

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 2022 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

КРАСЬКО Мар'яни Олегівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Біосинтез колагенази *Clostridium hystolitica*

керівник роботи ГУДЗЕНКО Олена Володимирівна, к.б.н., ст. викл.,
(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 цільовий продукт виробництва – фермент
колагеназа; продуцент – *Clostridium hystolitica* SK B-8362; об'єм ферментера для
виробничого біосинтезу становить 100 л з коефіцієнтом заповнення – 0,7.

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 технологічної схеми. РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання. РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми біосинтезу колагенази. РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва колагенази.

5. Перелік графічного матеріалу

Апаратурна схема біосинтезу колагенази на 1 аркуші формату А1. Технологічна
схема біосинтезу колагенази на 1 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 цільового продукту.	04.04.2022 - 09.04.2022	
2.	Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента.	10.04.2022 - 18.04.2022	
3.	Техніко-економічне обґрунтування.	19.04.2022 - 27.04.2022	
4.	Обґрунтування вибору технологічної схеми.	28.04.2022 - 05.05.2022	
5.	Специфікація обладнання.	06.04.2022 - 12.05.2022	
6.	Опис технологічної схеми біосинтезу колагенази.	13.05.2022 - 19.05.2022	
7.	Контроль виробництва колагенази.	20.05.2022 - 01.06.2022	

Здобувач _____
(підпис)

Керівник роботи _____
(підпис)

Мар'яна КРАСЬКО
(ім'я та прізвище)

Олена ГУДЗЕНКО
(ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Представлено проект виробництва ферменту колагенази, шляхом культивування штаму *Clostridium histolyticum* SK B-8362, який, за умови росту на середовищі з пептоном, проявляє максимальний рівень активності 2000 од/мл цільового продукту. Колагеназа – це специфічний протеолітичний фермент, препарати якого використовуються в медичній сфері для профілактики та лікування рубцевих утворень. Розрахована потужність її виробництва складає 140 кг ліофільно висушеного порошку.

Технологічний процес одержання колагенази складається з допоміжних (підготовка інертного газу, приготування і стерилізація поживних середовищ) та основних робіт (вирощування інокуляту в колбах та посівному апараті об'ємом 10 л, а також виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 100 л), що наведені в технологічній та апаратурній схемах.

Дипломний проект викладений на 55 сторінок друкованого тексту, містить 12 таблиць. Складається з вступу, семи розділів, списку використаної літератури (61 джерело) та графічної частини (2 креслення формату А1).

Ключові слова: *Clostridium histolyticum* SK B-8262, колагеназа, фермент, продуцент, біосинтез, колагенолітична активність.

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ.....	2
ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ.....	7
РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА.....	10
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування.....	10
2.2. Морфолого-культуральні ознаки біологічного агента.....	16
2.3. Фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента.....	16
2.4. Таксономічний статус біологічного агента.....	17
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ.....	18
3.1. Потреба в цільовому продукті	18
3.2. Розрахунок потужності виробництва ферментного препарату колагенази.....	19
3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера.....	20
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для біосинтезу колагенази.....	22
РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	25
4.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу.....	25
4.1.1. Обґрунтування вибору умов і способу культивування.....	25
4.1.2. Обґрунтування вибору типу ферментера.....	26
4.1.3. Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря.....	27
4.1.4. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів.....	27
4.2. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища.....	32
4.2.1. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах.....	33
4.2.2. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 10 л	33
4.2.3. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу.....	34

РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ.....	35
РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ КОЛАГЕНАЗИ.....	36
РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА КОЛАГЕНАЗИ.....	42
7.1. Мікробіологічний контроль.....	42
7.2. Контроль показників росту і синтезу.....	44
7.2.1. Визначення активності колагенази.....	44
7.2.2. Визначення концентрації джерела вуглецю.....	44
7.2.3. Визначення концентрації джерела азоту.....	45
7.3. Карта постадійного контролю біосинтезу колагенази.....	47
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	49

ВСТУП

Ще вкінці XIX століття було відомо про клостридіальні протеолітичні ферменти, проте до 1930-х років, навіть з удосконаленням методик досліджень, їх природа і властивості були мало вивчені [1]. Через певний час було виявлено здатність культури *Clostridium perfringens* до лізису здорової м'язової тканини, але дані результати не зацікавили науковців. Інтерес до мікробних протеаз посилювався, коли було встановлено, що культура *Clostridium perfringens* здатна розщеплювати колаген здорового ахіллового сухожилля. Пізніше фермент, одержаний з культури одержав назву «колагеназа» [2].

Колагеназа може широко використовуватись в офтальмології, косметології, хірургії для профілактики та лікування рубцевих утворень, спайок. Особлива увага приділяється перспективному використанню клостридіальної колагенази в лікуванні контрактури Дюпюїтрена – захворювання кисті, пов'язане з рубцевим переродженням і вкороченням долонних сухожилць. Ін'єкція колагенази в фасцію (що покриває сухожилля), яка зарубцювалась призводить до її розпаду, і в результаті, до зникнення рубця. Застосування колагенази для лікування даного захворювання дозволяє відмовитися від стандартного операційного втручання і виключити довгострокове післяопераційне відновлення [1]. Також широко використовується колагеназа в м'ясній промисловості для розм'якшення низькосортної м'ясної сировини, яка містить багату на колаген сполучну тканину. Це дозволить збільшити споживчі властивості низькосортної сировини, збагатити і надати готовому продукту високі якісні показники. Тому актуальним нині є виробниче одержання даного фермента [3].

Колагеназа може бути одержана з тканин ссавців, ракоподібних, відходів комах. Також до синтезу колагенази здатні багато мікроорганізмів, проте найбільш вивченим продуцентом колагенази є *Clostridium histolyticum* [1].

Зми.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	НУХТ БТЕК 04.02.19 КР ПЗ			
Розробник		Красько М.О.			ВСТУП	Літера	Аркуш	Аркушів
Керівник		Гудзенко О.В.					6	56
Н. контр						Кафедра БТМ		
Консульт								
Зав. каф.		Стадніков В.П.						

Відомий мутантний штам *Clostridium histolyticum* K26, здатний синтезувати колагеназу, але недоліком використання даного штаму у виробничому процесі є його нестабільність. Синтезувати колагеназу також може штам *Clostridium histolyticum* 468, недоліком якого є ріст на досить важкому середовищі, що потребує попередньої підготовки (містить гідролізат казеїну та соєвого шроту, вітаміни та неорганічні солі). Тому для виробничого процесу був запропонований штам *Clostridium histolyticum* SK B-8362 з незмінними властивостями, котрий адаптований під лабораторні та промислові середовища [4].

РОЗДІЛ 1

ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

Колагеназа (КФ 3.4.24.3) – це специфічний протеолітичний фермент, який здатний розщеплювати пептидні зв'язки потрійної спіралі колагену.

Існують різні типи колагеназ, які здатні виділятися з тканин хребетних, крабів, екскретів комах, також з клітин мікроорганізмів – бактерій, грибів, дріжджів, актиноміцетів.

Колагенази поділяються на істинні та неспецифічні за здатністю гідролізувати колагенові волокна. Істинна колагеназа здатна гідролізувати тільки колаген. Неспецифічна колагеназа здатна крім колагену гідролізувати й інші білкові субстрати.

Бактеріальні колагенази відрізняються від колагеназ хребетних тварин тим, що володіють більш широкою субстратною специфічністю. На відміну від колагеназ тварин, що розщеплюють колаген в його природній трійній спіральній конформації, бактеріальна колагеназа є унікальна, оскільки вона здатна розщеплювати як водонерозчинні природні колагени, так і водорозчинні денатуровані колагени та гідролізувати колагени до повного їх руйнування [5].

Типовим продуцентом колагенази є *Clostridium histolyticum*. Також, до синтезу цього ферменту здатні: *Bacillus cereus*, для яких колагеназа є одним з основних вірулентних факторів [6], *Streptomyces lavendulae* [7], *Candida albicans* [8], *Thermoactinomyces vulgaris* [9] та інші.

Фізико-хімічні властивості. Хімічна формула колагенази *Clostridium histolyticum* – C₅₀₂₈H₇₆₆₆N₁₃₀₀O₁₅₆₄S₂₁ [10]. Середня молекулярна маса колагенази знаходяться в діапазоні (Да): 68000 – 130000 (продуцент *Clostridium histolyticum* [5]), 46000 (продуцент *Candida albicans* [8]), 60000 – 120000 (продуцент *Streptomyces lavendulae* [7]), 62000 (продуцент *Grimontia hollisae*, з якого отримали рекомбінантну колагеназу з високою ефективністю. Вона є активною

Зми.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробник		Красько М.О.			РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту	Літера	Аркуш	Аркушів
Керівник		Гудзенко О.В.					8	56
Н. кантр						Кафедра БТМ		
Консульт								
Зав. каф.		Стабніков В.П.						

за рН, що наближається до такого у біологічних системах та володіє більш високою специфічною активністю [11]), 210000 (продуцент *Geobacillus collagenovorans* – синтезує колагенолітичну протеазу, що має найвищу молекулярну масу серед інших мікробних колагеназ і складається з двох ідентичних субодиниць масою 105 кДА [12]).

Колагенази, які виділяються з різних джерел мають різні фізико-хімічні властивості. Так, колагеназа, синтезована *Clostridium histolyticum* залишається стабільною в діапазоні рН 6,3-8,5, при температурі 37°C. Оскільки колагеназа *Clostridium* є нейтральною металопротеазою, яка в активному центрі містить цинк, то для її вирощування, як активатори необхідні іони цинку та кальцію, які запобігають інактивації. Інгібіторами є ЕДТА (етилендіамінтетраацетат), гістидин, цистеїн, 0-фенантролін.

Колагеназа продукується двома різними генами *Clostridium histolyticum*. Ген col G кодує колагеназу 1 типу – це білок з 936 амінокислот, ген col H кодує колагеназу 2 типу – білок, який складається з 1021 амінокислот. Ці гени ідентичні на 72%, а білки, які утворюються на 43%. Ці білки можуть бути у вигляді двох та більше ізоформ, які відрізняються за молекулярною масою, тому в результаті одержують групу з 6-7 колагеназ з молекулярною масою від 68000 до 130000 Да.

Дослідження показали, що продукт гена col G надає перевагу природнім субстратам (колаген), на відміну від продукту гена col H, який надає перевагу синтетичним субстратам (FALGPA) [5].

Термофільні актиноміцети *Thermoactinomyces vulgaris* 21E продукують високу термостабільну колагеназу, яка має молекулярну масу 50000 Да. Оптимальна температура для активності фермента за відсутності Ca^{2+} складає 60-65°C, а за присутності кальцію – 70-75°C. Близько 40% активності зберігається після культивування при 85°C протягом 30 хв за наявності кальцію. Для того, щоб фермент залишався стабільним протягом 1 год, необхідно культивувати при 70°C та за оптимального рН – 7,5-12,5. Активність фермента повністю пригнічується Hg^{2+} , Cu^{2+} and Fe^{2+} [9].

В середовищі, де колаген використовується в якості джерела азоту, дріжджі *Candida albicans* синтезують колагенолітичний фермент. Оптимальний рН: 3,6 – 4,0. При рН вище 6,0 відбувається денатурація фермента. Активність колагенази знижувалась при температурі вище 55°C. Інгібіторами слугують сечовина та цистеїн [8].

