроколориметра (ФЕК) або спектрофотометра, вибираючи довжину хвилі (звично в інтервалі 540—650 нм), при якій поглинання світла даною суспензією клітин є мінімальним. Будують калібрувальні криві залежності між величиною світлорозсіювання і числом клітин або сухою біомасою в одиниці об'єму. [86]

Також концентрацію біомаси можуть визначити за допомогою датчику визначення оптичної густини. Безконтактний онлайн датчик, що кріпиться до зовнішньої стінки ферментеру (смотрового люку).

У датчику використовуються інфрачервоні лазери і детектори. Кожна пара лазер-детектор в матриці чутлива до різних діапазонах зміни концентрації біомаси. Має графічний і цифровий дисплей даних з відображенням в режимі реального часу. За допомогою програмного забезпечення можна калібрувати датчик в будь-яких можливих одиницях (г/л, од/мл) [87]

7.2.2. Визначення активності стрептокінази

Активність стрептокінази визначають методом визначення фібринолітичної активності.

Метод визначення загальної фібринолітичної активності стрептокінази базується на вимірюванні часу спонтанного лізису згустку крові.

Пробопідготовка.

50 мл ферментаційного середовища центрифугували з прискоренням 5000 g протягом 15 хвилин при 4 °C для видалення біомаси. Клітини промивали в буфері, що містить 10 mM трис-НСІ, рН 8, 10 mM EDTA і 100 mM хлориду натрію, і вдруге центрифугували. Клітинну масу вдруге суспендованих в буфері, що містить 10 mM трис-НСІ, рН 8, 10 mM EDTA, 100 mM хлориду натрію, 1mM фенілметилсульфонілфторид. До вищевказаного розчину додавали 0,64% лізоциму, перемішували протягом 3 годин при 4 °C і обробляли ультразвуком протягом 30 хвилин. Оброблений ультразвуком розчин центрифугували з прискоренням 5000 g.

До виділеної маси додавали 8M розчин сечовини або 6M розчин гуанідин-НСІ, перемішували протягом 24 годин і центрифугували з прискоренням 5000 g. Супернатант розводили в 100 разів, використовуючи буфер, що містить 0,05 mM трис при рН 7,5, і діалізували, отримуючи при цьому активну рекомбінантну стрептокіназу. [88]

Обладнання та реактиви:

Розчин натрію фосфату двузаміщеного (розчин А). У мірну колбу місткістю 1000 мл поміщають 71,5 г натрію фосфату двузаміщеного, розчиняють у воді і доводять об'єм розчину до мітки тим же розчинником.

Розчин лимонної кислоти (розчин Б). У мірну колбу місткістю 1000 мл поміщають 21 г кислоти лимонної, розчиняють у воді і доводять об'єм розчину до мітки тим же розчинником.

3% розчин бичачого сироваткового альбуміну поміщають в мірну колбу місткістю 100 мл, розводять в фосфатному буфері і доводять об'єм розчину до мітки тим же розчинником. Після приготування розчин витримують протягом 30 хвилин при температурі 20 ° С. Розчин зберігають при кімнатній температурі не більше 7 годин.

Розчин тромбіну людського 20 МО / мл. У флакон, що містить 100 НН людського тромбіну додають 5 мл фосфатного буфера, рН 7,2 і перемішують. Використовують свіжоприготовлений розчин. У період проведення аналізу розчин зберігають на льоду.

Розчин еуглобуліна людини 10 мг / мл. Для приготування розчину використовують ліофілізат еуглобулінової фракції людини, у флаконах з вказаною на етикетці вихідної концентрацією загального білка. У флакон додають такий обсяг фосфатного буфера (рН 7,2), щоб отримати розчин, з концентрацією загального білка 10 мг / мл. Використовують свіжоприготований розчин. В період проведення аналізу розчин зберігають на льоду.

Основний випробуваний розчин (1000 МО / мл). 1 мл відновленого препарату розводять в такій кількості 3% розчину бичачого сироваткового альбуміну, щоб отримати розчин препарату, що містить в 1 мл 1000 МЕ стрептокінази.

Основний стандартний розчин (1000 МО / мл). Вміст флакона робочого стандартного зразка стрептокінази розчиняють в 5 мл води для ін'єкцій протягом 1-2 хвилин.

1 мл стрептокінази, яка була отримана у пробопідготовці розводять у такій кількості 3% розчину сироваткового бичачого альбуміну, щоб отримати розчин, що містить в 1 мл 1000 МО стрептокінази.

Випробування проводять в 4 повторностях, для цього беруть 24 пробірки діаметром 1 см і заввишки 10 см розставляють по 3 пробірки в 8 рядів.

В кожену пробірку вносять по 0,2 мл 3% розчину сироваткового бичачого альбуміну і по 0,1 мл розчин тромбіну людського 20 МО / мл. Пробірки поміщають на водяну баню при 37 ° С і залишають на 2 хвилини для врівноваження температури.

На дно першої пробірки вводять 0,5 мл розчину еуглобуліна людини і перемішують вміст. З інтервалом в 5 сек додають послідовно в решту пробірки 0,5 мл розчину еуглобуліна людини.

Використовуючи секундомір, визначають для кожної пробірки час в сек. між додаванням розчину еуглобуліна людини і лізисом згустку.

Для кожної повторності стандартного розчину стрептокінази будують в логарифмічних координатах калібрувальний графік залежності часу лізису згустку від ступеня розведення. Система вважається придатною, якщо для калібрувальної кривої виконується вимога лінійності, коефіцієнт кореляції не нижче 0,98, а час лізису згустку для максимального розведення повинно бути не більше 20 хвилин.

Активність стрептокінази випробуваного препарату визначають шляхом порівняння з активністю стрептокінази робочого стандартного зразка, використовуючи логарифми часу лізису згустку і статистичні методи. [89,90]

З колориметричних методів кількісного визначення білків в розчині є метод Лоурі.

Метод заснований на реакції білків з солями міді в лужному розчині і відновленні фосфорномолібдено-вольфрамового реактиву (реактив Фоліна) з утворенням забарвлених продуктів, інтенсивність забарвлення яких визначають по оптичній щільності при довжині хвилі 750 нм (червоний світлофільтр) або на спектрофотометрі.

Метод характеризується високою чутливістю 5 - 100 мкг білку/мл.

Реактиви:

Реактив А – 2%-ний розчин Na_2CO_3 в 0,1 Н розчині NaOH ;

Реактив Б – 0,5%-ний розчин $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в 1%-ному розчині двозаміщеного Na -цитрату або K -тартрату;

Реактив 1 – готується перед роботою: змішують 50 мл реактиву А та 1 мл реактиву Б. Придатний для використання протягом 2 діб;

Реактив 2. Реактив Фоліна-Чокальтеу. 10 г $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (перекристалізований) і 2,5 г $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ вміщують в круглодонну колбу на 200 - 250 мл, приливають 70 мл води і добре перемішують. До одержаного розчину додають 5 мл 85%-го розчину H_3PO_4 і 10 мл концентрованої HCl .

Колбу приєднують до зворотного холодильника з шліфом і кип'ятять протягом 10 годин. Потім в розчин додають 15 г Li_2SO_4 , 5 мл води і одну краплю бром. Розчин перемішують і нагрівають для видалення бром. Потім охолоджують, доводять водою до 100 мл, фільтрують і розводять водою до одержання 1 н. розчину. Кислотність визначають титруванням розведеного в 10 разів реактиву 0,1 н. лугом в присутності фенолфталеїну. Після приготування зберігається в темній склянці довгий час.

Для аналізу беруть три пробірки на 10 мл (1-ша контроль, 2-га та 3-тя розчини зі стрептокіназою невідомої концентрації). В дослідні пробірки вносять 0,4 мл розведеного в кілька разів розчину культуральної рідини невідомої концентрації, а в контрольну – 0,4 мл фізіологічного розчину або води. У всі пробірки доливають по 2 мл реактиву 1, перемішують і залишають на 10 хвилин. Потім швидко доливають 0,2 мл реактиву 2, перемішують,

витримують 30 - 40 хв. і вимірюють поглинання проти контрольної проби (1-ша пробірка, де замість білку додавали 0,4 мл води або фізіологічного р-ну) при 750 нм (червоний світлофільтр), кювета 5 мм.

Вміст білку в розчинах невідомої концентрації знаходять за калібрувальною кривою. Для цього величину поглинання для кожної проби знаходять на осі ординат, з'єднують цю точку горизонтальною прямою з калібрувальною кривою і з точки перетину опускають перпендикуляр на вісь абсцис. Точка перетину перпендикуляра з віссю абсцис покаже вміст білку в пробі в мг/мл. [89,90]

7.2.3. Визначення концентрації джерел карбону та азоту

Концентрація глюкози. Концентрацію глюкози визначають глюкозооксидазним методом. Принцип методу полягає в тому, що глюкозооксидаза каталізує перенесення двох водневих атомів з першого вуглецевого атома глюкози на кисень, розчинений в рідкому реагенті. При цьому в ході реакції утворюється в еквімолярних кількостях перекис водню. Тобто концентрація перекису водню, що утворився, точно дорівнює концентрації глюкози в культуральній рідині.

Глюкозооксидазний метод визнаний сьогодні одним з найбільш точних кількісних методів визначення глюкози.

Також можуть застосовуватися й різні біосенсорні системи, наприклад мікроелектронний біосенсор. Біосенсор виробляють на одній підкладці за мікроелектронною технологією і розташовують під єдиною біохімічною матрицею. Для оброблення вихідних сигналів використовується мікропроцесор. Такий підхід до проектування біосенсорів дасть змогу з великою достовірністю визначати концентрацію речовини з урахуванням впливу багатьох побічних факторів, а інтегральні лінійки таких сенсорних комплексів з використанням відповідних біохімічних матриць забезпечать реєстрацію концентрації різноманітних речовин. Амперометрична секція містить ланцюжок планарних

мікроелектродів, за допомогою яких здійснюють вимірювання сили струму і визначають його середнє значення за результатами показників із трьох електродів. А вимірювання кількості тепла, яке виділяється під час біохімічної реакції, виконується тонкоплівковими датчиками температури диференційного типу. Вихідні сигнали інтегрального біосенсора обробляються мікропроцесором за допомогою електронного блока. Для підвищення точності виміру використовують три електроди.

Термометричну секцію було створено на основі двох терморезисторів (термоопорів) із платини у вигляді змійки, де один є вимірювальним, а другий - порівняльним. Вимірювальний термістор та вимірювальні електроди покриті чутливим біохімічним шаром, що його підбирають для кожної вимірюваної речовини.

Шар біологічного матеріалу формують у 3 етапи: наносять полівінілхлорид, потім суміш ферменту з глутаровим альдегідом та нітроцелюлозу. На ділянку детекції біодатчика наносять 2%-й розчин ворфраму в двохлористому етилені. Потім упродовж 20 хв відстоюють, даючи можливість стекти надлишку розчину в атмосфері пари цього розчинника. Після цього конструкцію тримають в пересиченій парі для створення пористості протягом 2–3 хв.

Для визначення концентрації глюкози відбирають 1-2 мл культуральної рідини та додають глюкозооксидазу. Вимірювання проводять в реакторній кюветі, де розміщено інтегральний біосенсор. Термодинамічна рівновага у вимірювальній комірці встановлюється за 2–3 хвилини. Інформація з вимірювального блока надходила до комп'ютера, де оброблення даних здійснювали за спеціальною програмою [91,92].

7.2.4. Визначення амонійного азоту

Концентрація азоту. В середовищі для культивування нашого продуценту джерелом азоту є гідрофосфат амонію.

