

**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 блеоміцину *Streptomyces mobaraensis*

Виконав: здобувач 4 курсу, групи 1

ДЗЯДУК Дмитро Анатолійович
(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

Здобувач _____
(підпис)

Київ - 2022 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

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

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

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і
мікробіології

Віктор СТАБНІКОВ

“ 04 ” квітня 2022 року

ЗАВДАННЯ

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

ДЗЯДУКА Дмитра Анатолійовича

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Біосинтез блеоміцину *Streptomyces mobaraensis*

керівник роботи КРАСІНЬКО Вікторія Олегівна, к.т.н., доц.
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

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

2. Строк подання здобувачем роботи 03.06.2022

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Streptomyces mobaraensis*
цільовий продукт: АФІ Блеоміцин

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. РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва.

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема виробництва блеоміцину – 1 аркуш формату А2.

Апаратурна схема виробництва блеоміцину – 1 аркуш формату А1.

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 04 квітня 2022 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	<i>Характеристика цільового продукту.</i>	04.04.22 – 12.04.22	
2	<i>Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента.</i>	12.04.22 – 19.04.22	
3	<i>Техніко-економічне обґрунтування</i>	20.04.22 – 28.04.22	
4	<i>Обґрунтування вибору технологічної схеми.</i>	29.04.22 – 06.05.22	
5	<i>Специфікація обладнання.</i>	30.04.22 – 08.05.22	
6	<i>Опис технологічної схеми.</i>	08.05.22 – 16.05.22	
7	<i>Контроль виробництва.</i>	17.05.22 – 22.05.22	
8	<i>Оформлення пояснювальної записки.</i>	22.05.22 – 01.06.22	
9	<i>Виконання графічної частини проекту.</i>	24.05.22 – 01.06.22	

Здобувач _____
(підпис)

Дмитро ДЗЯДУК _____
(ім'я та прізвище)

Керівник роботи _____
(підпис)

Вікторія КРАСІНЬКО _____
(ім'я та прізвище)

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	4
ВСТУП	6
РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту.....	12
1.1 Сукупність фізико-хімічних властивостей.....	12
1.2 Механізм біологічної дії.....	13
1.3 Механізми резистентності до блеоміцину	14
1.4 Найменування продукції що містить блеоміцин	14
РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	15
2.1 Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування	15
2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента	25
2.3. Таксономічний статус біологічного агента.....	27
РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування.....	28
3.1 Потреба у цільовому продукті	28
3.1.1 Оцінка терапевтичного застосування блеоміцину	28
3.2 Розрахунок потужності виробництва	31
3.3 Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера	31
3.4 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного посівного матеріалу для біосинтезу	33
РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми.....	35
4.1 Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу	25
4.2 Обґрунтування способу культивування і типу ферментера.....	36

4.3 Обґрунтування стадій підготовки аераційного повітря.	37
4.4 Вибір мийних та дезінфікуючих засобів	39
4.4.1 Порівняльна оцінка різних класів хімдеззасобів	41
4.4.2 Коротка характеристика основних діючих речовин у дезінфікуючих засобах	43
4.4.3 Обґрунтування вибору дезінфікуючого засобу.	47
4.4.4 Обрані миючі засоби	51
4.5 Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища	55
4.5.1 Вирощування інокуляту в колбах на качалках	56
4.5.2 Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 20 л.....	56
4.5.3. Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 200 л	57
4.6 Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН та піногасника	57
4.6.1. Вибір розчинів для регуляції рН.....	57
4.7 Вибір піногасника.....	59
4.7.1 Розрахунок необхідної кількості піногасника для інокулятора об'ємом 20 л та ферментара на 200 л.....	60
РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання.....	62
РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми	70
РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва.....	84
7.1. Мікробіологічний контроль	84
7.2. Показники росту	86
7.2.1. Концентрація блеоміцину	86
7.2.2. Концентрація джерел Карбону і Нітрогену.....	89
7.3 Карта постадійного контролю виробництва блеоміцину з використанням <i>Streptomyces mobaraensis</i> ATCC 15003	95
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ	101

РЕФЕРАТ

Дана кваліфікаційна робота присвячена розробці промислової ферментації, технологічної та апаратурної схем біосинтезу блеоміцину на основі *Streptomyces mobaraensis* ATCC 15003. Цей штам порівняно з іншими характеризується вищою концентрацією цільового продукту (112 мг/л) на модифікованому і дешевому поживному середовищі.