Активність колагенази зазвичай виражається в міжнародних одиницях активності (МО) або в стандартних одиницях – юніт (U). При цьому одиниця активності – це кількість ферменту, яка каталізує перетворення 1 мкмоль субстрату за 1 хвилину в оптимальних умовах [13]. Ферментативна активність колагенази залежить від: концентрації ферменту та субстрату, температури та рН середовища, наявності в ньому інгібіторів або активаторів [14].

Сфери застосування. Встановлено, що широке використання колагенази зустрічається в косметології та медицині (офтальмології, хірургії, дерматології).

Як зазначалось вище, колагенази здатні розщеплювати колаген, який в свою чергу, є основним компонентом сполучної тканини. Препарати колагенази використовуються для корекції рубців, при фіброзних ускладненнях, для очищення ран від некротизованих (змертвілих) тканин, при цьому вона не спричиняє негативного впливу на неушкоджені тканини. Наразі вивчається використання колагенази для лікування хвороби Пейроні та Дюпюїтрена. Колагеназа здатна проявляти протизапальну та фібринолітичну дії [15, 16].

Виробником колагенази (в пластиковій банці 30 г або 100 г у вигляді порошку з активністю 2000 од/г) є компанія «ENZIME Biotech» - завод мікробіологічного синтезу «ЕНЗИМ» (Україна) [16].

Також, використовують крем-гель Іруксан (акрилова банка 30 г з активністю не менше 600 од/г) для загоєння ран та попередження утворення рубців, виробником якого є ENZIME Pharma (Україна) за ліцензією компанії ІМВТ (США) [17].

Колагеназа G/H PB220 – це комплекс колагеназ G та H, яка отримана з *Clostridium histolyticum*. Має високу ефективність при низьких концентраціях. Виробником препарату (флакон по 20 мл) є Proteos Biotech (Іспанія) [18].

РОЗДІЛ 2
ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА
БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

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

Колагеназа – це фермент, здатний розщеплювати потрійну спіраль колагену. За субстратною специфічністю колагеназа поділяється на два класи: клас I – розщеплює високомолекулярний колаген, клас II – менше структурований желатин [19]. Також розрізняють шість ізоформ колагенази, які відносяться до класів I (α, β, γ) та II (δ, ϵ, ξ), при цьому ізоформи β і ξ мають високу молекулярну масу, а всі інші одержані шляхом зрізування їх поліпептидного ланцюга [20].

За класифікацією, мікробні колагенази належать до сім'ї M9 пептидаз MEROPS, які включають бактеріальні металопептидази представників родів *Vibrio* та *Clostridium* [21].

Перша мікробна колагеназа була виділена з *Clostridium histolyticum* і протягом тривалого часу являлась єдиною комерційно доступною мікробною колагеназою. Ці клостридіальні колагенази були добре вивчені і охарактеризовані, тому саме вони є еталонними ферментами для порівняння нещодавно відкритих колагенолітичних ферментів.

В останнє десятиліття стрімко почали вивчати методи одержання та дослідження колагенази за рахунок її застосування в медицині, промисловості та біотехнології. Проте вартість виробництва колагенази є основною перешкодою для успішного промислового використання, оскільки більшість виробничих витрат (30-40%) обумовлені дорогими середовищами для культивування мікроорганізмів.

					<i>НУХТ БТЕК 04.02.19 КР ПЗ</i>			
<i>Зми.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	<i>Літера</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Разробник</i>	<i>Красько М.О.</i>						12	56
<i>Керівник</i>	<i>Гудзенко О.В.</i>					<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. контр</i>								
<i>Консульт</i>								
<i>Зав. каф.</i>	<i>Стадніков В.П.</i>							

Розробка дешевих рецептур поживних середовищ для одержання мікробної колагенази може зіграти значну роль у вартості продукту, концентрації та продуктивності, тобто використовуючи недороге середовище можна досягти більшого виходу продукту, що буде вважатися економічно вигідним виробництвом [22].

Крім *Clostridium histolyticum*, відомі й інші мікроорганізми здатні до синтезу колагенази (табл. 2.1).

За даними, наведеними в табл. 2.1 можна зробити висновок, що найбільшою колагенолітичною активністю за достатньо короткий термін культивування, порівняно з іншими мікроорганізмами, володіють ферменти, синтезовані *Clostridium histolyticum* 468 та *Clostridium histolyticum* SK B-8362 на поживному середовищі однакового складу. Натомість, найменшою є тривалість культивування штаму *Clostridium histolyticum* K-26, але колагенолітична активність синтезованого ферменту є досить низькою. Серед інших мікроорганізмів, які не відносяться до класу *Clostridia*, синтезувати колагеназу з достатньо високою активністю здатен *Penicillium aurantiogriseum* URM4622. Тому на наступному етапі вибору біологічного агента розрахуємо вартість поживних середовищ для культивування наведених мікроорганізмів (табл. 2.2).

Особливості одержання колагенази на суміші ростових субстратів

Біологічний агент	Склад поживного середовища:		Тривалість культивування, год	Активність ферменту, од/мл	Особливості процесу біосинтезу	Використана література
	компонент	концентрація, г/л				
1	2	3	4	5	6	7
Association <i>Aspergillus awamori</i> 16 and <i>Aspergillus awamori</i>	Сахароза - 20 Пептон - 10 КН ₂ РО ₄ – 1 MgSO ₄ – 0,5 KCl – 0,5 FeSO ₄ – 0,01	20 10 1 0,5 0,5 0,01	72	8,2	Культивування в колбах об'ємом 750 мл в роторному шейкері (n = 150 об/хв; t° = 30°C).	RK Blieva, Zh B Suleimenova, AS Zhakipbekova, Zh K Saduyeva, RN Bissalyeva, AK Kalieva, I Tapenbayeva, AE Nurlybayeva. Collagenase Production by Immobilized Fungal Association of <i>Aspergillus Awamori</i> 16 and <i>Aspergillus Awamori</i> 22. Indian Journal of Agricultural Research 54 (1), 2020
<i>Thermophilic actinomycete</i> A-35	Крохмаль Пептон Екстракт кукурудзи Крохмаль NaCl CaCO ₃	10 5 5 5 5 5	48	14,5	Культивування в колбах об'ємом 500 мл зі 100 мл середовища на качалці (n = 325 об/хв; t° = 55°C).	Christov, A Gousterova, I Goshev, R Tzvetkova, P Nedkov. Optimization of the biosynthetic conditions for collagenase production by certain thermophilic actinomycete strains / Comptes Rendus de l'Academie Bulgare des Sciences 53 (3), 3: 115, 2000
<i>Penicillium aurantiogriseum</i> URM4622	Соеве борошно Глюкоза K ₂ HPO ₄ MgSO ₄ *7H ₂ O NH ₄ Cl FeSO ₄ *7H ₂ O MnCl ₂ *4H ₂ O ZnSO ₄ *H ₂ O CaCl ₂ *H ₂ O	16,45 0,1 4,35 0,6 1 1 1 1 1	72	283,36	Культивування в колбах об'ємом 250 мл з 50 мл середовища в орбітальному шейкері (n = 200 об/хв; t° = 24°C).	Lima CA, Marques DA, Barros Neto B, Lima Filho JL, Carneiro-da-Cunha MG, Porto AL. Fermentation medium for collagenase production by <i>Penicillium aurantiogriseum</i> URM4622. Biotechnol Prog. 2011 Sep-Oct;27(5):1470-7. doi: 10.1002/btpr.664. Epub 2011 Jul 19. PMID: 21774096.

Закінчення таблиці 2.1

1	2	3	4	5	6	7
<i>Clostridium histolyticum</i> К-26	Пептон Триптичний соєвий відвар Na ₂ HPO ₄ MgSO ₄ *7H ₂ O FeSO ₄ *7H ₂ O Пантотенова кислота Нікотинамід Піридоксин Тіамін хлорид Рибофлавін	50 15 9 0,08 0,014 0,2 0,2 0,2 0,2 0,02	10	4,4	Культивування в 2-літровому скляному біореакторі з 1500 мл середовища за температури 30°C та з м'яким перемішуванням при 50 об/хв.	European patent application 0468411A2. A mutant of bacterium <i>Clostridium histolyticum</i> , a process for the obtaining thereof, and its use in the production of clostripain-free collagenase / Udovicic I.V., Cizmek S.S., Gamulin S. Publ. 22.07.91
<i>Clostridium histolyticum</i> 468	Яловича кров Пептон Екстракт м'ясний Глюкоза Натрію хлорид	5% (об'ємна частка) 10 10 10 5	44	800-1000	Культивування в термостаті за температури 37°C.	Патент Росії №219.016.FE7A. «Штамм <i>Clostridium histolyticum</i> – продуцент колагеназы» / Трухин В.П., Красильников И.В., Салимова Е.Л., Конон А.Д., Васильев Ю.М. Опубл. 08.04.2019.
<i>Clostridium histolyticum</i> SK В-8362	Яловича кров Пептон Екстракт м'ясний Глюкоза Натрію хлорид	5% (об'ємна частка) 10 10 10 5	44	1500-2000	Культивування в термостаті за температури 37°C.	Патент Росії №219.016.FE7A. «Штамм <i>Clostridium histolyticum</i> – продуцент колагеназы» / Трухин В.П., Красильников И.В., Салимова Е.Л., Конон А.Д., Васильев Ю.М. Опубл. 08.04.2019.

**Вартість поживних середовищ для культивування
продуцентів колагенази**

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)*
1	2	3	4	5	6
<i>Clostridium histolyticum</i> 468 та <i>Clostridium histolyticum</i> SK B-8362	Пептон	10	850	8,5	1
	Екстракт м'ясний	10	7296	72,96	2
	Глюкоза	10	47,70	0,477	1
	Яловича кров	50	4	0,2	3
	Натрію хлорид	5	65	0,325	1
	Вартість 1 л середовища – 82,5 грн				
<i>Clostridium histolyticum</i> K-26	Пептон	50	850	42,5	1
	Триптичний соєвий відвар	15	23	0,35	1
	Na ₂ HPO ₄	9	57,91	0,52	1
	MgSO ₄ *7H ₂ O	0,08	7,5	0,0006	4
	FeSO ₄ *7H ₂ O	0,014	17	0,00023	5
	Пантотенова кислота	0,2	3900	0,78	1
	Нікотинамід	0,2	480	0,096	1
	Піридоксин	0,2	1850	0,37	1
	Тіамін хлорид	0,2	1950	0,39	1
	Рибофлавін	0,02	2000	0,04	1
	Вартість 1 л середовища – 45 грн				
<i>Penicillium aurantiogriseum</i> URM4622	Соєве борошно	16,45	57	0,937	1
	Глюкоза	0,1	47,70	0,005	1
	K ₂ HPO ₄	4,35	90	0,39	1
	MgSO ₄ *7H ₂ O	0,6	7,5	0,0045	4
	NH ₄ Cl	1	24,75	0,025	1
	FeSO ₄ *7H ₂ O	1	17	0,017	5
	MnCl ₂ *4H ₂ O	1	128	0,128	1
	ZnSO ₄ *H ₂ O	1	53	0,053	6
	CaCl ₂ *H ₂ O	1	35	0,035	1
	Вартість 1 л середовища – 1,59 грн				

Примітка. * – Ціни наведено станом на лютий 2021 р. 1 – <https://prom.ua>, 2 – <http://lab-mir.com>, 3 – <https://gorodicsheukr.flagma.ua>, 4 – <https://kiev.flagma.ua>, 5 – <https://reaplust.com.ua>, 6 – <https://www.agrohimprom.com>.