Метод Несслера: у лужному розчині аміак реагує з тетраїодомеркуратором (II) калію, утворюючи різні жовто-коричневі сполуки, що випадають в осад або (при малих концентраціях) переходять у колоїдні розчини. Вміст азоту, ртуті та йодиду в осаді виражається співвідношенням 1:2:3, проте можлива присутність в осаді та інших сполук ($\text{OHg}_2\text{NH}_2\text{I}$ і ін.).

Деяка невизначеність складу з'єднання, що утворюється, вимагає точного дотримання умов проведення визначення як при аналізі зразку, так і при побудові калібрувального графіка. До таких умов відноситься концентрація лугу. За великого надлишку лугу може відбутися розкладання $\text{NH}_2\text{Hg}_2\text{I}_3$ з утворенням оксиду ртуті.

Для визначення аміаку до 1 мл супернатанту культуральної рідини додають 1 мл реактиву Несслера. Коефіцієнт екстинції вимірюють при довжині хвилі 400-425 нм. Концентрацію аміаку визначають за калібрувальним графіком. Однак, фотометричному визначенню азоту даним методом заважають іони, що випадають в осад у лужному середовищі і утворюють нерозчинні сполуки з йодид-іонами та іонами ртуті (зокрема, магній, який міститься в середовищі для культивування продуцента).

Індофеноловий метод: метод заснований на утворенні барвника індофенолового синього при конденсації аміаку з фенольним реагентом в лужному середовищі за присутності окисників гіпохлориту або гіпоброміту натрію. Цей метод є більш зручним, оскільки утворюється істинний розчин і максимум світлопоглинання утвореної сполуки знаходиться у видимій області спектра. Визначення проводять при довжині хвилі 624 нм [93].

Карта постадійного контролю біосинтезу стрептокінази

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
1	2	3	4	5
Кт 1.1 <i>Очищення повітря від пилу і механічних часток</i>	Повітря на виході з фільтра грубого очищення, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення	E = 80
Кт 1.2 <i>Стиснення повітря</i>	Стиснене повітря, температура, тиск	Технічний манометр і термометр	Після стиснення повітря	P = 0,35 МПа; t = 120–200°C
Кт 1.3 <i>Охолодження повітря та видалення вологи</i>	Охоложене повітря, температура, повітря після видалення зайвої вологи	Термометр технічний, психрометричний метод	Після охолодження повітря, після видалення зайвої вологи	t = 25–30°C; W = 60 %
Кт 1.4 <i>Нагрівання повітря</i>	Нагріте повітря, температура	Термометр технічний, психрометричний метод	Після нагрівання повітря	t = 50°C; W = 50 %
Кт 1.5 <i>Очищення повітря в головному фільтрі</i>	Очищене повітря, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі тонкого очищення	E = 95 %
Кт 1.6 <i>Очищення повітря в індивідуальних фільтрах</i>	Очищене повітря, ступінь очищення, перепад тисків	Перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Під час очистки повітря на індивідуальному фільтрі	E = 99,995 %,
Кх 2.1, 2.3, 2.5 <i>Приготування 6 %-го розчину H₂SO₄ для інокуляторів об'ємом 20, 200 і ферментера об'ємом 2,0 м³</i>	Розчин H ₂ SO ₄ , концентрація кислоти	Кондуктометр	У процесі приготування розчину	C = 6 %

Км, Кх, Кт 2.2, 2.4, 2.6 <i>Приготування 6 %-го розчину NaOH для інокуляторів об'ємом 20, 200 і ферментера об'ємом 2,0 м³</i>	Розчин NaOH, концентрація лугу, тиск і час стерилізації, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль, кондуктометр	Концентрацію лугу визначають перед стерилізацією, тиск визначається безперервно під час стерилізації, відбір проби для мікробіологічного контролю після стерилізації	$\tau = 15$ хв, $C = 6$ %, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.1 <i>Приготування і стерилізація підживлюючого р-ну глюкози</i>	Температура, тиск і час стерилізації, стерильність	Технічний манометр і термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура і тиск визначається безперервно під час стерилізації, відбір проби для мікробіологічного контролю після стерилізації	$P = 0,05$ МПа, $t = 112^{\circ}\text{C}$, $\tau = 30$ хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.2 <i>Приготування та стерилізація підживлюючого розчину солі</i>	Температура, тиск і час стерилізації, стерильність	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура і тиск визначається безперервно під час стерилізації, відбір проби для мікробіологічного контролю після стерилізації	$P = 0,15$ МПа, $t = 131^{\circ}\text{C}$, $\tau = 40$ хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.3 <i>Приготування та стерилізація підживлюючого розчину індуктора ППГ</i>	Розчин ППГ, стерильність	Згідно з паспортом фільтра	Після проходження через фільтр	Розмір пор 0,22 мкм

Продовження таблиці 7.1

<p>Км, Кх, Кт 4.1.1,4.1.2 Приготування і стерилізація концентрованого розчину глюкози для колб на качалках та для посівного апарату об'ємом 20 л</p>	<p>Розчин глюкози, концентрація, тиск і час стерилізації, стерильність</p>	<p>Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль, кондуктометр</p>	<p>Концентрацію глюкози визначають перед стерилізацією, тиск визначається безперервно під час стерилізації, відбір проби для мікробіологічного контролю після стерилізації</p>	<p>$P = 0,05$ МПа, $t = 112^{\circ}\text{C}$, $\tau = 30$ хв, $C = 40\%$, відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт, Км 4.2 Приготування і стерилізація запасного розчину мікроелементів для колб на качалках, для посівних апаратів об'ємом 20 л, 200л, та ферментера об'ємом 2м3</p>	<p>Температура, тиск і час стерилізації, стерильність</p>	<p>Термометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура і тиск визначається безперервно під час стерилізації, відбір проби для мікробіологічного контролю після стерилізації</p>	<p>$P = 0,15$ МПа, $t = 131^{\circ}\text{C}$, $\tau = 40$ хв, відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт, Км 4.3.1 Приготування і стерилізація композиції А</p>	<p>Композиція Б, температура, тиск і час стерилізації, стерильність</p>	<p>Технічний манометр і термометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура і тиск визначається безперервно під час стерилізації, відбір проби для мікробіологічного контролю після стерилізації</p>	<p>$P = 0,15$ МПа, $t = 131^{\circ}\text{C}$, $\tau = 40$ хв, відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт, Км 4.3.2 Приготування і стерилізація композиції Б</p>	<p>Композиція Б, стерильність</p>	<p>Згідно з паспортом фільтра</p>	<p>Після проходження через фільтр</p>	<p>Розмір пор 0,22 мкм</p>

Продовження таблиці 7.1

Кт, Км 4.3.3 <i>Приготування і стерилізація композиції В</i>	Композиція В, температура тиск і час стерилізації, стерильність	Технічний манометр і термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура і тиск визначається безперервно під час стерилізації, відбір проби для мікробіологічного контролю після стерилізації	$P = 0,15 \text{ МПа}$, $t = 131^{\circ}\text{C}$, $\tau = 40 \text{ хв}$, відсутність мікробіоти
Кт, Км 5.1.1 <i>Приготування і стерилізація композиції А</i>	Композиція А, температура, тиск і час стерилізації, стерильність	Технічний манометр і термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура і тиск визначається безперервно під час стерилізації, відбір проби для мікробіологічного контролю після стерилізації	$P = 0,15 \text{ МПа}$, $t = 131^{\circ}\text{C}$, $\tau = 40 \text{ хв}$, відсутність мікробіоти, $\text{pH}_{\text{перед стр.}} = 4,5$
Кт, Км 5.1.2 <i>Приготування і стерилізація композиції Б</i>	Розчин ампіциліну, стерильність	Згідно з паспортом фільтра	Після проходження через фільтр	Розмір пор 0,22 мкм
Кт, Км 6.1.1 <i>Приготування і стерилізація композиції А</i>	Композиція А, температура, тиск і час стерилізації, стерильність, рН	Технічний манометр і термометр, годинник, рН-метр, мікробіологічний контроль	Температура і тиск визначається безперервно під час стерилізації, відбір проби для мікробіологічного контролю після стерилізації, рН визначається перед стерилізацією і після нормалізації	$P = 0,15 \text{ МПа}$, $t = 131^{\circ}\text{C}$, $\tau = 40 \text{ хв}$, відсутність мікробіоти, $\text{pH}_{\text{перед стр.}} = 4,5$

Продовження таблиці 7.1

Кт, Км 6.1.2 <i>Приготування і стерилізація композиції Б</i>	Розчин ампіциліну, стерильність	Згідно з паспортом фільтра	Після проходження через фільтр	Розмір пор 0,22 мкм
Кт, Км 6.1.2 <i>Приготування і стерилізація композиції Б</i>	Розчин ампіциліну, стерильність	Згідно з паспортом фільтра	Після проходження через фільтр	Розмір пор 0,22 мкм
Кт, Км 6.1.3 <i>Приготування і стерилізація композиції В</i>	Температура, тиск і час стерилізації, стерильність	Технічний манометр і термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура і тиск визначається безперервно під час стерилізації, відбір проби для мікробіологічного контролю після стерилізації	$P = 0,05$ МПа, $t = 112^{\circ}\text{C}$, $\tau = 30$ хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 7.1.1 <i>Приготування і стерилізація композиції А</i>	Композиція А, температура, тиск і час стерилізації, стерильність, рН	Технічний манометр і термометр, годинник, рН-метр, мікробіологічний контроль	Температура і тиск визначається безперервно під час стерилізації, відбір проби для мікробіологічного контролю після стерилізації, рН визначається перед стерилізацією і після нормалізації	$P = 0,15$ МПа, $t = 131^{\circ}\text{C}$, $\tau = 40$ хв, відсутність мікробіоти, $\text{pH}_{\text{перед стр.}} = 4,5$
Кт, Км 7.1.2 <i>Приготування і стерилізація композиції Б</i>	Розчин ампіциліну, стерильність	Згідно з паспортом фільтра	Після проходження через фільтр	Розмір пор 0,22 мкм

Продовження таблиці 7.1

Кт, Км 7.1.3 <i>Приготування і стерилізація композиції В</i>	Температура, тиск і час стерилізації, стерильність	Технічний манометр і термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура і тиск визначається безперервно під час стерилізації, відбір проби для мікробіологічного контролю після стерилізації контролю після стерилізації	$P = 0,05 \text{ МПа}$, $t = 112^{\circ}\text{C}$, $\tau = 30 \text{ хв}$, відсутність мікробіоти
Кт, Км 8.1 <i>Підтримання колекційної культури</i>	Колекційна культура <i>E.coli</i> BL21 (DE3) Температура, відсутність сторонньої мікробіоти	Термометр технічний, мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль проводять кожен місяць	$t = -40^{\circ}\text{C}$, $\tau = 3-4 \text{ місяці}$, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 8.2 <i>Одержання робочої культури на агаризованих середовищах</i>	Колекційна культура <i>E.coli</i> BL21 (DE3) Морфологічна однорідність, відсутність сторонньої мікробіоти, відсутність неконтрольованих мутацій	Годинник, термометр технічний, мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль проводять кожні 4 годин	$t = 37^{\circ}\text{C}$, $\tau = 14-16 \text{ годин}$, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 8.3 <i>Вирощування культури на агаризованих середовищах</i>	Колекційна культура <i>E.coli</i> BL21 (DE3) Морфологічна однорідність, відсутність сторонньої мікробіоти, відсутність неконтрольованих мутацій	Годинник, термометр технічний, мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль проводять кожні 4 годин	$t = 37^{\circ}\text{C}$, $\tau = 12-14 \text{ годин}$, відсутність сторонньої мікробіоти