Технологічна схема біосинтезу блеоміцину включає допоміжні роботи (підготовку стерильного аераційного повітря, приготування та стерилізація піногасника, приготування та стерилізація титрувальних розчинів, стерилізацію поживних середовищ) та технологічний процес (дві стадії вирощування посівного матеріалу та біосинтез у ферментері об'ємом 200 л з коефіцієнтом заповнення 0,6).

Проект складається з вступу, семи розділів, списку використаних джерел, апаратурної (формат А1) і технологічної схеми (формат А2) . Загальний обсяг роботи – 106 сторінок, 11 рисунків та 14 таблиць.

Ключові слова : блеоміцин, *Streptomyces mobaraensis* ATCC 15003, *Streptomyces verticillus*, культивування, біосинтез, ферментація, поживне середовище, рак, онкологічні захворювання, хіміотерапія.

ВСТУП

Рак часто називають «хворобою сучасної епохи», оскільки фіксується різке збільшення захворюваності та смертності, яке спостерігається з кінця XVIII століття до сьогоднішнього дня, коли рак являє собою другу провідну причину смерті у всьому світі. Незважаючи на досягнення в діагностичній і медичній областях, кількість нових випадків раку збільшилася приблизно на 33% за десятиліття 2005-2015 рр., в основному через збільшення чисельності населення і збільшення середньої тривалості життя [1].

Хіміотерапія і променева терапія, найбільш поширені методи лікування, які використовуються сьогодні, як правило, не дають задовільних результатів і мають дуже обмежений терапевтичний характер через свої побічні ефекти. Незважаючи на позитивну відповідь при початковому лікуванні, у багатьох пацієнтів в кінцевому підсумку розвивається рецидив пухлини і метастази. Ліки, які зазвичай використовуються в хіміотерапії, можна розділити на дві групи. Синтетичні ліки зазвичай представляють собою невеликі молекули з певними структурами, які націлені тільки на один або невелику кількість біохімічних шляхів злочасних клітин, що приводять до прогресування раку. Перевага цих ліків полягає в тому, що їх можна вводити перорально, і типовим прикладом є інгібітори тирозинкінази. Друга група препаратів, які використовуються в хіміотерапії, - це біотехнологічні препарати, які зазвичай представляють собою великі і складні молекули, отримані з клітин живих організмів [2].

Вперше «сімейство» блеоміцинових антибіотиків було ідентифіковано японським вченим Хакамо Умедзавою з культуральної рідини *Streptomyces verticillus* в 1966 році [3]. Перші клінічні випробування здійснив Ітікава впродовж 1967-72 рр., які показали ефективність нового препарату проти

					НУХТ БТЕК 04.01.26 КР ПЗ			
		№ документа	Підпис					
Розробник	Дзядук.			ВСТУП	Літера	Аркуш	Аркушів	
Керівник	Красінко В.О.					7	106	
Н. контр					Кафедра БТМ ⁷			
Консульт								
Зав. каф.	Стадніков							

ряду плоскоклітинних пулин і злоякісних лімфом [4-6]. Наступні дослідження в США підтвердили активність блеоміцину при плоскоклітинних карциномах голови, шиї, шийки матки і лімфомах. Крім того, була ідентифікована висока активність препарату при раку статевих залоз людини [7]. Хімічна структура блеоміцину була переглянута у 1978 р і підтверджена повним синтезом у 1982 р [8-9].