Дані, наведені в таблиці 2.2 свідчать, що середовище для культивування *Penicillium aurantiogriseum* URM4622 є значно дешевшим, ніж для *Clostridium histolyticum* 468, *Clostridium histolyticum* SK B-8362 та *Clostridium histolyticum* K-26. Проте тривалість культивування продуцента *Penicillium aurantiogriseum* є

найбільшою з усіх інших наведених штамів *Clostridium histolyticum*, а активність колагенази є меншою, ніж у *Clostridium histolyticum* 468 та *Clostridium histolyticum* SK B-8362. Для остаточного вибору найефективнішого біологічного агента була розрахована вартість 1 од цільового продукту (табл. 2.3).

Таблиця 2.3

**Умовна вартість 1 од колагенази, синтезованої на суміші
ростових субстратів**

Біологічний агент	Концентрація колагенази, од/мл	Тривалість культивування, год	Кількість утвореної колагенази, од/год	Вартість 1 л середовища, грн/л	Умовна вартість 1 од цільового продукту, грн/од
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>
<i>Clostridium histolyticum</i> 468	1000	44	22,7	82,5	0,08
<i>Clostridium histolyticum</i> SK B-8362	2000	44	45,45	82,5	0,04
<i>Penicillium aurantiogriseum</i> URM4622	283,63	72	3,9	1,59	0,006

Як видно з даних, наведених у таблиці 2.3, кількість утвореної колагенази (за 1 год), синтезованої *Clostridium histolyticum* SK B-8362 є найвищою, але умовна вартість продукту в 7 разів більша, ніж в результаті синтезу *Penicillium aurantiogriseum* URM4622. Проте, якщо врахувати, що активність колагенази *Clostridium histolyticum* SK B-8362 є в 7 разів вищою, а тривалість культивування даного продуцента є меншою, ніж *Penicillium aurantiogriseum* URM4622, можна зробити висновок, що кращим продуцентом для одержання колагенази є *Clostridium histolyticum* SK B-8362.

2.2. Морфолого-культуральні ознаки біологічного агента

Clostridium histolyticum SK B-8362 – це культура, яка являє собою грампозитивні палички, які можуть розташовуватися ізольовано, попарно або невеликими ланцюгами розміром 0,5-0,7 × 3,0-5,0 мкм. Клітини рухомі, мають перитрихіальне розміщення джгутиків, формують овальні спори, які розміщується субтермінально або центрально, капсулу не утворюють.

На твердому поживному середовищі з кров'яним агаром з додавання 5% дефібринованої крові барана *Clostridium histolyticum* утворює округлі дрібні (0,5-1,0 мм) гладкі випуклі напівпрозорі колонії сіро-білого кольору з хвилеподібним краєм. При культивуванні на рідких поживних середовищах (напіврідке середовище Рамона з м'ясним фаршем, бульйон Рамона з кров'яним порошком) *Clostridium histolyticum* росте у вигляді грудочок вати або утворює гіллясті колонії, при цьому спостерігається пухкий осад на дні або в товщі поживного середовища. Колір середовища від жовтого до темно-коричневого з помутнінням [4].

2.3. Фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента

Clostridium histolyticum є факультативним анаеробом, а саме аеротолерантним, здатним до росту і розмноження у діапазоні температури від 25 до 45°C, оптимальна температура становить 37°C, а оптимальне рН – 7,2-7,4. За типом живлення гемоорганотроф, ріст пригнічується за наявності 6,5% NaCl та 20% розчину жовчі.

Даний мікроорганізм гідролізує казеїну, желатину та нейромінідази. Не здатний до розщеплення арабінози, амідгаліну, целобіози, фруктози, галактози, глюкози, глікогену, гліцерину, лактози, мальтози, маніту, манози, сахарози, сорбіту, рибози, інозитулу, рафінози, рамнози, ксилази. *Clostridium histolyticum* не утворює лецитиназу, ліпазу, уреазу та індол.

Clostridium histolyticum чутливий до антибіотиків: левоміцетину, пеніциліну, еритроміцину та тетрацикліну [23, 24, 25, 26].

2.4. Таксономічний статус біологічного агента

Сучасна (філогенетична) класифікація для *Clostridium histoliticum* наведена згідно другого видання Керівництва Бергі з систематики бактерій [27]:

Домен – *Bacteria*

Відділ – *Firmicutes*

Клас – *Clostridia*

Порядок – *Clostridiales*

Родина – *Clostridiaceae*

Рід – *Clostridium*

РОЗДІЛ 3

ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

3.1. Потреба у цільовому продукті

Наразі відомо, що препарати на основі колагенази широко використовуються в медицині (офтальмології, хірургії) для профілактики і лікування рубцевих утворень. В офтальмологічній практиці ліофілізований ферментний препарат використовують для лікування вторинної катаракти та профілактики післяопікового симблефарона [1, 28].

Станом на 2017 рік захворюваність на очні хвороби складає 3227 людей на 100000 тис населення (населення України на той момент становило 42,584 млн.), з яких 10% належать травмам ока до яких, в тому числі, відносяться й опіки (15% всіх очних травм). З цього, можна зробити висновок, що 20613 людей отримують опіки очей та потребують профілактики післяопікового симблефарону.

За статистичними даними на 2017 рік в Україні близько 1300 людей на 100000 тис населення хворіло на катаракту [29, 30]. Як вже зазначалося вище, кількість населення на той час становила 42,584 млн., тому загальна кількість хворих складає:

$$N_{\text{хв}} = 42\,584\,000 \times 1300/100000 = 553\,592 \text{ хворих.}$$

У хірургії препарати колагенази використовують для профілактики та лікування рубцевих змін шкіри в результаті раневих поранень, опіків та відморожень. Проте використання ліофілізованого препарату з цією метою є недоцільним, оскільки наразі випускається значна кількість мазей та кремів для зовнішнього нанесення на місця ураження.

Відомо, що колагеназа випускається у вигляді ліофілізованого порошку в ампулах, що містять 1 г. препарату (по 500 ОД в 1 г.).

Доза препарату на добу для лікування вторинної катаракти складає 50 ОД, <i>НУХТ БТЕК 04.02.19 КР ПЗ</i>							
Зми.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розробник		Красько М.О.					
Керівник		Гудзенко О.В.					
Н. контр							
Консульт							
Зав. каф.		Стадніков В.П.					
РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування					Літера	Аркуш	Аркушів
						20	56
					Кафедра БТМ		

курс лікування становить 10 процедур, тоді можемо розрахувати потребу у колагеназі на курс для всіх хворих:

$$P_{\text{вк}} = 50 \times 10 \times 553592 / 500 = 553592 \text{ г} = 553,6 \text{ кг}$$

Для профілактики післяопікового симблефарону доза препарату на одну процедуру складає 10 Од, для дієвого результату необхідно пройти курс в 7 процедур, звідси можемо розрахувати потребу у препараті всіх хворих, що отримали опіки очей:

$$P_{\text{ппс}} = 10 \times 7 \times 20613 / 500 = 2885,8 \text{ г} = 2,9 \text{ кг}$$

Таблиця 3.1

Вихідні дані для розрахунку річної потреби населення України в препараті колагенази

Захворювання (профілактика)	Доза препарату на добу, Од	Курс лікування	Кількість хворих в Україні	Кількість препарату на річний курс лікування, кг
Лікування вторинної катаракта	50 Од	10 процедур	553 592	553,6
Профілактика післяопікового симблефарону	10 Од	7 процедур	20613	2,9
Всього				556,8

Отже, річна потреба населення України в ферментному препараті колагенази становить 557 кг.

3.2. Розрахунок потужності виробництва ферментного препарату колагенази

Можна стверджувати, що останні декілька років потреба у ферментних препаратах в різних галузях росте з розвитком сучасних методів їх використання. В основній сфері – медицині – навіть помітний деякий дефіцит препаратів на основі ферментів, в тому числі й колагенази [31].

Відомо, що на сьогодні препарати на основі колагенази випускають у вигляді мазей, кремів, лікувальних пов'язок та ліофілізованого порошку для приготування розчинів для ін'єкцій. За кордоном випускаються наступні комерційні препарати колагенази – мазі «Іруксол» та «Сантил», виробником

яких є компанія «Smith and Nephew» (Німеччина), проте дані препарати не зареєстровані в Україні [32].

На сьогодні в Україні єдиним виробником препарату на основі колагенази є ДП «ЕНЗИМ», який випускає крем-гель «Іруксан» для зовнішнього застосування при ранах, опіках, відмороженнях та ін. пошкодженнях, що можуть супроводжуватися рубцевими переродженнями шкіри [33]. Проте, як вже зазначалось, колагеназу використовують для лікування очних хвороб лише у вигляді ліофілізованого препарату (з метою подальшого розведення розчинниками та ін'єкційного введення), який випускається лише в Росії Федеральним державним унітарним підприємством «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактериальных препаратов» федерального медико-біологічного агентства, який на теперішній час можна придбати лише в онлайн-аптеках [28].

Тому в Україні дуже гостро виражена потреба у колагеназі в ліофілізованому стані, як і в багатьох інших країнах, оскільки медичні препарати на основі колагенази є дефіцитом на ринку і дуже цінуються споживачами, котрі готові замовляти такі препарати з закордону за дуже велику ціну [31].

При розрахунку потужності виробництва препарату колагенази необхідно врахувати, що за рахунок виробництва ферментного засобу виробником НІІВС СПб (Росія) та можливого експорту аналогів з інших закордонних країн є можливість забезпечити потребу в колагеназі на 75%. Отже, потужність нашого виробництва складе:

$$G_{\text{гп}} = 557 \times 0,25 = 140 \text{ кг.}$$

Отже, для забезпечення потреби населення у ферментному препараті колагенази необхідно аби потужність виробництва була достатньою для одержання 140 кг препарату.