Продовження таблиці 7.1

Кх, Кт, Км 8.4 <i>Вирощування культури в колбах на качалках</i>	Посівний матеріал, Температура, тривалість вирощування, частота обертів, відсутність сторонньої мікробіоти, відсутність неконтрольованих мутацій	Термометр, технічний годинник, технічний тахометр, датчик рН, мікробіологічний контроль	Температура контролюється і підтримується і обертання підтримується автоматично	$t = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 4$ год, $\omega = 200$ об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти, концентрація біомаси = 80мг/л
Кх, Кт, Км 8.5 <i>Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 0,02 м³</i>	Посівний матеріал, температура, тривалість вирощування, рН, мікробіологічна чистота культури, морфологічна відповідність організмів, концентрація біомаси	Годинник, тахометр, датчик температури, датчик рН, мікроскоп	Температура, рН і швидкість обертання контролюються протягом всього часу вирощування, відбір проб культуральної рідини – кожні 4 годин, мікробіологічний контроль	Швидкість перемішування - на початок культивування досягає 300 об/хв, на кінець – 900 об/хв, $t = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 8$ годин, рН = 6,8. відсутність сторонньої мікробіоти, концентрація біомаси = 224мг/л
Кх, Кт, Км 8.6 <i>Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 0,20 м³</i>	Посівний матеріал, температура, тривалість вирощування, рН, мікробіологічна чистота культури, морфологічна відповідність організмів, концентрація біомаси	Годинник, тахометр, датчик температури, датчик рН, мікроскоп, мікробіологічний контроль	Температура, рН і швидкість обертання контролюються протягом всього часу вирощування, відбір проб культуральної рідини – кожні 4 годин, мікробіологічний контроль	Швидкість перемішування - на початок культивування досягає 300 об/хв, на кінець – 900 об/хв, $t = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 4$ годин, рН = 6,8. відсутність сторонньої мікробіоти, концентрація біомаси = 722 мг/л

Закінчення таблиці 7.1

<p>Кх, Кт, Км 6 <i>Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 2,0 м³</i></p>	<p>Культуральна рідина, температура, тривалість вирощування, рН, мікробіологічна чистота культури, активність стрептокінази</p>	<p>Годинник, тахометр, датчик температури, датчик рН, мікроскоп,</p>	<p>Температура і рН контролюються протягом всього часу вирощування, відбір проб культуральної рідини – кожні 12 годин</p>	<p>Швидкість перемішування - на початок культивування досягає 300 об/хв, на кінець – 900 об/хв, t = 37 °С, τ = 24 годин, рН = 6,8. C стрептокінази = 1120 ± 50 мг/л</p>
---	---	--	---	--

РОЗДІЛ 8. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ

Сучасний період розвитку людської цивілізації характеризується підвищеним техногенним навантаженням на навколишнє природне середовище і, як наслідок, зростанням ступеня загрози для життя та здоров'я людини. Наразі промисловий та фармацевтичний сектори в Україні звузилися, але це зовсім не означає вирішення всіх проблем щодо звалищ відходів, утворених внаслідок виробництва підприємств, та появу ефективного їх адміністративно-правового регулювання. У цілому відходи поділяються на дві основні групи: відходи виробництва (промислові відходи) та відходи споживання (відходи вжитку). До відходів виробництва належать матеріали, речовини, вироби, які утворилися в процесі виробництва продукції, виконання робіт чи надання послуг та не знаходять застосування на певному підприємстві (організації), або ті, які повністю чи частково втратили свої споживчі властивості. На них припадає близько 90 % загальної маси відходів, накопичених в Україні. Відходи споживання містять у собі вироби, матеріали, речовини, які втратили повністю або частково свої споживчі властивості у процесі масового чи особистого споживання.

Взагалі, чим більше відходів утворюється в процесі виробництва, тим вища собівартість готових виробів і тим більша ймовірність забруднення навколишнього середовища. Витрати виробництва скорочуються, якщо підприємства організують використання (переробку) відходів.

					<i>НУХТ БТЕК 04.02.07 ДР ПЗ</i>			
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дат</i>	<i>РОЗДІЛ 8. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ</i>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розробив</i>	<i>Загороднюк Т.Є.</i>						105	
<i>Керівник</i>	<i>Красінько В.О.</i>					<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Затвердив</i>	<i>Стадніков В.І.</i>							

8.1. Аналіз технологічної схеми виробництва цільового продукту на місця емісії твердих, рідких та газоподібних відходів

Технологія отримання стрептокінази включає доферментаційні допоміжні роботи (санітарна підготовка виробництва, приготування і стерилізація титрувальних агентів, приготування і стерилізація ПС для одержання посівного матеріалу, приготування і стерилізація ПС для виробничого біосинтезу стрептокінази та безпосередньо ферментаційні технологічні процеси (одержання ПС, біосинтез ферменту) та післяферментаційні технологічні процеси - виділення цільового продукту (ультрафільтрація, осадження органічним розчинником (ізопропанолом), елюація матеріалу, випарювання, ліофілізація).

Санітарна підготовка виробництва. Даний етап включає щоденне і генеральне прибирання приміщення із застосуванням миючих засобів «Dezaldum 20» і «Секусепт Актив». Після обробки відпрацьований мийний розчин надходить до каналізації. Миття резервуарів обладнання здійснюють за допомогою СІР-мийки із застосуванням засобу «Каустична сода». Після обробки промивна вода надходить до каналізації, а відпрацьований розчин «Каустичної соди» повторно використовується для обробки у СІР-мийці.

Передбачаємо, що даний етап є місцем емісії невеликих об'ємів рідких відходів.

Приготування і стерилізація розчинів для титрування. Етап передбачає підготовку 6% розчину сульфатної кислоти та 6% розчину гідроксиду натрію. Розчини подаються для регуляції рівня рН до 6,8 на стадіях отримання ПС в інокуляторах та на стадії виробничого біосинтезу в ферментері. Рідкі відходи на даному етапі виробництва можуть утворюватися лише у випадку невідповідності титрувальних розчинів нормативним показникам і рівню асептики.

Тому відходи титрувальних агентів не враховуємо у загальному об'ємі рідких відходів.

Приготування і стерилізація ПС для отримання посівного матеріалу і виробничого біосинтезу.

На даному етапі можливо виявити невідповідність сировини заявленим нормам із наступним її відбракуванням. Тверді відходи даного етапу виробництва представлено пакувальними матеріалами від сировини для приготування ПС.

Передбачаємо, що даний етап є місцем емісії твердих відходів.

Підготовка посівного матеріалу. На даному етапі ми отримуємо посівний матеріал за допомогою інокуляторів, щоб використовувати його на наступних стадіях виробництва.

Тому відходи від посівного матеріалу не враховуємо у загальному об'ємі рідких відходів.

Продуцентом є – рекомбінантна *E. coli* є факультативним анаеробом, під час культивування необхідно забезпечити аерацію ПС. Відповідно, у процесі культивування утворюється великий об'єм відпрацьованого повітря

Передбачаємо, що даний етап є місцем емісії великих об'ємів газоповітряних відходів.

Виробничий біосинтез. На даному етапі ми отримуємо культуральну рідину, у якій накопичується наш цільовий продукт – стрептокіназа. Оскільки культуральна рідина далі надходить до збірника для виділення цільового продукту, рідкі відходи на даному етапі не враховуємо. Також на цьому етапі ми використовуємо повітря для культивування нашого мікроорганізму.

Передбачаємо, що даний етап є місцем емісії великих об'ємів газоповітряних відходів.

Осадження ізопропанолом. Даний етап передбачає осадження культуральної рідини органічним розчинником - ізопропанолом. Осадження білків здійснюється при порівняно низькій його концентрації (52 –53%),

Передбачаємо, що даний етап не є місцем емісії рідких відходів.

Центрифугування, промивання та ультрафільтрація. Після осадження розчин центрифугують для відділення осаду ферменту, що утворився. Після процесу центрифугування, осад, що утворився, подають на промивання та розчинення водою. Промивання осаду проводиться з метою видалення фільтрату шляхом витіснення його іншою рідиною, а також знизити концентрацію органічного розчинника .

Рідкі відходи даного етапу – ізопропанол, промивні води. *Передбачаємо, що даний етап є місцем емісії рідких відходів.*

Елюація матеріалу. Оскільки теоретично розрахована ізоелектрична точка фрагмента стрептокінази СК1–50 становить 4,58, а СК1–60 — 5,05, то для розчинення тілець включення й нанесення на хроматографічну колонку було обрано 20 мМ натрійцитратний буфер, що містить 8 М сечовини і має рН 3,0. За таких умов обидва фрагменти були позитивно заряджені і зв'язувалися із сорбентом. Елюацію матеріалу, що зв'язався із сорбентом, здійснюють в тому самому буфері лінійним градієнтом NaCl (0–1 М).

Передбачаємо, що даний етап є місцем емісії рідких відходів.

Сушіння стрептокінази. Даний етап передбачає виділення залишкової вологи з продукту шляхом сушіння стрептокінази за рахунок ліофілізації. Сушіння проводять до отримання вмісту сухих речовин у готовому продукті – не менше 96%. Процес супроводжується виділенням газу-носія – відпрацьованого повітря, який містить аерозоль механічних часток від сухого продукту.

Передбачаємо, що даний етап є місцем емісії газоподібних відходів.

8.2 Перспективи впровадження системи екологізації виробництва

Розвиток економіки формує екологічні проблеми: виснаження озонового шару Землі, зміна клімату внаслідок «парникового ефекту», неабияке забруднення та погіршення якості атмосферного повітря та водойм. За розрахунками вчених-фахівців, забруднення навколишнього середовища завдає значний економічний збиток національним економікам майже всіх країн світу. За орієнтовними розрахунками, щорічні збитки від деградації довкілля оцінюються в розвинених країнах - 0,4-2% ВВП, в країнах Східної Європи - 3-5, у країнах СНД - 6-15, зокрема в Україні - 10-15 % ВВП [94].

Сучасна техніко-технологічна база промисловості не має змоги здійснити на виробництвах глибоке очищення повітря і води. На мою думку, розробка нових технологічних процесів, на основі яких може бути створена безвідходне виробництво, забезпечить не тільки високі техніко-економічні показники, а й комплексне використання природних ресурсів. Однак, за технічних і економічних причин перехід до безвідходної технології відразу здійснити неможливо. Достеменний шлях екологізації технологій на виробництві - це поступовий перехід перш за все до маловідходних, а згодом - до безвідходних технологій. Тим самим можуть бути досягнуті раціональне користування ресурсами та охорона довкілля.

8.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів

Для очищення стічних вод застосовують механічні, хімічні, фізико-хімічні та біологічні способи. Для обробки стічних вод різних промисловостей, концентрація забруднюючих речовин в яких не перевищує 2 000 мг O_2 /л за хімічним споживанням кисню - найчастіше застосовують схему повного біологічного аеробного очищення із використанням аеротенків як основної очисної споруди. [95]

Аеротенки дозволяють отримувати високий ступінь очищення стічних

вод з доведенням вмісту органічних речовин в очищених стічних водах за Біохімічним споживанням кисню до 15 мг/л. Вилучення з очищуваної рідини розчинених або завислих забруднень активним мулом відбувається значно швидше, ніж наступне їх окислювання. Розподіл на такі стадії процесу очищення має умовний характер, оскільки практично неможливо розмежувати ці фази, тому доцільною є організація роздільного перебігу цих стадій процесу в умовах, оптимальних для кожної з них, що забезпечить підвищення ефективності роботи аеротенків у цілому.

Технологічна сутність такої модифікації полягає у тому, що після вилучення забруднень зі стічної води безпосередньо у аеротенках активний мул з накопиченими в ньому забрудненнями відокремлюється від очищеної води й подається не в аеротенк, а в спеціальну аераційну споруду, так званий регенератор, у якому активний мул аерується протягом певного часу без стічної рідини. У регенераторі мул звільняється від накопичених ним в аеротенку забруднень і відновлює свою метаболічну активність. Регенерований мул направляють потім з регенератора безпосередньо у аеротенк для нового контакту з очищуваною рідиною і повторення циклу вилучення з неї забруднень. [96]

Також можемо розглянути інший метод очищення - мембранні біореактори (МБР) давно загальновідомі як обладнання, що дозволяє досягати на практиці еталонного рівня очищення, з майже нульовими значеннями концентрації забруднюючих речовин, що дозволяють забезпечити найвищі стандарти якості в одному ступені очисних споруд. Забезпечуючи можливість підтримки дуже високої дози мулу, МБР потребують мінімальної площі, дозволяючи розміщувати їх на дуже обмежених майданчиках.