На теперешній час блеоміцин зарекомендував себе як ефективний терапевтичний препарат при комбінованій терапії для лікування таких форм раку: плоскоклітинний рак шкіри, пухлини голови і шиї, вульви, шийки матки, легкого, стравоходу, герміногенні пухлини яєчка і яєчника, тератоканціномах I і II стадії, злоякісні лімфоми (Ходжкінса, неходжкінса).

За даними Міжнародного агенства по вивченню раку в 2020 році у всьому світі було зафіксовано 19,3 мільйони нових випадків раку і майже 10 мільйони летальних результатів від раку. На Європу приходить 22,8 % всіх випадків раку і 19,6 % смертей від раку, хоча у цьому регіоні проживає лише 9,7 % населення Землі.

Згідно з прогнозами, в 2040 році у всьому світі очікується 28,4 мільйона нових випадків раку, що на 47% більше ніж у 2020 році. У багатьох країнах з низьким і середнім рівнями HDI (індекс людського розвидку) спостерігається помітне збільшення поширеності відомих факторів ризику раку, які переважають в західних країнах з високим рівнем доходу (наприклад, куріння, нездорове харчування, надмірна маса тіла і відсутність фізичної активності). Відбувається поступове витіснення форм раку пов'язаних з низьким рівнем HDI (наприклад, шийки матки, печінки, шлунка) на рак, який зазвичай широко поширений в найбільш розвинених країнах (наприклад, грудей, легенів, товстої кишки, простати), що вимагає змін в пріоритетах національних стратегій боротьби з раком.

Враховуючи сучасну епідеміологічну ситуацію онкологічних хвороб яка погіршується у зв'язку з соціальними і економічними перетвореннями, і прогнози на майбутнє, за яких буде підвищуватися кількість онкологічних

захворювань, що піддаються лікуванню з використанням блеоміцину. Доречним буде не тільки пошук нових засобів і способів лікування раку, а й використання провірених і добре себе зарекомендованих хіміотерапевтичних препаратів, до яких відноситься блеоміцин, а також здійснення комбінованої терапії з цим препаратом [10].

Не зважаючи на те, що блеоміцин є ефективним хіміотерапевтичним препаратом широкого спектру дії при лікуванні раку, клінічне застосування цього засобу обмежується не достатньою концентрацією агенту в пухлинах і цитотоксичному навантаженні на легені пацієнта. Ця побічна дія в кінцевому результаті при значному підвищенні дози препарату може викликати фіброз легень. Однак за останні два десятиліття значно вдосконалились системи адресної доставки АФІ ліків безпосередньо до тканин і клітин, що дає можливість широкого клінічного використання нових терапевтичних методів і засобів у поєднанні з блеоміцином.

Для подолання проблем терапевтичного застосування блеоміцину досліджуються та впроваджуються такі методи доставки молекули препарату: ліпосоми [11], електорохіміотерапія [12], ультразвук [13], фотохімічна інтерналізація [14], наночастинки [15].

Встановлено, що системи доставки блеоміцину на основі ліпосом можуть підвищувати молекулярну активність АФІ та дію проти лейкімії P338 і карциноми Льюїса. Ефекти, посилені ліпосомними носіями, регулюються розміром та складом ядра ліпосоми. Такі гібридні структури виявляють невелику токсичність та не викликають значних пошкодження легень [16]. Модифіковані октааргініном фузогенні сполуки ДОФЕліпосоми можуть значно посилити міжклітинні взаємодії. Блеоміцин у цих ліпосомах підвищує кількість уражених клітин та пошкоджених ДНК у мишей BALB/c, що несуть пухлину 4T1. Однак ефективність введення активних малих біомолекулярних засобів (у тому числі блеоміцину) в ліпосоми все ще необхідно покращити, щоб ефективно реалізувати ці носії у методиці доставки ліків [11].