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

Для розрахунку кількості виробничих циклів нам необхідно знати тривалість виробничого циклу ($T_{\text{цф}}$), який включає тривалість виробничого

біосинтезу (44 год) з врахуванням часу підготовки ферментера (10 год). Підготовка ферментера включає наступні етапи: миття та огляд апарату (1,5 год), перевірка на герметичність (2 год), стерилізація (2 год) та охолодження апарату (1 год), завантаження середовища (2 год), засів (0,5 год), вивантаження культуральної рідини (1 год). Прийmemo кількість робочих трудоднів (Трд) 30, тоді:

$$N_{\text{цк}} = 24 \times T_{\text{рд}} / T_{\text{цф}} = 24 \times 30 / 54 = 14 \text{ циклів}$$

Визначивши кількість циклів, можемо дізнатися кількість умовних кілограм ферменту, які одержимо за цикл:

$$G_{\text{цк}} = G_{\text{гп}} / N_{\text{цк}} = 140 / 14 = 10 \text{ кг.}$$

Знаючи, що стандартна активність колагенази становить 500 од/г препарату, можемо визначити кількість одиниць активності ферменту, що знаходяться одному умовному кілограмі:

$$A_{\text{цк}} = A_{\text{ст}} \times 1000 = 500 \times 1000 = 500000 \text{ Од фм / ум. кг препарату}$$

Кількість одиниць активності ферменту в культуральній рідині з врахуванням втрат активності при виділенні в 1 товарному кілограмі можемо розрахувати за формулою:

$$A_{\text{крт}} = A_{\text{кр}} \times 10^6 (1 - E_a) / P_{\text{кр}}, \text{ звідки}$$

$A_{\text{кр}}$ – це активність препарату в культуральній рідині (2000 од /мл); E_a – сумарні втрати активності при виділенні, які становлять 0,75; $P_{\text{кр}}$ – концентрація фермента в культуральній рідині (2 кг/м³)

$$\text{Отже, } A_{\text{крт}} = 2000 \times 10^6 (1 - 0,75) / 2 = 250 \times 10^6 \text{ Од/тов.кг}$$

За одержаними значеннями можна визначити кількість товарного ферменту за цикл:

$$G_{\text{цкт}} = A_{\text{цк}} \times G_{\text{цк}} / A_{\text{крт}} = 500000 \times 10 / 250 \times 10^6 = 0,02 \text{ тов.кг /цикл}$$

Об'єм культуральної рідини, що зливається за одну ферментацію розраховується з урахуванням втрат ферменту при виділенні ($E_{\text{св}}$), які становлять 80%, отже:

$$V_{\text{кр}} = K1 \times G_{\text{цкт}} \times C_{\text{гп}} / P_{\text{кр}} (1 - E_{\text{св}}) = 1,5 \times 0,02 \times 0,95 / 2 (1 - 0,8) = 0,071 \text{ м}^3 \\ = 71 \text{ л.}$$

Звідси, визначаємо робочий об'єм ферментера:

$$V_{\text{ф}} = V_{\text{кр}} / (1 - E_{\text{ф}}) = 71 / 1 = 71 \text{ м}^3$$

Приблизний геометричний об'єм ферментера становить:

$$V_{\text{пф}} = V_{\text{ф}} / K_{\text{ф}} = 71 / 0,7 = 101 \text{ м}^3$$

Отже, для виробничого біосинтезу колагенази обираємо ферментер об'ємом 100 л ($V_{\text{Гф}}$).

Уточнюємо значення коефіцієнту заповнення ферментеру, який має бути в діапазоні 0,7 – 0,8, оскільки культивування проводиться в анаеробних умовах:

$$K_{\text{уф}} = V_{\text{ф}} / V_{\text{Гф}} = 71 / 100 = 0,7.$$

За отриманим значенням можна зробити висновок, що об'єм ферментера було обрано вірно.

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для біосинтезу ферменту колагенази *Clostridium histoliticum* SK B-8362

За один виробничий цикл отримуємо 71 л культуральної рідини ($V_{\text{кр}}$). Отже, кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом складатиме:

$$V_{\text{роб.1}} = V_{\text{кр}} / (1 - E_{\text{ф}}) = 71 / 1 = 71 \text{ л}$$

Тому, виробничий біосинтез колагенази буде відбуватися у ферментері з робочим об'ємом 71 л.

Для розрахунку можливого геометричного об'єму ферментера ($V_{\text{ф}}$) потрібно обрати необхідний коефіцієнт заповнення ферментера ($K_{\text{зап}}$), а оскільки виробничий біосинтез відбувається в анаеробних умовах, то $K_{\text{зап}} = 0,7 - 0,8$.

$$V_{\text{ф}} = V_{\text{роб.1}} / K_{\text{зап}} = 71 / 0,7 = 101 \text{ л}$$

Тоді, прийmemo найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{сф}} = 100 \text{ л}$ та уточнюємо прийнятий коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап1}} = V_{\text{роб.1}} / V_{\text{сф}} = 71 / 100 = 0,7$$

Звідси, можна зробити висновок, що геометричний об'єм вибраний вірно, оскільки коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних значеннях.

Кількість посівного матеріалу становить 10% від об'єму поживного середовища, тому $X_{\text{ф}} = 10\%$ або 0,1

Тоді, кількість поживного середовища у ферментері становить:

$$V_{пс1} = V_{роб.1} / (1 + X_{ф}) = 71 / (1 + 0,1) = 64 \text{ л}$$

Розраховуємо кількість посівного матеріалу:

$$V_{пм1} = V_{роб.1} - V_{пс1} = 71 - 64 = 7 \text{ л}$$

Тоді розрахуємо робочий об'єм посівного апарату ($V_{роб.2}$) в якому можна отримати таку кількість інокуляту (7 л):

$$V_{роб.2} = V_{пм1} / (1 - E_{па}) = 7 / 1 = 7 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу складає 10% від поживного середовища ($X_{па}$ – доза посівного матеріалу для посівного апарата, що дорівнює 0,1). Тоді кількість поживного середовища у посівному апараті становить:

$$V_{пс2} = V_{роб.2} / (1 + X_{па}) = 7 / (1 + 0,1) = 6,3 \text{ л.}$$

Кількість інокуляту для посівного апарату становить:

$$V_{пм2} = V_{роб.2} - V_{пс2} = 7 - 6,3 = 0,7 \text{ л.}$$

Одержати 0,7 л посівного матеріалу можна шляхом культивування *Clostridium histoliticum* SK В-8262 в колбах об'ємом $V_{колб} = 750$ мл з коефіцієнтом заповнення $K_{зап3} = 0,2$.

Тоді, кількість колб для одержання необхідної кількості інокуляти буде складати:

$$N_{колб} = V_{пм2} / (V_{колб} \times K_{зап3}) = 0,7 / (0,75 \times 0,2) = 5 \text{ колб.}$$

Висновок стосовно розрахунку кількості стадій підготовки посівного матеріалу представлено в таблиці 3.2.

Таблиця 3.2

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

N стадії	Геометричний об'єм ферментера, V, л	Коефіцієнт заповнення, K _{зап} , частка	Робочий об'єм ферментера, V _{роб} , л	Об'єм поживного середовища, V _{пс} , л	Об'єм посівного матеріалу, V _{пм} , л
1	2	3	4	5	6
3.	100	0,7	71	64	7

Закінчення таблиці 3.2

<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>
2.	10	0,7	7	6,3	0,7
1.	0,750×5 колби	0,2	0,7	0,63	0,07

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу колагенази у ферментері об'ємом 100 л буде проходити в 2 етапи, а третім етапом буде власне виробничий біосинтез.

РОЗДІЛ 4

ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

4.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу

4.1.1. Обґрунтування вибору умов і способу культивування.

Оптимальною температурою для виробничого культивування факультативно анаеробного штаму *Clostridium histolyticum* SK B-8362 є 37 °С, а оптимальним значенням рН – 7,2-7,4. Такі умови є сприятливими для розвитку багатьох мікроорганізмів, зокрема мезофільних та нейтрофільних, що зумовлює можливість контамінації в процесі одержання колагенази. Для запобігання цьому є необхідність забезпечення асептичних умов під час біосинтезу, які досягаються шляхом стерилізації обладнання, комунікацій, поживного середовища для культивування.

Культивування продуцента *Clostridium histolyticum* SK B-8362 може здійснюватися поверхневим або глибинним способами. Але з урахуванням того, що при поверхневому культивуванні неможливо досягти асептичних умов та наразі воно використовується переважно для одержання ферментів з міцеліальних грибів, обираємо глибинне.

Незважаючи на те, що *Clostridium histolyticum* SK B-8362 є факультативним анаеробом, в процесі культивування у ферментері необхідно створювати строго безкисневі умови, аби забезпечити максимальний синтез колагенази з високою активністю. Це досягається шляхом відсутності подачі повітря у ферментер, оптимального вибору коефіцієнта заповнення та встановлення відповідних режимів обертання перемішуючого пристрою.

Колагеназу можна одержати в результаті культивування продуцента безперервним і періодичним способами. При періодичному процесі, на відміну від безперервного, можна досягти строго асептичних умов проведення

Зми.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	НУХТ БТЕК 04.02.19 КР ПЗ			
Розробник		Красько М.О.			РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми	Літера	Аркуш	Аркушів
Керівник		Гудзенко О.В.					27	56
Н. контр						Кафедра БТМ		
Консульт								
Зав. каф.		Стабніков В.П.						

культивування, а також максимального споживання субстрату, оскільки не відбувається внесення додаткових порцій середовища з одночасним вимиванням ще не спожитого. Враховуючи це, обираємо періодичний спосіб культивування.

4.1.2. Обґрунтування вибору типу ферментера.

Після ознайомлення з фізіолого-біохімічними ознаками продуцента та вибору способу культивування *Clostridium histolyticum* SK B-8362, обираємо конструкцію та оснащення ферментера, які залежать від умов культивування біологічного агента.

1. У процесі культивування продуцента колагенази строго анаеробні умови створюються за рахунок подачі у ферментер інертного газу (азоту) для відведення надлишку кисню. Також важливим для забезпечення даних умов є оптимальний вибір коефіцієнта заповнення ферментера та встановлення відповідного режиму обертання перемішуючого пристрою, що сприяє інтенсифікації масообмінних процесів культуральної рідини та одночасно використовується для запобігання утворенню піни (механічний спосіб піногасіння). Для цього доцільно обираємо лопатеву мішалку (має просту конструкцію та є переважно низькооборотною, що важливо при забезпеченні культивування в анаеробних умовах) з частотою 70 об/хв. Також ферментер має бути оснащений датчиками pO_2 та газоаналізатором для контролю концентрації кисню та вуглекислого газу відповідно.

2. Для підтримання температури культивування на сталому рівні ферментер має бути оснащений сорочкою та датчиком температури.

3. Для контролю підтримання оптимального значення рН при культивуванні продуцента колагенази, ферментер має бути оснащений датчиком рН.

Наразі відомо, що ферментери об'ємом 100 л з коефіцієнтом заповнення 0,7, виготовляє на замовлення компанія «BIORUS» (Росія) [<https://bio-rus.ru>]. Ці ферментери передбачають встановлення датчиків контролю температури та рН, також оснащені pO_2 -датчиком, газоаналізатором, насосами з регульованою швидкістю потоку для точного дозування необхідних реагентів та відповідним перемішуючим пристроєм. Отже, для проведення виробничого біосинтезу

необхідно замовити виробництво ферментера, оснащеного перемішувачим приладом та різноманітними датчиками для контролю проведення процесу.

4.1.3. Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря.

Продуцент *Clostridium histolyticum* SK B-8362 є факультативним анаеробом, а саме – аеротолерантним мікроорганізмом, який може рости в присутності кисню, але не здатен використовувати його для аеробного дихання. Проте внесення повітря на етапі культивування даного мікроорганізму є небажаним, оскільки за присутності кисню спостерігається повільний та незначний приріст біомаси. Саме тому на етапах вирощування посівного матеріалу та виробничого біосинтезу для забезпечення отримання необхідної кількості інокуляту та надсинтезу колагенази необхідно передбачити стадію підготовки інертного газу, з метою створення анаеробних умов, яка полягає в наступному: азот закуповується та поставляється на виробництво в балоні, звідки надходить до посівного апарату та ферментера після попереднього очищення в індивідуальних фільтрах, які встановлюються безпосередньо перед зазначеним обладнанням.

4.1.4. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів.

Виробництво ферментну колагенази проводиться упродовж 30 днів (розділ 3). Оптимальна площа виробничого приміщення, в якому розташовується ферментер об'ємом 100 л, посівний апарат об'ємом 10 л, збірники, автоклав та інше обладнання становить 30 м² (6 × 5 м). Загальна площа стін, при їх висоті – 2,5 м, становить $((5 \times 2,5) + (6 \times 2,5)) \times 2 = 55 \text{ м}^2$. Площа підлоги відповідно 30 м².