Очищення стічних вод виробництва стрептокінази здійснюють за допомогою мембран Alfa Laval MBR. Мембрани є ключовою частиною очисних споруд MBR та очищення промислових стічних вод. Мембрани виготовлені з хлоростійкого PVDF і спеціально оптимізовані для

використання у стічних водах.



Рис 8.1. Схема очищення стічних вод [97]

Мембрани забезпечують абсолютний бар'єр для бактерій, мікропластиків та деяких інших забруднювачів, а очищена вода гарантовано відповідає вимогам щодо повторного використання води або екологічно відповідального скиду. Такі установки можна використовувати, якщо площа виробництва досить мала, тому що установки досить компактні, мають невеликі габаритні розміри.[97]

8.2.2. Система знешкодження та утилізації твердих відходів

На даному виробництві досить небагато твердих відходів : тара від миючих засобів та компонентів ПС, їх попередньо сортують і відправляють до пунктів прийому вторсировини або ж можемо використати установку ЕкоФорт, що розроблялася як обладнання для переробки та утилізації відходів, яка задовольняє наступні вимоги:

- Мінімальна кількість викидів у навколишнє середовище у процесі утилізації відходів.
- Найбільш повна утилізація відходів.
- Виробництво максимум цінних продуктів, які є результатом переробки або утилізації для їхньої подальшої реалізації або

використання для вирішення внутрішніх завдань.

Метод, який застосовується у роботі установки – низькотемпературний піроліз. Завдяки цьому при роботі такої установки, як обладнання обробки відходів ЕкоФорт, органічні речовини розкладаються під дією високої температури в середовищі, в якому немає повітря.



Рис 8.2. Установка ЕкоФорт [98]

Ця установка також може служити як обладнання подрібнення відходів.

Це дуже корисно під час переробки пластикових відходів. Після подрібнення продукт можна використовувати знову, що значно економить кошти на нові матеріали. [98, 99]

8.2.3. Система знешкодження газоповітряних викидів

Для очищення викидів від шкідливих речовин використовуються механічні, фізичні, хімічні, фізико-хімічні та комбіновані методи.

- Механічні методи базуються на використанні сил ваги (гравітації), сил інерції, відцентрових сил, принципів сепарації, дифузії, захоплення тощо.

- Фізичні методи базуються на використанні електричних та електростатичних полів, охолодження, конденсації, кристалізації, поглинання.

- У хімічних методах використовуються реакції окислення, нейтралізації, відновлення, каталізації, термоокислення.
- Фізико-хімічні методи базуються на принципах сорбції (абсорбції, адсорбції, хемосорбції), коагуляції та флотації.

Утилізацію газоповітряних відходів на нашому виробництві можна здійснювати фізико-хімічним методом. Методи очищення викидів від газоподібних речовин за характером фізико-хімічних процесів з очищуваними середовищами поділяються таким чином:

- промивання викидів розчинниками, що не сполучаються із забруднювачами (метод абсорбції);
- промивання викидів розчинами, що вступають в хімічне з'єднання з забруднювачами (метод хемосорбції);
- поглинання газоподібних забруднювачів твердими активними речовинами (метод адсорбції);
- поглинання та використання каталізаторів;
- термічна обробка викидів;
- осаджування в електричних та магнітних полях;
- виморожування.

Метод абсорбції базується на розділенні газоповітряної суміші на складові частини шляхом поглинання шкідливих компонентів абсорбентом. В якості абсорбентів вибирають рідини, здатні поглинати шкідливі домішки. Для видалення з викидів аміаку, хлористого та фтористого водню використовується вода. Один кілограм води здатен розчинити сотні грамів хлористого водню та аміаку. Для здійснення процесу очищення газових викидів методом абсорбції застосовуються плівкові, форсункові, трубчасті апарати - абсорбери.

Забруднений повітряний потік контактує з рідким розчинником, проходячи через насадкову колону, розпилюючи рідини, або барботуючи газ через шар абсорбованої рідини. Залежно від реалізації способу контакту "газ-

рідина" розглядають такі види очисних установок: насадні башти; форсункові та відцентрові скрубери; скрубери Вентурі; барботажно-пінні скрубери; тарілчасті скрубери та інші очисні установки.



Рис 8.3. Схема башти-абсорбера: 1 — вхідний патрубок для загазованого повітря; 2 — патрубок для подавання рідини; 3 — вихідний патрубок для відведення очищеного повітря; 4 — розбризкувач; 5 — шар рідини з насадкою; 6 — сітка; 7 — вихідний патрубок для відведення забрудненої води.

В абсорбер через патрубок 1 надходить загазоване повітря з максимальним парціальним тиском, барботує через шар рідини 5 (у вигляді бульбашок) і виходить через патрубок 3 з мінімальним парціальним тиском. Погливна рідина протитечією надходить в апарат через розбризкувач 4 і виходить через патрубок 7. [100,101]

8.2.4. Заходи щодо зменшення об'ємів відходів

Основними заходами щодо зменшення і контролю рівня негативного

впливу вироблених відходів є:

- ретельне регулювання робіт, пов'язаних із забрудненням і порушенням навколишнього середовища;
- організація системи збору, транспортування та захоронення відходів, за винятком забруднення ґрунту стічними водами виробництва;
- проведення постійних моніторингових спостережень;
- організація виробничої діяльності з утримання підприємства з акцентом на відповідальність персоналу і підрядників за порушення техніки безпеки і правил охорони навколишнього середовища;
- нормуванням утворення відходів;
- розробкою та впровадженням безвідходних та маловідходних технологій;
- впровадженням енергозберігаючих технологій;
- використанням відходів (їх переробкою чи застосуванням як сировини на іншому виробництві);
- знешкодженням, знищенням відходів;
- розміщенням відходів, у тому числі небезпечних.

Нормування утворення відходів. Цей процес полягає у розробці для різних технологічних операцій нормативів (встановлених кількостей) утворення відходів конкретного виду при виробництві одиниці продукції або під час обслуговування одиничного об'єкта.

Розробка та впровадження маловідходних та безвідходних технологій. Це один із найефективніших і перспективних способів зниження частки відходів, що припадають на одиницю продукції, що випускається. У ряді країн цей спосіб скорочення обсягів відходів розглядається як стратегічний, спрямований одночасно на раціональне використання природних ресурсів та охорону навколишнього середовища. Проте жодне виробництво взагалі без відходів принципово неможливе. Тому термін «безвідходна технологія» відносять до процесів виробництва, за яких уся сировина та

енергія використовуються максимально раціонально та комплексно.

Впровадження енергозберігаючих технологій. Витрати енергію і паливо становлять 15—20 % собівартості продукції підприємств. Тому використання тепла газів для економії теплової та електричної енергії сприяє заощадженню природних ресурсів та зниженню собівартості готової продукції.

Використання відходів (їх переробка чи застосування як сировини на іншому виробництві). Відходи все активніше використовують для виробництва товарів (продукції), виконання робіт, надання послуг або отримання енергії (наприклад, використання відходів як паливо, добрива, будматеріали, сировину інших виробництв).

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Goyal D., Sahni G., Sahoo D. K., Enhanced production of recombinant streptokinase in *Escherichia coli* using fed-batch culture / *Bioresource technology*. – 2009. – Т. 100. – №. 19. – С. 4468-4474
2. Пащенко С. М., Резніченко Г. І., Самсонова В. В., Бутаєв О. В., Макієнко, Т.С., Резніченко Н. Ю., та ін. Ефективність застосування препарату «дістрептаза» для профілактики післяопераційних гнійно-септичних ускладнень у хворих на рак товстого кишечника / *Сучасні медичні технології*.- №4 – 2020. УДК:616.345-006-06:617-002.3]-085
3. Полион, Ю. Н. "Опыт применения Дистрептазы в лечении мужского бесплодия."// *Здоровье мужчины*.- 1- 2012. - 46-48.
4. Assiri A. S. et al. Production of recombinant streptokinase from *Streptococcus pyogenes* isolate and its potential for thrombolytic therapy // *Saudi medical journal*. – 2014. – Т. 35. – №. 12. – С. 1482.
5. Nguyen S. L. T., Quyen D. T., Vu H. D., Highly effective renaturation of a streptokinase from *Streptococcus pyogenes* DT7 as inclusion bodies overexpressed in *Escherichia coli* // *Biomed research international*. – 2014. – Т. 2014.
6. Kotb E., *Fibrinolytic bacterial enzymes with thrombolytic activity* // *Fibrinolytic Bacterial Enzymes with Thrombolytic Activity*. – Springer, Berlin, Heidelberg-2012. - С. 1-74. /18.
7. *Enzymes for Research, Diagnostic and Industrial Use* [Електронний ресурс] // Режим доступу: https://www.creative-enzymes.com/similar/sk_654.html
8. Резніченко Г. И., и др., Эффективность Дистрептазы в профилактике послеоперационных осложнений у женщин при экстирпации матки / *Здоровье женщины*, -2012.- №1: 153-153.
9. Самсонова В.В., та ін. Застосування Дістрептази у жінок із позаматковою вагітністю та апоплексією яєчника / *Редакционная коллегия*. – 2006.- с. 60.

10. Чайка Г. В., Яремчук, Л. В., Каретна А. О., Оптимізація лікування та реабілітації репродуктивної функції жінок з гіперплазією ендометрія на тлі запальних захворювань органів малого тазу / Вісник Вінницького національного медичного університету. – 2017.- 21, № 1 (2): 302-306.
11. Vyas V. V., et al. Process for the intracellular over-production of streptokinase using genetically engineered strain of E. coli : пат. 7189557 США. – 2007.
12. Виас В.В., Раджамохан Рамандип Г., Дикшит К.Л. Способ продуцирования стрептокиназы с использованием генетически модифицированного escherichia coli/ патент на изобретение /№RU 2333241 С2 – Росія -2008р.
13. Нестерова К.М., Огурцов О.М Розробка біотехнології отримання препарату рекомбінантної стрептокінази / XIII Міжнародна науково-практична конференція магістрантів та аспірантів - 2019р.
14. McArthur J. D., McKay F. C., Ramachandran V., Shyam P., et al. Allelic variants of streptokinase from Streptococcus pyogenes display functional differences in plasminogen activation / The FASEB journal / -2008.- 22(9), 3146-3153.
15. Zia M. A., et al. Improved streptokinase production; uv irradiation of streptococcus equisimilis / Professional Medical Journal. – 2015. – Т. 22. – №. 5.
16. Arshad A., et al. Enhanced Production Of Streptokinase By Chemical Mutagenesis Of Streptococcus agalactiae EBL-20 / Brazilian Archives of Biology and Technology. – 2019. – Т. 62.
17. Литусов Н.В. Эшерихии. Иллюстрированное учебное пособие. – Екатеринбург: Изд-во УГМА, 2016. - 36 с. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: Эшерихии : иллюстрированное пособие (usma.ru)