Дію блеомицину можна покращити ще одним інноваційним методом таргетної терапії – електрохіміотерапії, тобто підвищення проникності біологічних мембран для лікарської речовини шляхом локального застосування коротких та інтенсивних електричних імпульсів. Вперше цей метод у поєднанні з блеомицином було проведено в клініці у 1991 р. дослідниками з Інституту Гюстава Руссі у Франції [17]. Повідомлялося, що цитотоксичність блеомицину збільшується на кілька порядків за рахунок електропорації пухлинних клітин. В даний час цей метод з використанням блеомицину, як незалежна терапевтична методика, є одним з клінічних застосувань електрохіміотерапії, що добре зарекомендував себе, а також одним з успішних прикладів трансляційної медицини [12].

Наночастинки (НЧ) як засоби доставки ліків викликають все більший інтерес через їх високе співвідношення активної поверхні до об'єму, матеріалів ядра і властивостей поверхні, що можуть бути значно скоригованими. НЧ можуть бути виготовлені з унікальними оптичними, фізичними властивостями. Розміри, форми та поверхневі функціональні можливості наночастинок можуть бути адаптовані для отримання бажаних взаємодій з біологічними системами. Різні типи наночастинок як носії були досліджені для доставки блеомицину, такі як НЧ оксиду заліза [18], НЧ хітозану [19], НЧ діоксиду титану (TiO_2) [15] та НЧ золота [20].

Внутрішньоклітинний розподіл НЧ Fe_2O_3 охарактеризовано за допомогою конфокальної мікроскопії з використанням НЧ, мічених родаміновим барвником. Визначена висока біосумісність і ефективне клітинне поглинання також спостерігається процес інтерналізації, додатково уточненим за допомогою електронної мікроскопії. Результати росту клітин NT1080 при різних концентраціях НЧ і блеомицину, показали, що взаємодії між НЧ і ядром клітин та мітохондріями можуть підвищувати кількість відмерлих клітин [18].

НЧ на основі TiO_2 для доставки блеомицину мають набагато менший розмір (3-5 нм), ніж НЧ Fe_2O_3 . Повідомляється, що дрібніші НЧ більш

підходять для лікування раку через найкраще проникнення в пухлину. Використання НЧ TiO_2 у 7-10 разів більш ефективно пошкоджує внутрішньоклітинну нуклеїнову кислоту, ніж звичайний транспорт блеоміцину [15].

НЧ демонструють великі перспективи у доставці блеоміцину через їхню хорошу біосумісність, уповільнене вивільнення препарату та високу ефективність. Однак НЧ повинні бути досконало синтезовані та сконструйовані для оцінки їх токсичності і стабільності [15,20].

У промисловості для одержання блеоміцину використовують *Streptomyces verticillus* ATCC 15003, однак у 2010 р було встановлено, що *S. mobaraensis* ATCC 15003 може бути більш ефективним продуцентом цього антибіотику.

Новизною даного проєку є конструювання ділянок передферментаційних процесів і виробничого біосинтезу з використання штаму *S. mobaraensis* ATCC 15003 який продукує значно більшу кількість блеоміцину (112 мг/л) на модифікованому поживному середовищі, що у порівнянні методик культивування з сучасних наукових джерел штаму *S. verticillus* ATCC 15003 (98,7 мг/л) є більш економічно обґрунтовано. В кінцевому результаті використання нового продуцента з доступним субстратом знизить витрати на отримання блеоміцину і позитивно виразиться на вартості препарату.

Метою проєку є розробка ділянки виробництва блеоміцину на основі *S. mobaraensis* ATCC 15003 для покриття 60% потреби України в хіміотерапевтичному препараті.

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

Блеоміцин – протипухлинний глікопептидний антибіотик, в клінічній практиці застосовується для лікування різноманітних злоякісних новоутворень [21]. Вперше протипухлинну дію блеоміцину виявив Умедзава Хамао при аналізі фільтрату культур *Streptomyces verticillus*, вченому вдалося виділити блеоміцини з складної і ємкої групи глікопептидів [22]. Діючими речовинами препарату блеоміцину є блеоміцин А₂ від 55% до 70% та блеоміцин Б₂ від 25% до 32%; загальний вміст блеоміцину А₂ і блеоміцину Б₂ складає не менше 90% [23].