Санітарна підготовка приміщень здійснюється шляхом проведення щоденного та генерального прибирань з використанням мийних та дезінфікуючих засобів [34]. У виробничому приміщенні необхідно проводити обов'язкове щоденне миття та дезінфекцію підлоги, тобто за весь період виробництва кількість процесів миття складатиме 30 разів. Натомість оброблення інших поверхонь (стін, вікон, дверей) проводитиметься під час генерального прибирання, тобто 1 раз на 2 тижні (всього – 2 рази). Миття та

дезінфекція обладнання здійснюватиметься після кожного виробничого циклу (14 разів).

Площі поверхонь для проведення миття та дезінфекції визначено в *таблиці 4.1.*

Таблиця 4.1.

Розрахунок загальної площі миття та/або дезінфекції оброблюваних об'єктів за весь період виробництва ферменту колагенази

Об'єкт миття та/або дезінфекції	Площа (об'єм) оброблюваного об'єкту, м ² (л)	Кількість процесів миття та/або дезінфекції за весь період виробництва	Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м ² (л)
Обладнання, інвентар, комунікації	200	14	2800
Підлога	30	30	900
Стіни, двері, вікна	60	2	120

Миючі та дезінфікуючі засоби обираються з врахуванням властивостей хімічної речовини (хімічної природи, концентрації, токсичності та ін.), об'єкту, що підлягає обробці (підлога, стіни, обладнання), характеру і ступеня його забруднення. При виборі дезінфікуючих засобів варто звертати увагу на характер мікробіоти оброблюваної поверхні. Також, досить важливими показником є вартість розчинів для оброблення необхідної площі приміщень [35].

Миючі засоби – це група засобів побутової та професійної хімії, котрі призначені для очищень різноманітних поверхонь і матеріалів від всілякого роду забруднень [36].

Для миття обладнання широко використовують **каустичну соду**. Її випускають у вигляді білого порошку без запаху або в вигляді концентрованого розчину (44-50%). Володіє високими мийними властивостями та застосовується для очищення жирових та органічних забруднень. Використовують для миття обладнання, посуду, інвентарю та тари в концентрації 2,0 % (робочий розчин). Одним з недоліків є летючість, а також здатність викликати подразнення слизових оболонок та шкіри, що є досить небезпечно для людини, що працює з

даним засобом. Також негативним моментом є здатність спричиняти корозію металів [37, 38].

Серед сучасних засобів на ринку досить поширеним є мийний засіб **Біомой**, який випускається у вигляді порошку білого чи світло-жовтого кольору. Окрім мийних властивостей має також дезінфікуючий ефект та застосовується для видалення білкових, жирових забруднень, залишків крові. Використовують для миття обладнання, посуду та інвентарю в концентрації 0,3%, а також для миття поверхонь приміщень та підлоги в концентрації 0,5%. Не проявляє шкідливої дії на здоров'я людини та не призводить до псування оброблювальних поверхонь [39].

Бланідаз – це концентрований миючий засіб, призначений для миття підлоги та інших водостійких поверхонь (стін та вікон, зокрема). Здатен очищати забруднення будь-якого виду. Концентрація робочого розчину становить 0,5%. Даний засіб є нешкідливим для здоров'я людини, після використання не залишає розводів [40].

Дезінфекція – це комплекс заходів, спрямованих на повне або часткове знищення патогенних для людини мікроорганізмів на об'єктах зовнішнього середовища для розриву шляхів передачі збудника [41].

Біонол – це дезінфікуючий засіб, що належить до класу пероксидантів (ПАР) та проявляє миючі властивості. Володіє широким спектром антимікробної дії – проявляє бактерицидні, віруліцидні, фунгіцидні та спороцидні властивості. Даний засіб застосовують для дезінфекції обладнання та інвентарю, різноманітних поверхонь виробничих приміщень (стіни, вікна, підлога). Витрати розчину на 1 м² становлять 100 мл. Для оброблення поверхонь застосовують робочий розчин концентрацією 1% [42].

Біолонг – це дезінфікуючий засіб, з мийними властивостями. За спектром антимікробної дії виявляє бактерицидні, туберкулоцидні, віруліцидні, фунгіцидні та спороцидні властивості. Також характеризується пролонгованою дією в концентрації не менше 4% протягом 7 діб. Витрати розчину на 1 м² становить 100 мл. Використовується для дезінфекції поверхонь виробничих приміщень,

обладнання та інвентарю у концентрації 0,5%, якщо ж поверхні занадто забруднені різноманітними мікроорганізмами, то допускається застосовувати засіб з концентрацією робочого розчину до 4%. Належить до класу малонебезпечних речовин, отже не проявляє шкідливої дії на здоров'я людини [43].

Дезактин – це дезінфікуючий засіб, що належить до класу хлорактивних дезінфектантів III покоління. Проявляє миючі властивості. Володіє широким спектром антимікробної дії: бактерицидна, віруліцидна, фунгіцидна та спороцидна. Застосовується для оброблення поверхонь, обладнання, інвентарю. Концентрація робочого розчину становить 0,2%. Витрати дезінфікуючого засобу – 100 мл/м². Водні розчини дезактину після використання не залишають розводів [44].

Полідез – це дезінфікуючий засіб, що належить до класу пероксидантів (гуанідинові сполуки) і проявляє миючі та дезодоруючі властивості. За спектром антимікробної дії володіє бактерицидними (включаючи збудників туберкульозу), віруліцидними та фунгіцидними властивостями. Застосовується для дезінфекції різноманітних поверхонь приміщень, інвентарю, обладнання, тари у концентрації 0,3%. Витрата робочого розчину дезінфікуючого засобу складає 100 мл/м². Даний засіб у робочих концентраціях є безпечним для людини та не спричиняє пошкоджувальної дії (в тому числі корозійної) на оброблювані поверхні [45].

Узагальнена характеристика витрат мийних та дезінфікуючих засобів, а також їх вартість наведені в *таблиці 4.2*.

Проаналізувавши наведені дані, можна зробити наступні висновки:

- для миття та дезінфекції обладнання, інвентарю та комунікацій доцільно використовувати дезінфікуючий засіб Біомой, оскільки він окрім дезінфікуючої дії володіє й миючими властивостями та є найбільш доступним за вартістю;

- для миття та дезінфекції підлоги, стін, вікон, дверей доцільним буде використання Дезактину та Біолонгу, оскільки вони належать до мийно-

дезінфікуючих засобів, що діють за низьких концентрацій робочих розчинів – це дасть змогу заощадити кошти.

Варто додати, що для запобігання розвитку резистентних форм мікроорганізмів засоби необхідно застосовувати з інтервалом в 3 місяці.

Отже, миття ферментера об'ємом 100 л, посівного апарату (10 л) та збірників, які використовують для приготування композицій середовища, здійснюватиметься циркуляційним способом. Для одного циклу обробки необхідно витратити близько 100 л робочого розчину мийно-дезінфікуючого засобу, натомість для всього періоду виробництва – 1400 л.

Також важливим є чистота повітря у виробничому приміщенні. Для забезпечення цього використовується фізичний метод дезінфекції з застосуванням ультрафіолетового випромінювання, тобто з використанням стельових бактерицидних ламп (довжина хвилі – 250-266 нм) з періодичним включенням – на 30 хв кожного робочого дня та на 1 год після проведення генерального прибирання.

Таблиця 4.2.

Узагальнена характеристика витрат мийних та дезінфікувальних засобів для виробництва колагенази

Назва миючого/ дезінфікуючого засобу	Об'єкт миття та/або дезінфекції	Концентрація робочого розчину, %	Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м ² (л)	Кількість робочого розчину за весь період виробництва, л	Вартість 1 л/кг мийного або дезінфікувального засобу, грн	Загальна вартість миття та/або дезінфекції за весь період виробництва, грн
Каустична сода	Обладнання, інвентар, комунікації	2,0	2800	1400	15	420
Біомой	Обладнання, інвентар, комунікації	0,3	2800	1400	150	630
Полідез	Обладнання, інвентар, комунікації	0,3	2800	1400	180	756
Бланідаз	Підлога	0,5	900	90	32	16
Біонол	Стіни, двері, вікна, підлога	0,5	1020	102	250	125
Біолонг	Стіни, двері, вікна, підлога	0,5	1020	102	83	41,5
Дезактин	Стіни, двері, вікна, підлога	0,2	1020	102	325	65

4.2. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Максимальний рівень активності колагенази (2000 од/мл) досягається за умов росту мікроорганізму *C. histolyticum* SK B-8362 на поживному середовищі з наступним складом (г/л):

Яловича кров – 5 % (50 мл);

Пептон – 10;

Екстракт м'ясний – 10;

Глюкоза – 10;

Натрію хлорид – 5.

Згідно проведених розрахунків (див. розділ 3) виробничий біосинтез здійснюється у ферментері об'ємом 100 л. Підготовка посівного матеріалу проходить в 2 етапи: у колбах та в інокуляторі об'ємом 10 л.

4.2.1. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах.

Після ретельного аналізу складу поживного середовища для культивування *Clostridium histolyticum* SK B-8362, можемо розділити його на композиції залежно від режиму стерилізації:

Композиція А: глюкоза, пептон, м'ясний екстракт (режим стерилізації: 112°C, 30 хв).

Композиція В: натрію хлорид (режим стерилізації: 131°C, 40 хв).

Для вирощування початкового посівного матеріалу в колбах потрібно 0,63 л поживного середовища, тому стерилізація буде здійснюватися в автоклаві. Компоненти, що входять до композиції А є термолабільними і потребують м'якого режиму стерилізації. Сіль натрію хлориду (композиція В) навпаки є термостабільним компонентом та стерилізується при стандартній для солей температурі. Яловичу кров не стерилізую так як вона закуповується уже в стерильному вигляді.

4.2.2. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 10 л.

Для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 10 л необхідно приготувати 6,3 літри поживного середовища, склад композицій при цьому залишається незмінним:

Композиція А: глюкоза, пептон, м'ясний екстракт (режим стерилізації: 112°C, 30 хв).

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

Розчин глюкози, пептону та м'ясного екстракту стерилізують в автоклаві, оскільки його об'ємом є невеликим (1,5 л). Стерилізацію композиції Б проводять безпосередньо в інокуляторі. По закінченню стерилізації в інокулятор вносять композицію А і стерильний розчин яловичої крові.

4.2.3. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 100 л.

Поділ компонентів на композиції залежно від режиму стерилізації для виробничого біосинтезу буде залишатися незмінним.

Композицію А (розчин глюкози, пептону та м'ясного екстракту) готують та стерилізують в окремому реакторі-змішувачі об'ємом 10 л. Розчин натрію хлориду готують в реакторі-змішувачі об'ємом 10 л, натомість стерилізацію даної композиції проводять безпосередньо у виробничому ферментері. Після стерилізації композиції Б у ферментер самоплином подають композицію А та за допомогою перистальтичного насоса стерильний розчин яловичої крові, який зберігається в збірнику об'ємом 5 л.

РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Таблиця 5.1

Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу колагенази

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
Б-1	Балон з інертним газом	1	Балон для азоту об'ємом 20 л, з робочим тиском 14,7 МПа [46]
ІФ-2 ІФ-10	Індивідуальний фільтр	2	Індивідуальний фільтр НЕРА класу очищення Н14, ефективність очищення 99,995%. Виробник: «NEW FILTER». Площа фільтруючої поверхні до 20 м ² , пропускна здатність 2000 м ³ . Витримує температуру повітря до 70 °С; не містить силікон [47]
ІН-3	Інокулятор для вирощування посівного матеріалу об'ємом 10 л	1	Інокулятор з робочим об'ємом 10 л, виготовлений з нержавіючої сталі AISI 304L. Модель – Biostat Cplus. Обладнаний сорочкою та мішалкою з частотою перемішування 20-1500 об/хв. Витримує тиск до 0,2 МПа [48]
ДЗ-4 ДЗ-6	Об'ємно-ваговий дозатор	2	Насос-дозатор автоматичний. Продуктивність – 15 л/год. [49]
Р-5 Р-7	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації компонентів середовища	2	Реактор сталевий емальований, оснащений паровою сорочкою та лопатевою мішалкою з частотою перемішування 100 об/хв. Загальний об'єм - 10 л., довжина – 420 мм; висота - 500 мм; ширина – 350 мм. Виконаний на замовлення в «ГК Єврохіммаш К.О.» (Україна) [50]
З-8	Збірник для зберігання стерильного розчину яловичої крові	1	Збірник з нержавіючої сталі 316L оснащений паровою сорочкою та перемішувачем. Загальний об'єм 5 л, діаметр 450 мм, висота 1430 мм [51]
Ф-10	Ферментер	1	Ферментер об'ємом 100 л, виготовлений з нержавіючої сталі 316L. Оснащений паровою сорочкою, пробовідбірником, датчиками контролю температури, рН та турбінною мішалкою з частотою перемішування 50-800 об/хв. Витримує тиск – 0,3 МПа. Виробник: «BIORUS» [52]

<i>НУХТ БТЕК 04.02.19 КР ПЗ</i>				
<i>Зми.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>
<i>Розробник</i>		<i>Красько М.О.</i>		
<i>Керівник</i>		<i>Гудзенко О.В.</i>		
<i>Н. кантр</i>				
<i>Консульт</i>				
<i>Зав. каф.</i>		<i>Стадніков В.П.</i>		
РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання			<i>Літера</i>	<i>Аркуш</i>
				<i>37</i>
			<i>Кафедра БТМ</i>	
			<i>Аркушів</i>	<i>56</i>

РОЗДІЛ 6

ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ КОЛАГЕНАЗИ

Технологічна схема біосинтезу колагенази *Clostridium histolyticum* включає проведення допоміжних робіт (підготовка інертного газу, приготування і стерилізація поживних середовищ) та безпосередньо технологічний процес (підготовка посівного матеріалу і біосинтез цільового продукту).

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

ДР 1. Підготовка інертного газу для культивування

ДР 1.1. Подача азоту

Інертний газ подають з балону, для очищення використовують індивідуальні фільтри (ІФ-2, ІФ-10), які встановлюються безпосередньо перед інокулятором та ферментером. Ступінь очищення становить 99,9% (ТП 3.4, ТП 4.1).

ДР 2. Приготування і стерилізація поживних середовищ

ДР 2.1. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах

Розрахунок необхідних компонентів для приготування поживного середовища об'ємом 0,63 л для подальшого вирощування посівного матеріалу в колбах наведений в таблиці 6.1.

Таблиця 6.1

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в колбах

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 0,63 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, V, мл
Глюкоза	10	6,3	А	269
Пептон	10	6,3		

Зми.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	НУХТ БТЕК 04.02.19 КР ПЗ			
Розробник		Красько М.О.			РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми біосинтезу колагенази	Літера	Аркуш	Аркушів
Керівник		Гудзенко О.В.					38	56
Н. контр						Кафедра БТМ		
Консульт								
Зав. каф.		Стадніков В.П.						

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 0,63 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, V, мл
Екстракт м'ясний	10	6,3	А	269
Вода		250 (мл)		
Натрію хлорид	5	3,5	Б	396
Вода		396 (мл)		
Яловича кров	50 (мл)	35 (мл)		35
Усього				700

ДР 2.1.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 6,3 г глюкози, 6,3 г сухого м'ясного екстракту та 6,3 г пептону. Наважку поміщають в колбу об'ємом 500 мл, додають 250 мл питної води, перемішують. Колбу закривають ватно-марлевым корком та поміщають в автоклав. Приготовлений розчин стерилізують при $t = 112^{\circ}\text{C}$ (30 хв).

ДР 2.1.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 3,5 г солі натрію хлориду. Наважку поміщають у колбу об'ємом 1 л, додають 396 мл питної води та перемішують до повного розчинення солі. Колбу закривають ватно-марлевым корком та стерилізують в автоклаві при $t = 131^{\circ}\text{C}$ (40 хв).

ДР 2.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для інокулятора об'ємом 10 л

Для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 10 л (ІН-3), потрібно приготувати 6,3 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування поживного середовища зазначеного об'єму наведено у таблиці 6.2.

Засів інокулятора здійснюється 0,7 л посівного матеріалу. При розрахунку загального об'єму води, потрібного для приготування композицій необхідно врахувати конденсат (10% від об'єму поживного середовища), що утворюється в результаті стерилізації гострою парою безпосередньо в посівному апараті, виходячи з цього об'єму води становитиме 5,4 л.

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 10 л

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 6,3 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, V, л
Глюкоза	10	63	А	1,5
Пептон	10	63		
Екстракт м'ясний	10	63		
Вода		1,4 л		
Натрію хлорид	5	31,5	Б	4,1
Вода		4 (л)		
Конденсат		0,4		0,4
Яловича кров	50 (мл)	315 (мл)		0,315
Усього				6,3

ДР 2.2.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 63 г глюкози, 63 г сухого м'ясного екстракту та 63 г пептону. Наважку переносять у колбу об'ємом 2 л, додають 1,4 л води, перемішують до повного розчинення компонентів. Стерилізацію проводять в автоклаві при 112°C упродовж 30 хв.

ДР 2.2.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 31,5 г солі натрію хлориду. Наважку поміщають у колбу об'ємом 2,5 л, додають 1,5 л води та ретельно перемішують до повного розчинення. Після цього композицію переливають в посівний апарат об'ємом 10 (ІН-3) л та стерилізують при 131°C (0,15 МПа) упродовж 40 хв.

ДР 2.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для ферментера об'ємом 100 л

Вміст компонентів для приготування 64 л поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 100 л (ІН-11) наведено у таблиці 6.3.

Для засіву даного інокулятора потрібно внести 7 л посівного матеріалу. Також враховується конденсат (10% від об'єму поживного середовища), що утворюється в результаті стерилізації гострою парою безпосередньо в посівному апараті. Отже, загальний об'єм води для приготування поживного середовища становитиме 53,5 л.

Таблиця 6.3

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 100 л

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 64 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, V, л
Глюкоза	10	640	А	9,28
Пептон	10	640		
Екстракт м'ясний	10	640		
Вода		8 (л)		
Конденсат		0,9 (л)		0,9
Натрію хлорид	5	320	Б	45,8
Вода		45,5 (л)		
Конденсат		4,82 (л)		
Яловича кров	50 (мл)	3,2 (л)		3,2
Усього				64

ДР 2.3.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 0,64 кг глюкози, 0,64 кг сухого м'ясного екстракту та 0,64 кг пептону і поміщають у реактор об'ємом 10 л (Р-5), обладнаний сорочкою, і за допомогою об'ємно-вагового дозатора (ДЗ-4) додають 8 л води. Для кращого розчинення компонентів у сорочку збірника подають гарячу пару і нагрівають розчин до 40°C при перемішуванні 50 об/хв. Стерилізацію проводять безпосередньо у збірнику при 112°C упродовж 30 хв.

ДР 2.3.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 320 г солі натрію хлориду. Наважку поміщають у реактор об'ємом 10 л (Р-7), обладнаний сорочкою, і за допомогою об'ємно-вагового дозатора (ДЗ-6) додають 7 л води. Для забезпечення кращого розчинення компоненту у сорочку збірника подають гарячу пару і нагрівають

розчин до 40°C при перемішуванні 50 об/хв. Потім розчин самоплином подають в інокулятор об'ємом 100 л (ІН-11) обладнаний сорочкою і мішалкою, та додають 38,5 л води. Стерилізацію проводять безпосередньо у посівному апараті при 131°C (0,15 МПа) упродовж 40 хв.

ТП 3. Підготовка посівного матеріалу

ТП 3.1. Підтримання колекційної культури

Отриману колекційну культуру *Clostridium histolyticum* SK В-8362 зберігають у ліофільно висушеному стані за температури $5\pm 3^\circ\text{C}$. Термін зберігання становить близько 3-4 місяці. Всі роботи з колекційною культурою проводять в асептичних умовах.

ТП 3.2. Одержання робочої культури

Ліофілізовану колекційну культуру відновлюють шляхом внесення до ампул з ліофілізованим зразком 1 мл фізіологічного розчину натрію хлориду, вміст ретельно перемішують. Стерильною градуйованою піпеткою набирають суспензію мікроорганізмів та пересівають в пробірку з 10 мл рідкого поживного середовища Рамона, пробірку закривають гумовою пробкою. З метою забезпечення анаеробних умов всі операції проводяться в анаеробному боксі. Аналогічно проводять засів ще 4 пробірок з наступним інкубуванням в анаеростаті при температурі 37°C протягом 24.

ТП 3.3. Вирощування інокуляту в колбах

В асептичних умовах в колбу об'ємом 1 л зі стерильною композицією Б (від ДР 2.1.2) зливають простерилізовану композицію А (від ДР 2.1.1). Після цього до одержаного середовища піпеткою вносять 35 мл яловичої крові з колби об'ємом 100 мл, всі компоненти ретельно перемішують і розливають в п'ять стерильних колб на 750 мл.

В анаеробному боксі з пробірки з робочою культурою *Clostridium histolyticum* SK В-8362 (від ТП 3.2) градуйованою стерильною піпеткою набирають суспензію мікроорганізмів та вносять в колбу з поживним середовищем. Для засіву однієї колби використовують бактеріальну суспензію, одержану з однієї пробірки. Колби закривають ватно-марлевими корками та

поміщають в анаеростат для забезпечення анаеробних умов і культивують при температурі 37°C протягом 44 годин.

ТП 3.4. Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 10 л

В інокулятор об'ємом 10 л зі стерильною композицією Б (від ДР 2.2.2) вносять 1,5 л розчину композиції А (від ДР 2.2.1) та 315 мл яловичої крові з колби об'ємом 500 мл. Через засівну колбу вносять підготовлений посівний матеріал (від ТП 3.3).

В інокуляторі забезпечуються анаеробні умови шляхом пропускання інертного газу (від ДР 1.1) та відповідного режиму роботи перемішуючого пристрою (вмикається кожну годину на 20 хв з частотою 70 об/хв). Культивування проводять при температурі 37 °С протягом 44 год.

Кожні 8 годин відбирають пробу культуральної рідини для проведення мікробіологічного контролю.

ТП 4. Виробничий біосинтез

ТП 4.1. Виробниче культивування у ферментері об'ємом 100 л

У ферментер об'ємом 100 л з простерилізованою композицією Б (від ДР 2.3.2) самоплином вносять простерилізовану композицію А (від ДР 2.3.1) та розчин стерильної яловичої крові зі збірника об'ємом 5 л. Через трубу перетискування посівний матеріал перекачують з інокулятора (ІН-3) у ферментер (від ТП 3.4).

У ферментері забезпечують анаеробні умови подачею інертного газу (від ДР 1.1), вмикають перемішуючий пристрій, який працює 20 хв на годину з частотою 70 об/хв. Культивування проводять при температурі 37°C упродовж 44 годин до досягнення колагеназної активності в межах 1500-2000 од/мл.