18. Morphology and culture characteristics of Escherichia Coli (E.coli) [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://paramedicsworld.com/escherichia-coli/morphology-culture-characteristics-of-escherichia-coli/medical-paramedical-studynotes>
19. Кишечная палочка [Електронний ресурс] – Режим доступу: https://vlab.fandom.com/ru/wiki/%D0%9A%D0%B8%D1%88%D0%B5%D1%87%D0%BD%D0%B0%D1%8F_%D0%BF%D0%B0%D0%BB%D0%BE%D1%87%D0%BA%D0%B0
20. Кременчуцький Г.М., Крушинська Т.Ю., та ін. Практичні заняття з методичної мікробіології, вірусології та імунології - Дніпропетровськ: ДДМА -2010. – 174с.
21. Кишкова паличка (ешеріхіоз). Забруднення води кишковою паличкою [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://nefertiti26.ru/uk/kishechnaya-palochka-esherihioz-zagryaznenie-vody-kishechnoi-palochkoi/>
22. Хоулт Дж., и др., Определитель бактерий Берджи, в 2-х томах; Изд-во: Мир. -1997.- с. 210-224.
23. Міністерство Охорони Здоров'я України / Вінницький Національний Медичний Університет Ім.М.І.Пирогова - Методична розробка для самостійної роботи студентів при підготовці до практичного заняття [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://www.vnmu.edu.ua/downloads/obstetrics1/20141014-141921.doc>
24. Мамчур, В. Й.; Дронов, С. М. Комбіновані препарати у локальній терапії інфекційних вульвовагінітів–пріоритетний напрямок сьогодення / Репродуктивне здоров'я жінки. -2021.- 4: 83-92.
25. Запальні захворювання жіночих статевих органів, що передаються статевим шляхом. Симптоми, лікування. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.meddiagnostica.com.ua/uk/zapalni-zakhvoryuvannya-zhinochih-statevih-organiv/>

26. Запальні захворювання жіночих статевих органів. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.bsmu.edu.ua/blog/4023-zapalni-zahvoryuvannya-zhinochih-statevih-organiv/>
27. МОЗ України. Уніфікований клінічний протокол первинної, вторинної (спеціалізованої), третинної (високоспеціалізованої) медичної допомоги «Планування сім'ї». [Електронний ресурс] – режим доступу: https://www.dec.gov.ua/wp-content/uploads/2019/11/2014_59_ukpmd.pdf
28. Вікова структура населення (1989-2021). [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.lv.ukrstat.gov.ua/dem/piramid/all.php>
29. Ск-сд, стрептокіназа-стрептодорназа. [Електронний ресурс] – режим доступу: [https://likicontrol.com.ua/%D1%96%D0%BD%D1%81%D1%82%D1%80%D1%83%D0%BA%D1%86%D1%96%D1%8F/?\[31060\]](https://likicontrol.com.ua/%D1%96%D0%BD%D1%81%D1%82%D1%80%D1%83%D0%BA%D1%86%D1%96%D1%8F/?[31060])
30. Тихомиров, А. Л. Кандидозний вульвовагинит: взгляд на проблему / Гинекология. – 2005. – Т. 7. – № 1. – С. 29-34.
31. Хиць А.Р Вульвовагінальний кандидоз: сучасні рекомендації з менеджменту/ Український медичний часопис – 2021. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.umj.com.ua/article/209685/vulvovaginalnij-kandidoz-suchasni-rekomendatsiyi-z-menedzhmentu>
32. Корнацька А.Г., Вовк І.Б., Чубей Г.В. Запальні захворювання органів малого таза, спричинені інфекціями, що передаються статевим шляхом // Здоров'я України. – 2012. – № 4. – С. 38–39.
33. Дістрептаза Дістрепт (Distreptaza® Distrept) [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://compendium.com.ua/dec/270174/>
34. Мінухін В.В., Коваленко Н.І., Замазій Т.М., Родина кишкових бактерій / метод. вказ. з дисципліни "Мікробіологія, вірусологія та імунологія з мікробіологічною діагностикою" до практичних занять для студентів-бакалаврів III–IV курсу за спеціальністю "Лабораторна діагностика" /– Харків: ХНМУ, 2014. – 44 с

<http://repo.knmu.edu.ua/bitstream/123456789/5866/1/%D0%9C%D0%B8%D0%BD%D1%83%D1%85%D0%B8%D0%BD%20%D0%9C%D0%9E%D0%94%D0%A3%D0%9B%D0%AC%203%20%D1%87%202%20%D1%83%D0%BA%D1%80%20%E2%84%9614-3122.pdf>

35. Philip P. et al. Parallel substrate supply and pH stabilization for optimal screening of E. coli with the membrane-based fed-batch shake flask //Microbial cell factories. – 2018. – Т. 17. – №. 1. – С. 1-17. <https://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12934-018-0917-8>
36. Люта В.А., Кононов О.В., Мікробіологія/ підручник для студ. вищих медичних навч. закладів I-II рівнів акредитації . Київ – 2008р. – 456 с. ISBN: 978-966-8144-62-2 [Електронний ресурс]. – Режим доступу: https://k-m-k.com.ua/wp-content/uploads/2019/10/UCHEBNYK_mykrobyologyua.pdf
37. Biostat® Cplus The Stainless Steel Fermenter. Bioreactor for Your Laboratory. Publication No.: SBI1505-e150505. URL: <https://www.sartorius.com/download/9612/12/broch-biostat-cplus-sbi1505-e-data.pdf>
38. Пенчук Ю.М. Загальна біотехнологія: Презентація. - [Електронний ресурс] - Режим доступу: <https://www.slideshare.net/YuriPenchuk/4-75375929>
39. Пирог Т.П., Ігнатова О.А. Загальна біотехнологія / Підручник. – К.: НУХТ-2009. – 336 с.
40. Сидоров Ю. І., Влезло Р. Й., Новіков В. П. Процеси і апарати мікробіологічної промисловості / Видавництво Національного університету «Львівська політехніка». Львів: – 2004. – 199-202 с.
41. Кантере В.М. Основы проектирования предприятий микробиологической промышленности/ Учеб. пособие для вузов. - М.: Агропромиздат, -1990. – 304 с.

42. Воропай П.И., Шленов А.А. Повышение надежности и экономичности поршневых компрессоров. / М. Недра - 1980. – с.360
43. Мембранные фильтры для стерилизующей фильтрации воздуха и газов [Электронный ресурс] - Режим доступа: <http://sartorius-sd.com.ua/index.php/%D1%84%D0%B8%D0%BB%D1%8C%D1%82%D1%80%D0%B0%D1%86%D0%B8%D1%8F-%D0%B2%D0%BE%D0%B7%D0%B4%D1%83%D1%85%D0%B0-%D0%B8-%D0%B3%D0%B0%D0%B7%D0%BE%D0%B2/aerosart%C2%AE.html>
44. Технологічний процес виробництва на молочному комбінаті. [Электронный ресурс] – режим доступа: https://knowledge.allbest.ru/manufacture/3c0a65625a2bd69b5c53b88421306d26_1.html
45. Очищення і дезинфекція в харчовій промисловості. [Электронный ресурс] – режим доступа: <https://www.bettaservice.com.ua/novyny-kompanii/item/1172-ochistki-i-dezinfektsiya-v-pishchevoy-promyshlennosti.html>.
46. МОЗ Наказ «Про затвердження методичних рекомендацій щодо виконання санітарно-гігієнічних вимог та проведення мікробіологічного контролю у виробництві нестерильних лікарських засобів» [Электронный ресурс] – режим доступа: <https://zakon.rada.gov.ua/rada/show/v0502282-01#Text>
47. Кабінет Міністрів України. Постанова Про затвердження Технічного регламенту мийних засобів (Технічний регламент, п.2). [Электронный ресурс] – режим доступа: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/717-2008-%D0%BF#Text>.
48. Очищення, миття і дезинфекція приладдя молочного виробництва. Засоби для санітарного оброблення технологічного устаткування, інвентарю,

- тари. [Електронний ресурс] – режим доступу:
<https://kazedu.com/referat/96481/4>
49. Станція СІР-Мийки Обладнання Кмз-Сцм. [Електронний ресурс] – режим доступу:
<https://kmbp.com.ua/produktsiya/rishennia-dlia-molochnoi-promyslovosti/stantsiji-cip-mijki/stantsiia-cip-myiky-obladnannia-kmz-stsm>
50. Гігієнічні вимоги до мийних засобів. [Електронний ресурс] – режим доступу: <http://medbib.in.ua/gigienicheskie-trebovaniya-moyuschim.html>
51. Технологія отримання та первинного оброблення молока: Метод. рекомендації до вивчення дисципліни, проведення практичних занять та виконання контрольної роботи для студентів напряму підготовки 6.051701 “Харчові технології та інженерія”. /Уклад.: О.В. Кочубей-Литвиненко, А.Г. Пухляк. – К.: НУХТ, 2013. – 66 с.
52. Сучасні дезінфектанти: плюси та мінуси / Н. О. Прокудіна // Сучасне птахівництво : науково - виробничий журнал. - 2016. - N 4. - С. 19-22
53. Дезінфекція. [Електронний ресурс] – режим доступу: <http://tc-2.pto.org.ua/index.php/item/93-dezynfektsiia>
54. Дезінфекція. Методичні вказівки для самостійної роботи студентів 5-го курсу медичного факультету з дисципліни «Епідеміологія». [Електронний ресурс] – режим доступу:
<http://repo.knmu.edu.ua/bitstream/123456789/28042/1/%D0%A7%D1%83%D0%BC%D0%B0%D1%87%D0%B5%D0%BD%D0%BA%D0%BE%20%D0%94%D0%B5%D0%B7%D1%96%D0%BD%D1%84%D0%B5%D0%BA%D1%86%D1%96%D1%8F%20%E2%84%9620-347073.pdf>.
55. Впровадження системи НАССР для операторів ринку харчових продуктів : практичний посібник / А. С. Ткаченко, Ю. О. Басова, О. О. Горячова та ін. ; за загальною редакцією А. С. Ткаченко. – Полтава : ПУЕТ, 2020. – 137 с.
56. Грегірчак Н.М. Мікробіологія, санітарія і гігієна виробництв з основами НАССР [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобувачів освітнього

- ступеня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» освітньо-професійної програми «Біотехнологія» денної та заочної форм навчання / Н.М.Грегирчак – К.: НУХТ, 2020. – 177 с.
57. Шульга, Н. М. Санітарія та гігієна : навч. посіб./ НУХТ, 2011.
58. СІР-мийка [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://promf.com/ua/food-equipment-ua/molochne-ua/list-sip-mojka-ua/1317-sip-mojka-2.html>
59. Дезінфекція на підприємствах м'ясопереробної промисловості, дезінфікуючі та антисептичні засоби. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://uk.interdez.com.ua/press/dezinfekciya-myasopererabatyvajushaya-promyshlennost.html>
60. Біомой.[Електроннийресурс]–Режим доступу: <https://prom.ua/p21363788-biomoj.html>
- 61.Карлаш Ю.В., Основи проектування біотехнологічних виробництв: Конспект лекцій для студентів напряму 6.051401 «Біотехнологія» денної та заочної форм навчання / Уклад.: Ю.В.Карлаш - К: НУХТ, 2013. – 143с
- 62.Засіб дезінфікуючий для поверхонь DEZALDUM 20. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://aveal.com.ua/item_N3789.htm
63. Лізоформін 3000 [Електронний ресурс]– режим доступу:<http://amoreshop.com.ua/lizoformin-3000-koncentrirovannoe-sredstvo-dlya-dezinfekcii-hirurgicheskikh-instrumentov-i-poverhnostey-1000-ml.html>
64. Секусепт Актив [Електронний ресурс]– режим доступу: <https://hlorka.in.ua/ua/p629894711-sekusept-aktiv.html>
65. China Small Size Single Inlet Centrifugal Blower Fan for Air Suction : [Електронний ресурс]– режим доступу:<https://tzhangda.en.made-in-china.com/product/OFrEBgQugUkL/China-130mm-Small-Size-Single-Inlet-Centrifugal-Blower-Fan-for-Air-Suction.html>