1.1 Сукупність фізико-хімічних властивостей

Блеоміцин А₂ (C₅₅H₈₄N₁₇O₂₁S₃⁺) разом з блеоміцином Б₂ (C₅₅H₈₄N₂₀O₂₁S₂) є основним в блеоміцин сульфаті, суміші сульфатних солей глікопептидних протипухлинних антибіотиків (рис.1.1), виділених з *Streptomyces verticillus*. Молекулярна маса блеоміцину Б₂ 1425 г / моль, блеоміцину А₂ 1415,6 г / моль, точка плавлення складає 71 °С, розчиняється у воді і метанолі, нерозчинний в ацетоні, етилацетаті, бутилацетаті, ефірі, безбарвний або жовтуватий порошок, який може становитися голубуватий в залежності від вмісту міді [24]. Стерильний порошок блеоміцин сульфату стабільний при охолодженні до 2 - 8 °С. Після відновлення за допомогою ін'єкції 0,9% хлориду натрію розчини блеоміцин сульфату стабільні протягом 24 годин при кімнатній температурі [25].

					НУХТ БТЕК 04.01.26 КР ПЗ		
		№ документа	Підпис				
Розробник	Дзядук.			РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	Літера	Аркуш	Аркушів
Керівник	Красінко В.О.					12	106
Н. контр					Кафедра БТМ¹²		
Консульт							
Зав. каф.	Стадніков						