РОЗДІЛ 7

КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА КОЛАГЕНАЗИ

Упродовж промислового виробництва колагенази періодично (кожні 8 годин), з додержанням асептичних умов, відбирають проби для контролю стерильності поживних середовищ, посівного матеріалу та культуральної рідини в процесі біосинтезу. Також обов'язково проводять визначення та контроль показників росту і біосинтезу, а саме: активності колагенази, концентрації джерела вуглецю (глюкози) та азоту (м'ясного екстракту та пептону, що містять амінний азот).

7.1. Мікробіологічний контроль

Мікробіологічний контроль біотехнологічного процесу включає проведення контролю стерильності поживного середовища та контролю посівного матеріалу на відсутність сторонньої мікробіоти.

Контроль стерильності поживних середовищ проводять шляхом інкубування в термостаті засіяних досліджуваним простерилізованим поживним середовищем чашок Петрі з відповідним агаризованим середовищем. Після закінчення терміну інкубації проводять візуальний контроль чашок Петрі на відсутність в досліджуваному поживному середовищі ознак росту мікроорганізмів [34, 53].

Методика виконання посіву: стерильною градуйованою піпеткою з об'єму проби досліджуваного поживного середовища (50 мл) відбирають 0,1 мл та вносять в чашку Петрі, яку заливають 15-20 мл розплавленого та охолодженого до 45-50°C середовища (м'ясо-пептонний агар використовують для виявлення бактерій, СА – для виявлення грибів та дріжджів). Обережними обертальними рухами перемішують вміст чашки Петрі, попередньо виставленої на рівну горизонтальну поверхню та залишають закритою за кімнатної температури до застигання агару.

					<i>НУХТ БТЕК 04.02.19 КР ПЗ</i>			
<i>Зми.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва колагенази	<i>Літера</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розробник</i>		<i>Красько М.О.</i>					44	56
<i>Керівник</i>		<i>Гудзенко О.В.</i>						
<i>Н. кантр</i>								
<i>Консульт</i>								
<i>Зав. каф.</i>		<i>Стадніков В.П.</i>				<i>Кафедра БТМ</i>		

Потім інкубують в термостаті при температурі 30-32°C протягом 6-8 годин, після чого проводять аналіз посівів [34, 54].

Мікробіологічний контроль посівного матеріалу здійснюється шляхом прямого висіву посівного матеріалу і культуральної рідини на агаризовані поживні середовища з наступним мікроскопіюванням мікроорганізмів окремих колоній, що вирости після інкубування.

Прямий висів на агаризоване середовище (м'ясо-пептонний агар використовують для виявлення бактерій, сусло-агар або агар Сабуро – для грибів та дріжджів) проводять в анаеробному боксі, оскільки біологічний агент є анаеробом.

Підготовка чашок Петрі: в стерильні чашки Петрі розливають по 20-30 мл розплавленого на киплячій водяній бані агаризованого середовища. Чашки залишають на горизонтальній поверхні до застигання агару, потім витримують 2-3 дні при 30°C кришками донизу для підсихання поверхні середовища.

Виконання посіву: стерильною піпеткою відбирають 0,1 мл з об'єма проби культуральної рідини і наносять на поверхню необхідного агаризованого середовища (МПА або СА), після чого суспензію розсівають шпателем Дригальського на поверхні середовища. Засіяні чашки Петрі поміщають в анаеростат та інкубують при температурі 37°C [34, 55].

Після інкубування проводять візуальну оцінку колоній. На твердому поживному середовищі *C. histolyticum* утворює, як правило, округлі дрібні (0,5-1,0 мм) гладкі випуклі напівпрозорі колонії сіро-білого кольору з хвилеподібним краєм. При виявленні колоній сторонніх мікроорганізмів проводять мікроскопіювання.

Мікроскопіювання. Для проведення мікроскопіювання ізольованих колоній готують препарат «роздавлена крапля» з наступним використанням в процесі дослідження світлового мікроскопа. За відсутності сторонньої мікробіоти при мікроскопіюванні можна побачити клітини *C. histolyticum* SK B-8362 у вигляді грампозитивних паличок, які можуть розташовуватися ізольовано, попарно або невеликими ланцюгами розміром 0,5-0,7 × 3,0-5,0 мкм. Клітини рухомі, мають

перитрихіальне розміщення джгутиків, формують овальні спори, які розміщується субтермінально або центрально, капсулу не утворюють [4].

7.2. Контроль показників росту і біосинтезу

7.2.1. Визначення активності колагенази.

Для визначення активності колагенази використовують метод, який базується на здатності ферменту розщеплювати колаген, в результаті чого здійснюється вивільнення і перехід в розчин продуктів гідролізу, концентрацію яких визначають спектрофотометричним методом. [56].

Методика проведення. В пробірку вносили по 0,1 мл культуральної рідини, після цього додавали по 1,9 мл 1% суспензії субстрату (колагену), отриману суміш інкубували в термостаті при 37°C протягом 5 годин. Після закінчення терміну інкубації в кожену пробірку вносили по 2 мл 20% розчину трихлороцтової кислоти (ТХО). При постановці контрольних проб реагенти вносили у зворотному порядку: фермент, трихлороцтова кислота, субстрат. Наявність колагеназної активності встановлювали за накопиченням амінного азоту, який визначали нінгідриновим методом.

За одиницю активності приймали кількість амінного азоту, еквівалентного 1 мкмоль лейцина, який вивільнявся з субстрату за обраних умов ферментації протягом 1 год [57].

7.2.2. Визначення концентрації джерела вуглецю.

Джерелом вуглецю в середовищі для культивування *Clostridium histolyticum* SK В-8362 є глюкоза. Для визначення її концентрації в культуральній рідині використовують глюкозооксидазний метод, який базується на здатності ферменту глюкозооксидази окислювати глюкозу в присутності молекулярного кисню з наступним утворенням пероксиду водню, який під дією пероксидази реагує з о-толуїдиновим реактивом, в результаті чого утворюються забарвлені продукти, оптичну густину яких визначають за допомогою спектрофотометра [58].

Робочий реактив для проведення дослідження готували наступним чином: до 70 мл 0,25 Н ацетатного буферного розчину (рН = 4,8) додавали 2 мг

глюкозооксидази і 1 мг кристалічної пероксидази. Суміш ретельно перемішували, після чого до неї доливали 1 мл 1% розчину о-толуїдину, доводили об'єм проби ацетатним буфером до 100 мл.

Методика проведення. В пробірку з 1 мл попередньо підготовленої культуральної рідини (проводили центрифугування з метою одержання безклітинного розчину) вносили 3 мл робочого реактиву для визначення глюкози. Одночасно в аналогічні пробірки, що містили по 1 мл розчину глюкози (з концентрацією 50, 100, 200, 250, 300, 250, 400 мкг/мл) і в контрольну пробірку з 1 мл води також вносили 3 мл робочого реактиву. Оптичну густину отриманих розчинів визначали на спектрофотометрі при довжині хвилі – 670 нм (кювета шириною 10 мм). На підставі отриманих величин оптичної густини для всіх стандартних розчинів глюкози, будували градуйовану залежність по якій і визначали кількість глюкози в досліджуваній пробі [59].

7.2.3. Визначення концентрації джерела азоту.

Джерелами азоту в середовищі для культивування *Clostridium histolyticum* SK B-8362 є пептон та м'ясний екстракт, які містять в своєму складі амінний азот. Для визначення амінного азоту використовують метод формольного титрування, принцип якого базується на блокуванні формальдегідом вільних аміногруп амінокислот з подальшим визначення кількості титрувального розчину, який пішов на нейтралізацію карбоксильних груп (кількість яких пропорційна кількості амінних груп). Початок і кінець титрування визначається потенціометричним методом.

Реактиви: 0,1 н натрію гідроксиду або розчин соляної кислоти (0,1 моль/л); розчин формаліну (40% розчин формальдегіду); 10% розчин натрію гідроксиду.

Методика проведення. Попередньо перед проведенням аналізу необхідно провести підготовку культуральної рідини шляхом фільтрування для одержання безклітинного розчину. Після цього в стакан об'ємом 50 мл наливають 10 мл одержаного фільтрату і доводять об'єм водою до 20 мл.

Електроди потенціометра поміщають в одержаний розчин, рН якого доводять до 7,0 шляхом додавання розчину 0,1 н NaOH або 0,1 н HCl. До нейтралізованого розчину додають 2 мл нейтрального формаліну (рН якого доводять до 7,0 використовуючи 10% розчин натрію гідроксиду), перемішують та, не виймаючи електродів, титрують розчином 0,1 н NaOH до рН 9,1.

Вміст амінного азоту в культуральній рідині визначають за формулою:

$$X = \frac{V \times K \times 1,4}{C}, \text{ мг}$$

де, V – кількість розчину 0,1 н NaOH, яка пішла на титрування досліджуваного розчину, мл;

K – поправка до титру розчину натрію гідроксиду (0,1 моль/л);

1,4 – кількість амінного азоту в мг, еквівалентне 1 мл розчину натрію гідроксиду (0,1 моль/л);

C – кількість досліджуваного розчину, мл [60, 61].

7.3. Карта постадійного контролю біосинтезу колагенази

Таблиця 7.1

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю та показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та відбору проб	Нормативні значення показника
1	2	3	4	5
Кт 1.1 Подача азоту	Очищений азот, ступінь очищення	Перевірка ступеня очищення згідно паспорту індивідуального фільтра	Після очистки газу в індивідуальному фільтрі	$E = 99,9\%$
Кт, Км 2.1.1, 2.2.1, 2.3.1 Приготування та стерилізація поживних середовищ Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А Тиск, температура, час, стерильність	Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P = 0,05$ МПа, $t = 112^{\circ}\text{C}$, $\tau = 30$ хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 2.1.2, 2.2.2, 2.3.2 Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція В Тиск, температура, час, стерильність	Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P = 0,15$ МПа, $t = 131^{\circ}\text{C}$, $\tau = 40$ хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.1 Підтримання колекційної культури	Колекційна культура <i>Clostridium histoliticum</i> SK В-8362 Температура, тривалість зберігання	Термометр	Температуру контролюється протягом всього часу зберігання культури	$t = 5 \pm 3^{\circ}\text{C}$, $\tau = 3-4$ міс.
Кт, Км 3.2 Одержання робочої культури	Робоча культура <i>Clostridium histoliticum</i> SK В-8362 Температура, тривалість вирощування, відсутність сторонньої мікробіоти	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура контролюється безперервно під час культивування Мікробіологічний контроль проводять кожні 8 год	$t = 37^{\circ}\text{C}$, $\tau = 24$ год, відсутність сторонньої мікробіоти

Закінчення таблиці 7.1

1	2	3	4	5
Кт, Км 3.3 <i>Вирощування інокуляту в колбах</i>	Посівний матеріал, температура, тривалість вирощування культури, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура контролюється автоматично протягом всього часу вирощування культури, мікробіологічний контроль кожні 8 годин	$t = 37^{\circ}\text{C}$, $\tau = 44$ год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 3.4 <i>Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 10 л</i>	Посівний матеріал, Температура, тривалість вирощування, частота обертів мішалки, мікробіологічна чистота культури, морфологічна відповідність організмів	Термометр технічний, годинник, технічний тахометр, мікроскоп	Температура та швидкість обертання контролюється автоматично протягом всього часу вирощування культури, мікроскопіювання кожні 8 годин	$t = 37^{\circ}\text{C}$, $\tau = 44$ год, $\omega = 70$ об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 4.1 <i>Виробниче культивування у ферментері об'ємом 100 л</i>	Культуральна рідина, Температура, тривалість культивування, частота обертів мішалки, рівень рН, мікробіологічна чистота культури, активність колагенази	Термометр технічний, годинник, тахометр технічний, датчик рН, мікроскоп	Температура, рівень рН та швидкість обертання контролюється та підтримується автоматично протягом всього часу культивування, мікробіологічний контроль кожні 8 годин	$t = 37^{\circ}\text{C}$, $\tau = 44$ год, $\text{pH} = 7,2-7,4$, $\omega = 70$ об/хв, активність колагенази - 2000 од/мл, відсутність сторонньої мікробіоти