66. ВЕНТС ФБК 150-5 [Электронный ресурс] -Режим доступа: http://www.ks-ekb.ru/vintovye_kompressory/kraftmann_vega/https://vents.ua/product/fbk-1505#description
67. KRAFTMANN VEGA [Электронный ресурс]-Режим доступа: http://www.ks-ekb.ru/vintovye_kompressory/kraftmann_vega/
68. Теплообмінник WHE 2050 [Электронный ресурс] -Режим доступа: http://paskal.ua/ua/product/teploobmenik-whe-2050_172.html.
69. Повітряний вертикальний ресивер Remeza РВ 500.15.00 Letiss Летісс Ремеза : [Электронный ресурс]-Режим доступа: https://letiss.com.ua/ua/resiveri_ua/povitryaniy-vertikalniy-resiver-rv-5001500
70. Система підігріву повітря. [Электронный ресурс] - Режим доступа: https://www.galactic.kiev.ua/pages/painting_cameras_equipment/air_heating_system.php
71. Фильтры мембранные стерелизующие [Электронный ресурс] -Режим доступа: <http://www.polyfilter.ru/produkcziya/filtryi-membrannyye.html>
72. Фільтр «5152507Т3-Е-С» Aerosart [Электронный ресурс] - Режим доступа: <https://www.sartorius.com/download/921716/aerosart-datasheet-en-b-2791979-sartorius-pdf-data.pdf>
73. Biostat Cplus. The Stainless Steel Fermenter. Bioreactor for Your Laboratory. [Электронный ресурс]- Режим доступа: <https://www.sartorius.com/download/9612/12/broch-biostat-cplus-sbi1505-e-data.pdf>
74. Малогабаритные и лабораторные аппараты с механическими перемешивающими устройствами. [Электронный ресурс]- Режим доступа: <https://mash-him.ru/apparaty-s-peremeshivayushhimi-ustrojstvami>
75. Реактор с мешалкой 50 л [Электронный ресурс] - Режим доступа: <https://biotechno.ru/catalog/emkosti-i-rezervuary/reaktor-s-meshalkoy-50-l/>
76. Весовой дискретный дозатор-расходомер для сыпучих (бункерные весы) [Электронный ресурс] - Режим доступа:

- <https://technowagy.com.ua/ru/products/vesovoj-diskretnyj-dozator-rashodomer-dlya-sypuchih-3/>
77. BIOSSTAT D-DCU Your “Fast Lane” to Production. [Электронный ресурс] - Режим доступа: <https://www.sartorius.com/download/10102/9/broch-biostat-d-dcu-sbi1512-e-data.pdf>
78. МКР Bio – Stainless Steel Magnetic Drive Biotech Process Pump [Электронный ресурс] - Режим доступа: <https://www.cp-pumps.com/en/pumps/mkr-bio>
79. Реакторы химические с перемешивающим устройством [Электронный ресурс] - Режим доступа: http://euromash.kiev.ua/ru/aparati_perem_ustroystvom_ru.php
80. Xylem Industrial Pumps. [Электронный ресурс] - Режим доступа: <https://www.xylem.com/siteassets/brand/jabsco/resources/brochure/industrial-catalogue-flojet-jabsco-rule-en.pdf>
81. Реакторы и автоклавы высокого давления с перемешивающими устройствами [Электронный ресурс] - Режим доступа: <https://mash-him.ru/reaktory-i-avtoklavy-vysokogo-davleniya>
82. Смесители-реакторы (тихоходная мешалка) [Электронный ресурс] - Режим доступа: https://www.stroy-union.ru/i_store/item_517262/smesiteli-reaktory-tihohodnaya-meshalka.html
83. BIOSSTAT STR. [Электронный ресурс] - Режим доступа: <https://pdf.medicalexpo.com/pdf/sartorius-group/biostat-str/69922-182951.html>
84. Pure Culture Technique [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://www.scientistcindy.com/ex-12--8203-pure-culture-technique.ht>
85. Красінько В.О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв. Конспект лекцій для здобув. Освіт. Ступ. «бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» освіт.-проф. програми «Біотехнологія» ден. і заоч. Форм навч. / В.О. Красінько. – К.: НУХТ, 2019. – 252с.

86. Корнієнко І.М. Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт з дисципліни "Промислова та екологічна біотехнологія" для студентів очної форми навчання та після дипломної освіти зі спеціальності: 162 Біотехнології та біоінженерія першого (бакалаврського) рівня /Укладач: Корнієнко І. М. – Кам'янське: ДДТУ, 2017. – 51 с.
87. Цифровой датчик оптической плотности 405 нм. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://nau-ra.ru/education/Basic-general/tsifrovye-datchiki/cifrovoy-datchik-opticheskoy-plotnosti-405-nm/>
88. Фармакопейна стаття. Стерептокіназа. Испытания. [Електронний ресурс] - Режим доступу: https://static0.minzdrav.gov.ru/system/attachments/attaches/000/046/178/original/%D0%A4%D0%A1_%D0%A1%D1%82%D1%80%D0%B5%D0%BF%D1%82%D0%BE%D0%BA%D0%B8%D0%BD%D0%B0%D0%B7%D0%B0_%D1%81%D1%83%D0%B1%D1%81%D1%82%D0%B0%D0%BD%D1%86%D0%B8%D1%8F_10.07.2019.docx?1563521263
89. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв: метод. реком. до вивч. дисц. та викон. контр. роботи для студ. напряму підготовки 6.051401 «Біотехнологія» ден. та заоч. форм навч. / уклад. О. С. Волошина – К.: НУХТ, 2014. – 18 с. [Електронний ресурс] Режим доступу: <http://library.nuft.edu.ua/ebook/file/69.45.pdf>
90. ОФС.1.2.3.0012.15 Определение белка/ ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://pharmascopeia.ru/ofs-1-2-3-0012-15-opredelenie-belka/>
91. Современные методы определения глюкозы [Електронний ресурс] // Режим доступу: <http://unimedao.ru/articles/6826/9672/item/146>.
92. Стародуб М. Ф., Канюк М. І., Шмирева О. М. Мікроелектронні мікроелектронні мультипараметричні біосенсори. Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ.- Біотехнологія, Т. 1, №1, 2008. – С. 61-73.

93. Фотометрические методы определения аммиака [Электронный ресурс] // Режим доступа: <http://c-carbon.info/?p=745>
94. Литвин, М. В. Вплив глобальної фінансової кризи на екологічний вимір сталого розвитку країн світу. /Актуальні проблеми міжнародних відносин –№121 (2)- 2014.- 200-208.
95. Основні напрямки та методи зниження екологічного ризику забруднення оточуючого середовища. [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://chemeducation.pnu.edu.ua/wp-content/uploads/sites/14/2020/03/%D0%9B%D0%B5%D0%BA%D1%86%D1%96%D1%8F-%E2%84%969.pdf>
96. Семенова О.І., Бублієнко Н.О., Ткаченко Т.Л. Природоохоронні технології та обладнання (Природоохоронні технології): Курс лекцій для студ. спеціальностей 7.04010601, 8.04010601 “Екологія та охорона навколишнього середовища” та 8.04010604 «Екологічний контроль та аудит» ден. та заоч. форм навч. – К.: НУХТ, 2012. – 74 с.
97. Мембранные биореакторы и тканевые фильтры: опыт применения [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://www.alfalaval.ru/media/news/2019/mbr/>
98. Установка для утилізації відходів ЕкоФорт [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://eco-promservice.ru/oborudovanie/ustanovka-dlya-pererabotki-othodov/>
99. Оборудование для переработки и утилизации отходов [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://eco-promservice.ru/oborudovanie/utilizaciya-othodov/>
100. Мартиненко С.А., Сучасні технології захисту атмосфери. Навчальний посібник для студентів вищих навчальних закладів екологічного профілю - Кропивницький: ЦНТУ, 2019.- 155 с.

101. В.В. Благодатний, Н.І. Магась, Ю.М. Харитонов, Апарати для очищення повітря від забруднень : методичні вказівки / Б68 - Миколаїв : НУК 2019. -52 с.



Enhanced production of recombinant streptokinase in *Escherichia coli* using fed-batch culture

Deepika Goyal, Girish Sahni, Debendra K. Sahoo*

Institute of Microbial Technology, Council of Scientific and Industrial Research, Sector – 39A, Chandigarh 160036, India

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 November 2008

Received in revised form 30 March 2009

Accepted 3 April 2009

Available online 9 May 2009

Keywords:

Streptokinase

Recombinant *Escherichia coli*

Fed-batch culture

Dissolved oxygen concentration

Plasmid stability

ABSTRACT

Fed-batch culture strategy is often used for increasing production of heterologous recombinant proteins in *Escherichia coli*. This study was initiated to investigate the effects of dissolved oxygen concentration (DOC), complex nitrogen sources and pH control agents on cell growth and intracellular expression of streptokinase (SK) in recombinant *E. coli* BL21 (DE3). Increase in DOC set point from 30% to 50% did not affect SK expression in batch culture where as similar increase in fed-batch cultivation led to a significant improvement in SK expression (from 188 to 720 mg l⁻¹). This increase in SK could be correlated with increase in plasmid segregational stability. Supplementation of production medium with yeast extract and tryptone and replacement of liquid ammonia with NaOH as pH control agent further enhanced SK expression without affecting cell growth. Overall, SK concentration of 1120 mg l⁻¹ representing 14-fold increase in SK production on process scale-up from flask to bioreactor scale fed-batch culture is the highest reported concentration of SK to date.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Streptokinase (SK), a 47 kD protein, naturally secreted by several strains of hemolytic *Streptococci*, is a clot-buster drug most widely used world-wide for the dissolution of blood clots in cardiovascular diseases like heart attack or stroke (Longstaff and Whitton, 2003). The increased prevalence of thrombo-embolic disorders has led to a tremendous rise in the demand for clot-dissolver drugs preferably at low price, especially in developing countries and to meet this, it is imperative to develop a production process with high yield (mg protein l⁻¹). The low SK production yields from natural host and its pathogenicity are the main reasons for exploration of recombinant DNA technology route for this important protein. *Escherichia coli* is the most commonly used host for heterologous protein production and the preferred method for increasing the concentration of heterologous recombinant proteins, which is proportional to both cell density (unit cell mass per unit volume) and specific cellular product yield (amount of product per unit cell mass), is the fed-batch strategy (Lee, 1996).

Often the transition from shake flask to bioreactor mode of cultivation decreases specific yield of the recombinant protein. In this regard, the importance of nutritional and metabolic parameters during bioreactor cultivation cannot be underestimated. These parameters become more significant in recombinant systems because the replication and gene expression of the plasmid depend

on a number of factors including enzymes, energy and biosynthetic precursors available in the host cell. Oxygen is one such process parameter and the effect of oxygen on the cultivation process is generally viewed from two aspects: oxygen transfer rate and dissolved oxygen concentration (Sahoo and Agarwal, 2002). In practice, there is no unanimity on maintenance of a DOC and its control in the range of 10–50% is reported to yield optimal expression of different recombinant proteins during fed-batch cultivation of *E. coli* (Saraswat et al., 1999; Shin et al., 1997; Wang et al., 1998). Similarly the increase in recombinant protein expression levels with the addition of complex nitrogen sources has been reported in many instances in *E. coli* fermentations.

Although a fair amount of general literature is available on the large-scale production of heterologous proteins in *E. coli*, it should be realized that each expression system is unique in terms of promoter system, host-vector interactions, sequence and characteristics of recombinant product and the effect of the expressed foreign protein on host cell physiology. Hence the optimum requirements for growth and product formation also vary from case to case. The importance of growth parameters can be deduced from the fact that although parameters like stable maintenance of recombinant plasmid, plasmid copy number, protease degradation of the recombinant product and inclusion body formation are primarily a function of genetic makeup of the host and vector system, these are also known to be greatly affected by the cultivation conditions and media composition (Lee, 1996; Yee and Blanch, 1992; Zabriske and Arcuri, 1986). Hence the production or upstream processing of any recombinant product from *E. coli* requires detailed

* Corresponding author. Tel.: +91 172 269 6680; fax: +91 172 269 0585.
E-mail address: dsahoo@imtech.res.in (D.K. Sahoo).