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Конон А.Д. Особенности биотехнологий клостридиальных коллагеназ – перспективных ферментов медицинского назначения / Конон А.Д., Петровский С.В., Шамбутова М.Ю., Уварова А.В., Козлова Ю.О., Григорьева М.В., Москвичев Б.В. // Медицина экстремальных ситуаций. – 2016. – №2. – с. 45-57.
2. Hurst L.C., Badalamente M.A., Hentz V.R., Hotchkiss R.N., Kaplan F.T., Meals R.A., Smith T.M., Rodzvilla J. Injectable collagenase clostridium histolyticum for Dupuytren's contracture // N Engl J Med. — 2009. — Vol. 3, № 361 (10). — P. 968-79.
3. Сумейменова Ж.Б. Коллагеназа и ее использование в биотехнологии / Ж. Б. Сулейменова, Р. К. Блиева // НАН РК. Сер. биологическая и медицинская. - 2008. - № 5. - С. 37-39.
4. Патент Росії №219.016.FE7A. «Штамм *Clostridium histolyticum* – продуцент коллагеназы» / Трухин В.П., Красильников И.В., Салимова Е.Л., Конон А.Д., Васильев Ю.М. Оpubл. 08.04.2019.
5. Enzyme manual: Collagenase. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.worthington-biochem.com.ua>
6. Beecher DJ, Olsen TW, Somers EB, Wong AC. Evidence for contribution of tripartite hemolysin BL, phosphatidylcholine-preferring phospholipase C, and collagenase to virulence of *Bacillus cereus* endophthalmitis. Infect Immun. 2000 Sep;68(9):5269-76. doi: 10.1128/iai.68.9.5269-5276.2000. PMID: 10948154; PMCID: PMC101788.
7. Патент Росії RU 2075219 C1. «Коллагеназа» / Демина Н.С., Лысенко С.В., Кудряшов В.В., Семенов М.П. Оpubл. 23.03.1995.
8. Hidenori K., Yoshisato H., Sachio H., Tamaki C. Isolation and characteristics of collagenolytic enzyme produced by *Candida albicans* // Infect. Immunol. — 1986. — V. 53, N2. — P. 312-316.
9. Petrova D. H., Shishkov S. A., Vlahov S. S. Novel thermostable serine collagenase from *Thermoactinomyces* sp. 21E: purification and some properties // J. Basic Microbiol. — 2006. — V. 46, N4. — P. 275-285.

10. Collagenase *Clostridium histolyticum*. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://go.drugbank.com>
11. Tanaka, K., Okitsu, T., Teramura, N. *et al.* Recombinant collagenase from *Grimontia hollisae* as a tissue dissociation enzyme for isolating primary cells. *Sci Rep* 10, 3927 (2020).
12. Okamoto M, Yonejima Y, Tsujimoto Y, Suzuki Y, Watanabe K. A thermostable collagenolytic protease with a very large molecular mass produced by thermophilic *Bacillus* sp. strain MO-1. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2001 Oct;57(1-2):103-8. doi: 10.1007/s002530100731. PMID: 11693905
13. Одиниці та загальні принципи вимірювання активності ферменту [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://studfile.net>
14. Глухарева, Т. В. Биохимия: Основные регуляторы и биологические жидкости человеческого организма: учебное пособие: в 2 частях: Часть 2 / Т. В. Глухарева, И. С. Селезнева; [научный редактор Ю. Ю. Моржерин]; Министерство образования и науки Российской Федерации, Уральский федеральный университет. — Екатеринбург: Издательство Уральского университета, 2016. — 115 с. — ISBN 978-5-7996-1841-4, 978-5-7996-1843-8
15. Топ 4 биоактивных ферментов в эстетической медицине. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://pbserum.com.ua>
16. Коллагеназа. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://iruksan.com.ua>
17. Іруксан (колагеназа) – крем-гель від шрамів та рубців. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://obyava.ua>
18. Триада – комбінація ферментів ліпаза, коллагеназа, гіалуронидаза. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.vipcosmet.ru>
19. Bond M.D., Van Wart H.E. Purification and separation of individual collagenases of *Clostridium histolyticum* using red dye ligand chromatography // *Biochemistry.* 1984. Vol. 23. P. 3077–3083.

20. Pat. US 8715985 B2 Clostridium histolyticum recombinant collagenases and method for the manufacture thereof / F. Bertuzzi, A. Cuttitta, G. Ghersi, S. Mazzola, M. Salamone.
21. Duarte A.S., Correia A., Esteves A.C. Bacterial collagenases: A review // Critical Reviews in Microbiology. 2014.
22. Gaurav K.P., Suresh P.V. Microbial collagenases: Challenges and prospect in production and potential application in food and nutrition. Academy of Scientific and Innovative Research, Meat and Marine Sciences Department CSIR-Central Food Technological Research Institute, Mysuru-570020, India
23. Федорюк Е.Д., Касьян О.В., Шамцян М.М. Кафедра технологии микробиологического синтеза. «Скрининг и изучение коллагеназной активности базидиальных грибов». Материалы конференции, посвященной 185-летию СПбГТИ (ТУ). С.412-413.
24. Journal of Applied Biotechnology, Volume 4, Issue 1, Winter 2017; 558-565 «Screening and Isolation of Collagenase Producing Microorganism from Proteins Waste Found in Himalayan Region»
25. N.A. Logan and P. De Vos, 2009. Genus I. Clostridium Praxinosum 1880. In: (Eds.) P. D. Vos, G. Garrity, D. Jones, N.R. Krieg, W. Ludwig, F.A. Rainey, K.H. Schleifer, W.B. Whitman. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 3: The Firmicutes, Springer, 738-828.
26. Smith L.D.S. and Hobbs G., 1975. Genus III. Clostridium Praxinosum 1880. In: (Eds.) Buchanan R.E. and Gibbons N.E., Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Eighth Edition, The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 551-572.
27. Пирог Т. П., Ігнатова О. А. Загальна біотехнологія: Підручник. – К.: НУХТ, 2009. – 236 с.
28. Коллализин (Collalysin), инструкция, лиофилизат для приготовления раствора. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://ckimm.com.ua/shop>

29. Державна служба статистики України. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://www.ukrstat.gov.ua/>
30. Фіщук В.В. Надання екстреної та невідкладної медичної допомоги на догоспітальному етапі при термічних і хімічних опіках [Електронний ресурс]: методична розробка практичного заняття / Фіщук В.В. – В.: ВНМУ ім. Пирогова, 2020. – 45 с.
31. Ферментные препараты на основе коллагеназы и их применение. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://marketing.rbc.ru/articles/710/>
32. A.V. Mayorova, V.B. Sysuev, J.O. Ivankova, I.A. Hanalieva. Collagenases in medical practice: modern collagenase-based preparations and prospects for their improvement. *Pharmacy & Pharmacology*. 2019;7(5): 260-270. DOI:10.19163/2307-9266-2010-7-5-260-270.
33. Іруксан гель. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://a.com.ua/iruksan-gel-30g-31712>
34. Красінько В.О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних, і харчових виробництв [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобув. освіт. ступ. «бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» освіт.-проф. програми «Біотехнологія» ден. і заоч. форм навч. / В.О. Красінько. – К.: НУХТ, 2019. – 252 с.
35. Використання профхімії до стандарту ХАССП. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://officem.com.ua>
36. Компоненти для виробництва миючих засобів. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.systopt.com.ua>
37. Каустическая сода: инструкция по применению. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.himoptorg.ru>
38. Каустическая сода: цена, свойства и особенности применения. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://pk-izhsintez.ru>
39. Біомой. Методичні вказівки (інструкція по застосуванню). [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://dezmed.com.ua>

- 40.Бланідаз – універсальний миючий засіб для водостійких поверхонь. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://lysoform.shop>
- 41.Дезінфекція. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://esu.com.ua>
- 42.Методичні вказівки щодо застосування засобу «Біонол форте» з метою дезінфекції та передстерилізаційного очищення. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://nadoest.com/>
- 43.Методичні вказівки із застосування дезінфікуючого засобу з мийною властивістю «БіоЛонг» виробництва ТОВ «Інфокс», Україна. – Київ, 2016
- 44.Дезактін. Методичні вказівки (інструкція по застосуванню). [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://dezmed.com.ua>
- 45.Методичні вказівки щодо застосування засобу «Полідез» з метою дезінфекції та передстерилізаційного очищення. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://as-oblik.kiev.ua>
- 46.Азотний балон 20 літрів. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://ballongaz.com.ua>
- 47.НЕРА фільтри. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://newfilter.com.ua>
- 48.Ферментер-биореактор с рабочими объемами сосудов от 5-х литров до 30 литров. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://sartorius.com.ua>
- 49.Насосы-дозаторы [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://ascopumps.com.ua>
- 50.Аппараты стальные эмалированные с механическим перемешивающим устройством [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://euromash.kiev.ua/ru>
- 51.Реактор лабораторный с проточным гомогенизатором [Електронний ресурс] // Режим доступу: https://tirit.org/reactor_him
- 52.Пилотный ферментер для глубинного культивирования 100 литров. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://bio-rus.ru>
- 53.Хранение, приготовление и контроль качества питательных сред. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://www.soligorskege>

- 54.Климнюк С.І., Ситник І.О., Творко М.С., Ширококов В.П. Практична мікробіологія: Посібник. – Тернопіль: Укрмедкнига, 2004. – 59 с.
- 55.Общая биотехнология. Лабораторный практикум: учеб. пособие / 0-28 И. В. Шакир, А. А. Красноштанова, Е. В. Парфенова, Н. А. Суясов, Е. С. Бабусенко, В. Д. Смирнова. – М.: РХТУ им. Д. И. Менделеева, 2008. – 120 с.
- 56.Изучение коллагеназной активности высших грибов. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://euroasia-science.ru/>
- 57.Патент Росії RU 2244741 С1. Способ получения протеолитического препарата для гидролиза структурних белков / Телишевская Л.Я., Овчинников Р.С., Панин А.Н.
- 58.Количественное определение глюкозы в крови глюкозооксидазным методом. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://studfile.net/>
- 59.Каманин С.С., Скворцова Л.С., Коина Е.А., Арляпов В.А. Амперометрический биосенсор для определения глюкозы на основе глюкозооксидазы, иммобилизованной в электропроводящий гель // Известия Тул ГУ. Естественные науки. 2016. №1.
- 60.Акименко Л.І. «Біотехнологія конструювання, виробництва та контролю якості ветеринарних препаратів та лікарських засобів». Ветеринарна біотехнологія 32(1), 2018 р.; УДК 636.09:615.375
- 61.Краснопольский Ю.М. Фармацевтическая биотехнология: Основы лабораторных исследований: практикум / Ю.М. Краснопольский, Л.В. Северина. – Харьков: НТУ «ХПИ», 2017. – 106 ст.