Japan), calibrated against dry cell weight (DCW) at 80 °C to constant weight. One optical density (OD_{600}) unit was found to be equivalent to 0.4 g DCW l^{-1} . Segregational stability of the recombinant plasmid was estimated by parallel plating of the serially diluted sample on the amp^+ and amp^- LB plates and was expressed as the percentage of plasmid-bearing cells out of total viable cells (Hörn et al., 1990). The presence of ampicillin in the medium was detected by the appearance of zone of growth inhibition around the cell free extract on an LB plate inoculated with ampicillin sensitive wild type *E. coli* culture. Residual sugar was determined by the 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) method using glucose as standard (Miller, 1959). Total cell lysates, obtained by boiling the cells in lysis buffer (125 g l^{-1} , Upper Tris pH 6.8, 20 g l^{-1} SDS, 20 g l^{-1} glycerol, 2 g l^{-1} bromophenol blue, 360 g l^{-1} urea, 70 g l^{-1} BME), were loaded onto discontinuous SDS-PAGE (Sigma, USA) (Sambrook et al., 1989). For separate analysis of the soluble and insoluble fractions on SDS-PAGE, cells were lysed using sonication as described earlier (Goyal et al., 2007) and cell lysate was centrifuged. The residual pellet was solubilized in lysis buffer (equal to cell lysis buffer volume). Both soluble and insoluble fractions were then loaded on the gel. Total crude protein was determined by Bradford assay (Bradford, 1976). The expression of SK was quantified by densitometric analysis of the Coomassie-stained bands of SK and BSA standards (Software: Gene Tools from Syngene, MD, USA) as described previously (Saraswat et al., 1999; Shin et al., 1997). The concentration of SK was expressed as mg SK per litre of fermentation broth ($mg l^{-1}$) and specific yield of SK was expressed as mg SK per g dry cell weight ($mg g^{-1}$). The results represented are the mean of three experiments.

3. Results and discussion

3.1. Shake flask cultivation

The recombinant *E. coli* BL21 (DE3) strain was initially evaluated in shake flasks and SK expression levels in LB and a formulated synthetic media (to be used for bioreactor cultivations) were compared. The expression levels as seen by running an SDS-PAGE of the whole cell lysates is shown in Fig. 2a. In LB medium, the concentration and specific yield of SK were 80 $mg l^{-1}$ and 74 $mg g^{-1}$ and the corresponding values for synthetic medium were 74 $mg l^{-1}$ and 68.5 $mg g^{-1}$. The SDS-PAGE analysis of soluble and insoluble fractions of *E. coli* cells indicated SK being expressed

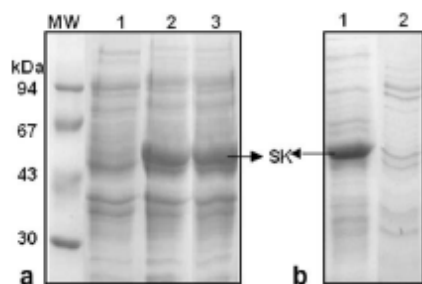


Fig. 2. (a and b) Expression of streptokinase in LB and synthetic medium in shake flask culture. Recombinant *E. coli* cells were cultivated in LB and synthetic medium in separate flasks and induced with IPTG. Panel a: lane MW – standard molecular weight markers, lane 1 – whole cell lysate from un-induced cells, lanes 2, 3 – whole cell lysate after 4 h of induction in case of LB and synthetic medium, respectively. Panel b: soluble (lane 1) and insoluble (lane 2) fractions of the induced sample. The arrow indicates the position of SK (47 kDa) band, which is mainly present in soluble fraction.

in the soluble fraction with a level of about 20% of the total cell protein in both the mediums (Fig. 2b).

3.2. Bioreactor cultivation

Although the results obtained with shake flask studies demonstrated that the SK yield was little higher in LB medium as compared to synthetic medium, bioreactor cultivations were still performed using synthetic medium. This was due to higher cell mass yield obtained in the synthetic medium ($OD_{600} \sim 11$) as compared to LB medium ($OD_{600} \sim 5$) in initial batch cultivation experiments in bioreactor and selective ease of feeding control using separate medium components such as carbon and nitrogen sources. Batch bioreactor cultivation using synthetic medium was carried out at 5 l bioreactor scale at 30% dissolved oxygen concentration (DOC). A final cell density (OD_{600}) of ~ 11 , SK concentration 224 $mg l^{-1}$ and specific SK yields of 50.9 $mg g^{-1}$ resulted at 4 h post-induction (Fig. 2a). A plasmid segregational stability analysis was carried out by comparing the number of CFUs (colony forming units) on amp^+ and amp^- plates formed after plating culture sample withdrawn at different time-points during cultivation. The presence of ampicillin resistance was thus used as an indicator for the presence of recombinant plasmid in the cells. It was found that under experimental conditions, more than 90% of the culture retained the recombinant plasmid at 4 h post-induction, similar to the shake flask cultivation. In correlation to this short time (4 h) retention of recombinant plasmids, it was observed that the SK expression did not increase after 4 h of induction and level of SK expressions at 4 and 24 h of post-induction were closely similar (Fig. 3). The possible explanation for such an observation could be that with use of expression system(s) based on highly inducible and strong promoters e.g. T7 the maximum expression is achieved shortly (within 1–4 h) after induction (Dedhia et al., 1997; Sanden et al., 2003). During further batch cultivation experiments, an increase in DOC set point to 50% did not improve SK yields.

3.3. Fed-batch cultivation

A series of fed-batch cultivations were carried out that involved initial cell cultivation in batch mode followed by subsequent addition of nutrients using different feeding strategies to build up high density of *E. coli* cells for induction. The entire fed-batch phase was carried out at 30% DOC set point under restricted glucose supply and the residual glucose level was maintained below 1.0 $g l^{-1}$. An un-induced fed-batch experiment with glucose-feeding rate of 4.5 $g l^{-1} h^{-1}$ resulted in a maximum cell density (OD_{600}) of 42.0

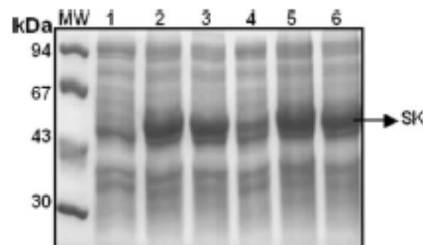


Fig. 3. Effect of DOC set point on streptokinase in batch and fed-batch cultivations. The effect of maintaining the DOC set point at 30% and 50% on SK expression was studied in batch and fed-batch cultivations. Lanes represent, MW-standard molecular weight markers, 1-un-induced cells, post-induction samples (4 h): 2-shake flask, 3-30% DOC batch cultivation, 4-30% DOC fed-batch cultivation and 5-50% DOC fed-batch cultivation, 6-post induction sample (24 h) of fed-batch cultivation with DOC at 50%.

after 7 h of feeding. Under similar experimental conditions, when culture were induced with IPTG at $OD_{600} = 3.2$ (after 3 h of feeding), a final cell density (OD_{600}) of ~ 3.6 was obtained after a total feeding time of 7 h. The SDS-PAGE analysis of whole cell lysate (Fig. 3), however, showed a poor expression of SK (188 mg l^{-1}) with a significantly decreased level of specific SK yield (12.4 mg g^{-1} SK compared to 50.9 mg g^{-1} in batch). In line with this decrease in specific SK yield, a similar decline in the number of plasmid-bearing cells was also noticed and out of $\sim 90\%$ of viable cells retaining recombinant plasmid at the time of induction, only $\sim 20\%$ cells retained recombinant plasmid at 2 h post-induction while most of the cells lost their recombinant plasmid at 5 h post-induction.

3.3.1. Increasing ampicillin concentration

In order to improve plasmid stability and hence, enhance SK yield in fed-batch process, the concentration of ampicillin in feed medium was increased from 0.1 to 2.0 g l^{-1} . This was done since the recombinant plasmid containing cells were ampicillin resistant and hence would outgrow non-containing cells. However, this attempt was not successful and no improvement in either SK concentration (144 mg l^{-1} with specific SK yield of 10 mg g^{-1}) or segregational stability of plasmids during post-induction phase was observed. It was also observed that samples withdrawn from the bioreactor during post-induction phase did not produce detectable zone of growth inhibition of wild type *E. coli* (ampicillin sensitive) suggesting rapid ampicillin degradation in fed-batch culture. Similar ampicillin degradation in high cell density cultivations of recombinant *E. coli* has been well documented (Ensley, 1984; Yee and Blanch, 1992).

3.3.2. Increasing dissolved oxygen concentration (DOC)

There was a previous report on drastic decline (close to 99%) in plasmid stability within 90 min of a single drop in DOC to 5% during the exponential growth phase of *E. coli* (Hopkins et al., 1987). Since 30% DOC in batch cultivation resulted in good SK expression level but in fed-batch it was not, we analyzed DOC profiles recorded using advanced fermentation software (AFS) during the course of cultivation. It was found that at 30% DOC, its profile showed oscillations in the range of 5–55% in case of fed-batch culture (Fig. 4b) while in case of batch culture, DOC remained quite steady with fewer fluctuations in the range of 25–40% (Fig. 4a). Thus the minimum value of DOC remained at 25% in batch cultivation while in fed-batch it was found to drop to as low as 5% at certain places. In order to maintain DOC over this minimum threshold level, the next fed-batch cultivation was carried out at 50% DOC and although the cell growth and residual glucose profiles remained closely similar to that at 30% DOC control, the proportion of cells retaining the recombinant plasmid during post-induction phase improved significantly, showing more than 90% plasmid stability even at 3 h post-induction. This significant improvement in plasmid stability was observed to be in direct agreement with the increase in the specific yield and hence, concentration of SK (Fig. 3), which were estimated to be 50.1 mg g^{-1} and 722 mg l^{-1} , respectively. Thus by an increase in DOC set point to 50% in fed-batch cultivation, the 'effective' DOC remained always above a threshold value of 25% (Fig. 4c). A further increase to 60% DOC did not cause any further improvement in the expression level of SK in another experiment. The fluctuations of DOC are not uncommon in the PID control systems and suspected to arise due to changes in growth phase or growth kinetics (Lee et al., 1994; Leon et al., 2001), aeration or agitation rates and increase in viscosity (Trujillo-Roldon et al., 2001).

These experiments thus suggested that a decrease in level of DOC in cultivation medium (caused by DOC oscillations) following induction, below a threshold value, could adversely affect the maintenance of recombinant plasmids and the expression levels

of SK. Further to this discussion, although the percentage of plasmid bearing cells only increased during initial 3–4 h of post-induction period by increasing DOC set point from 30% to 50%, the SK expression levels were significantly different (188 vs. 722 mg l^{-1}). Thus during bioreactor cultivations of the recombinant *E. coli*, not only the maintenance of DOC above a certain threshold level is important but the oscillations in the actual DOC profile should also be taken into account. This is because DOC is critical both for the growth of the aerobic cells and also for providing energy (ATP) for the replication and segregation of recombinant plasmids and subsequent expression of the plasmid-borne genes (Zabriskie and Arcuri, 1986) and initial 1–4 h of post-induction time were most crucial for the expression of recombinant protein expressed under the control of strong promoters like T7 as product (SK) formation ceased after that period (Dedhia et al., 1997; Sanden et al., 2003).

3.3.3. Addition of organic nitrogen sources

In order to further increase the expression of SK in fed-batch cultivation, the effects of addition of organic nitrogen sources like yeast extract alone or in combination with tryptone or peptone or casein acid hydrolysate to initial batch phase cultivation as well as feed medium were investigated. The medium supplementation with a combination of yeast extract and tryptone resulted in highest SK concentration of 933 mg l^{-1} (specific yield = 64.8 mg g^{-1}) as compared to 810 mg l^{-1} (specific yield = 56.2 mg g^{-1}) in case yeast extract alone, 760 mg l^{-1} (specific yield = 52.8 mg g^{-1}) with yeast extract and peptone, and 860 mg l^{-1} (specific yield = 59.7 mg g^{-1}) with yeast extract and casein acid hydrolysate. However, final cell density ($OD_{600} \sim 3.6$) and plasmid stability profiles remained almost similar (Fig. 5). These complex nitrogen sources are known to result in increased recombinant protein expression either due to the availability of biosynthetic precursors (Kweon et al., 2001; Zabriskie et al., 1987) or increase in plasmid stability (Matsui et al., 1990) and cell mass (Li et al., 1990). Since the addition of yeast extract and tryptone did not improve the segregation stability of plasmids bearing SK gene and final cell density, the increase in SK yield was thought to be due to amino acids and vitamins supplied by these nutrients, that reduced the cellular burden for expression of SK.

3.3.4. Changing the pH-control agent

Ammonia was used as a pH-control agent in bioreactor cultivation studies. However, it is to be noted that in comparison to batch fermentation where 50 ml of 25% liquid ammonia solution was used for pH control, an additional 105 ml was used in fed-batch cultivation, indicating a 300% increase in ammonia use for pH control. In order to avoid possible detrimental effects of ammonia, 2 N NaOH was used for pH control while all other conditions were kept unchanged. The results showed that the use of NaOH (as pH control agent), in place of liquid ammonia, resulted in increased specific yield and concentration of SK to 77.7 mg g^{-1} and 1120 mg l^{-1} , respectively, though it did not noticeably affect cell growth (Table 1). This might be due to the removal of detrimental effects of ammonia on cell physiology and protein expression as previously noted during *E. coli* cultivations (Lau et al., 2004; Riesenberger et al., 1991; Thompson et al., 1985).

Overall, SK production increased from 74 mg l^{-1} in shake flask to 1120 mg l^{-1} in bioreactor scale fed-batch process, a 14-fold increase (Table 1). This yield of streptokinase is higher than previously reported streptokinase yields (Estrada et al., 1992; Ko et al., 1995; Lee et al., 1997; Pal et al., 2001; Ramalingam et al., 2007) at bioreactor scale production, as shown in Table 2. Also, the essentially unchanged specific yield of SK with scale up from shake flask to bioreactor scale fed-batch cultivation is of practical advantage in downstream processing.

ДОДАТОК А

4472

D. Goyal et al. / Bioresource Technology 100 (2009) 4468–4474

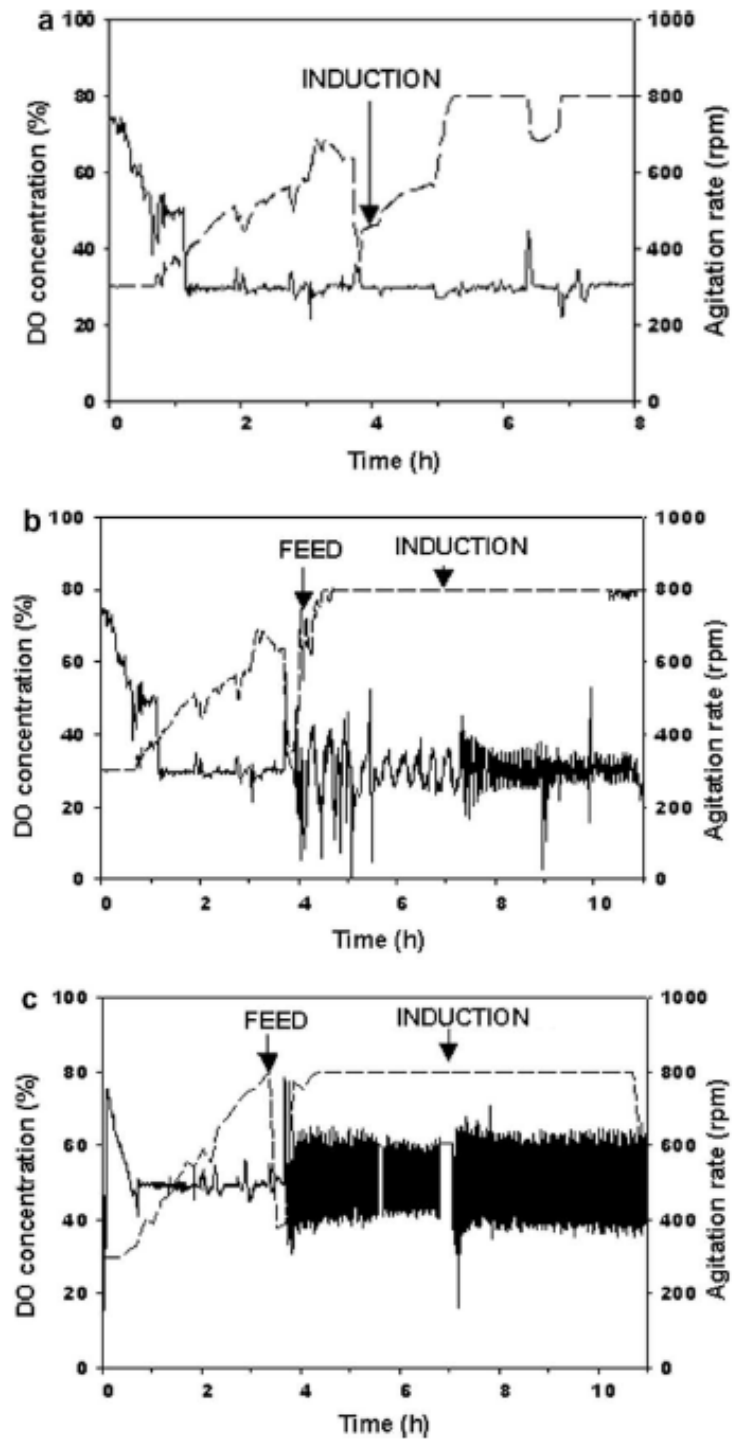


Fig. 4. (a–c) Online profiles of DOC and agitation during the course of batch and fed-batch cultivations. Figures show the real-time profiles (from AFS) of dissolved oxygen concentration (%) (—) and agitation rate (rpm) (---). (a) 30% batch (batch process with 30% DOC) and (b) 30% fed-batch (fed-batch process with 30% DOC) and (c) 50% fed-batch (fed-batch process with 50% DOC). The arrows indicate the time of the start of feed and time of induction.

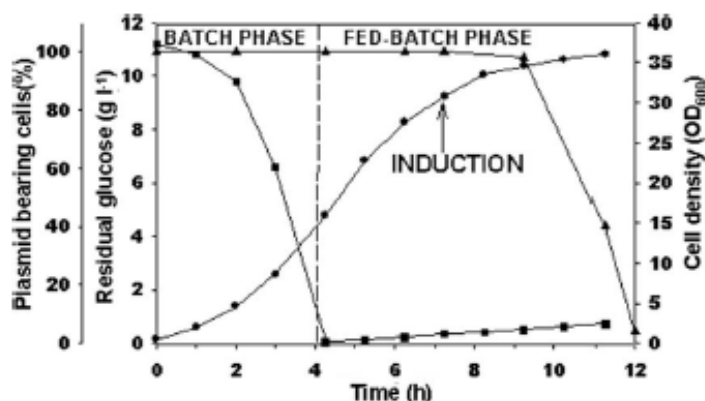


Fig. 5. Fed-batch cultivation in a medium supplemented with yeast extract and tryptone. Figure shows the profile of plasmid bearing cells (X) (▲), cell growth (●) and glucose utilization (■) in case of fed-batch culture using medium supplemented with yeast extract and tryptone at 50% DOC.

Table 1
Expression of streptokinase at different stages of production.

S. no.	Fermentation condition	Media	OD ₆₀₀ ^b	Volumetric expression (mg l ⁻¹) ^b
1.	Shake flask	LB	2.7 ± 0.1	80 ± 6
2.	Shake flask	Synthetic	2.7 ± 0.1	74 ± 6
3.	Batch fermenter ^a	Synthetic	11 ± 0.5	224 ± 12
4.	Fed-batch (DO control at 30%) ^a	Synthetic	36.4 ± 2	188 ± 8
5.	Fed-batch (DO control at 50%) ^a	Synthetic	36 ± 2	722 ± 30
6.	Fed-batch (DO control at 50%) ^a	Synthetic media + yeast extract + tryptone	36 ± 2	933 ± 43
6.	Fed-batch (DO control at 50%, 2 M NaOH for pH control)	Synthetic media + yeast extract + tryptone	36 ± 2	1120 ± 50

^a Liquid ammonia was used as pH control agent.

^b Average value of three sets of experiments is presented with error values.

Table 2
Recombinant streptokinase produced in *E. coli*.

Host	Cell mass DCW (g l ⁻¹)	Streptokinase yield	Process description	Reference
<i>E. coli</i> JM109	N.S.	5000 IU ml ^{-1a}	Shake flask	Ko et al. (1995)
<i>E. coli</i> JM109	N.S.	~50 mg l ⁻¹	Shake flask	Lee et al. (1997)
<i>E. coli</i> K-12 W3110	50 ^b	4500 IU ml ^{-1a}	Fed-batch	Estrada et al. (1992)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	~13.0	~100 mg l ⁻¹	Fed-batch	Pal et al. (2001)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	5.6	140 mg ml ^{-1a}	Fed-batch	Ramalingam et al. (2007)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	14.4 ^c	250 mg l ⁻¹	Fed-batch	This study
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)		1120 mg l ⁻¹	Fed-batch	

N.S. = Not specified in the reference.

^a Calculated from activity units (IU) data provided in the reference by considering 1 mg pure streptokinase = 10⁵ IU.

^b Not specified as wet weight or, dry weight.

^c 1 OD_{600nm} = 0.4 g l⁻¹.

4. Conclusion

In conclusion, judicious optimization of cultivation parameters led to the attainment of streptokinase yield that is, to the best of our knowledge, highest recorded to date in the literature for this important therapeutic protein. Also, the investigations on the influence of DOC on expression level of this protein will help in better understanding of scale up of recombinant protein production process to large-scale bioreactors where the mixing time and DOC fluctuations are often large and have implications in formulating DOC control strategy for high cell density cultivation.

Acknowledgements

The authors thank Council of Scientific and Industrial Research (CSIR), India for overall support and research fellowships to one of

the authors (Deepika Goyal). Grateful thanks are due to Mr. Dinesh Krishnan for the excellent technical support.

References

- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram amounts of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Chaudhary, A., Vasudha, S., Rajagopal, K., Komath, S.S., Garg, N., Yadav, M., Mande, S.C., Sahni, G., 1999. Function of the central domain of streptokinase in substrate plasminogen docking and processing as revealed by site-directed mutagenesis. *Protein Sci.* 8, 2791–2805.
- Dedhia, N.N., Richins, R., Mesina, A., 1997. Chen Wilfred Improvements in recombinant protein production in ppGpp-deficient *Escherichia coli*. *Biotech. Bioeng.* 53, 379–386.
- Ensley, B.D., 1984. Stability of recombinant plasmids in industrial microorganisms. *CRC Crit. Rev. Biotechnol.* 4, 263–277.
- Estrada, M.P., Hernandez, I., Perez, A., Rodriguez, P., Serrano, R., Rubiera, R., Pedraza, A., Padron, G., Antuch, W., Fuente, J.D.J., Herrera, L., 1992. High level expression of streptokinase in *Escherichia coli*. *Biotechnology* 10, 1138–1142.