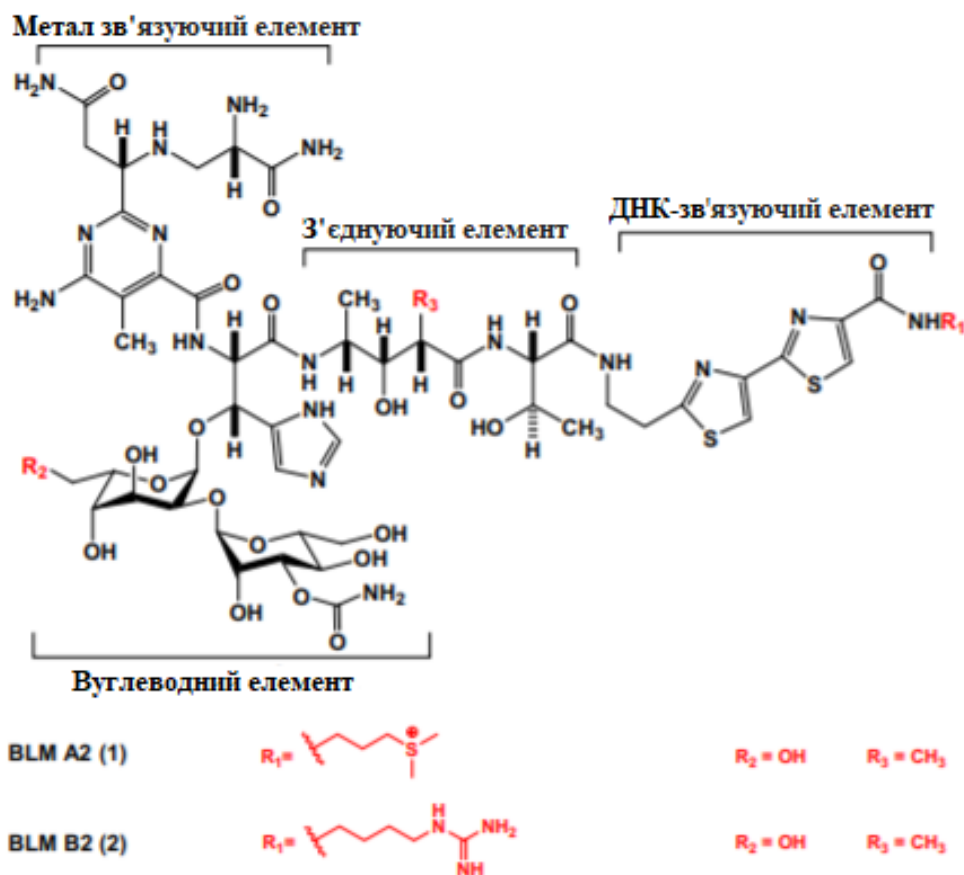


Рис. 1.1 Структурна формула блеомицину А₂ (BLM А₂) і блеомицину В₂ (BLM В₂) [21].

1.2 Механізм біологічної дії

Блеоміцин виявляє свої біологічні властивості шляхом вибірково окисненого розщеплення ДНК та РНК у присутності кисню. Молекула блеомицину містить чотири функціональні структури (рис.1.1):

- метал зв'язуючий елемент – забезпечує необхідні хімічні структури для створення комплексу з Fe (II) і активацію молекулярного кисню, необхідного для руйнування ДНК;
- ДНК-зв'язуючий елемент – містить дитіазол і термальний амін які забезпечують спорідненість блеомицину з ДНК та селективну властивість блеомицину розщеплювати ДНК;

- зв'язуючий елемент – поєднує центр приєднання металу і ДНК-зв'язуючий елемент;
- вуглеводний елемент – забезпечує проникнення блеомицину в клітину і координацію іонів металу [26].

Встановлено, що блеомицин діє на клітину шляхом індукції розриву одного або відразу двох ланцюгів ДНК. Механізм дії розщеплення ДНК блеомицином забезпечується хелатуванням двухвалентного катіону, зазвичай Fe^{2+} і утворення вільних радикалів. При зв'язуванні з ДНК на 40-вому атомі карбону ДНК утворюється вільний радикал. В присутності молекулярного кисню серія реакцій приводить до розриву ланцюга і вивільнення піримідин пропеналю. Після розриву ланцюга утворюється 30 фосфогліколятних і 50 фосфатних кінців [27].

1.3 Механізми резистентності до блеомицину

Однією з причин стійкості клітин до цитотоксичних препаратів – це експресія специфічних ферментів детоксикації. На сьогоднішній день виявлено три механізми стійкості до блеомицину: дія блеомицин гідролази; ферменти N-ацетилювання блеомицину, які інактивують блеомицин-подібні молекули; та (блеомицин-зв'язуючі білки (BMLA і BMLT), які діють, вловлюючи блеомицин-подібні молекули [28].

1.4 Найменування продукції що містить блеомицин

Оскільки блеомицин належить до Списку основних лікарських засобів Всесвітньої організації охорони здоров'я, виробництво цього препарату налагоджено компаніями у багатьох провідних країнах фармацевтичної промисловості: Kocak Farma (Туреччина), Nippon Kayaku (Японія), APP Pharmaceuticals, Celon Labs (Індія), Hospira (США), Fresenius Kabi (Канада), Hexal (Німеччина) [29].



Рис. 1.2 Блеоміцин у формі порошку у флаконах виробництва компанії Fresenius Kabi [30].

РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

2.1 Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування

Для промислового виробництва блеоміцину застосовують штам який одержав Умерзава в 70х роках минулого століття шляхом індукованого мутагенезу – *S. verticillus* ATCC 15003 [31].

Блеоміцин є вторинним метаболітом, аглікон якого походить з дев'яти амінокислот, одного ацетату і двох саденозилметіонінів, дисахаридна частина походить від D-манози L-гулози. Через слабку структуру блеоміцину і його біосинтетичний механізм на теперешній час концентрація кінцевого продукту в культуральній рідині під час мікробної ферментації залишається досить низькою.

В кластері генів біосинтезу блеоміцину, ген *blmR*, розміщений в одному опероні з *blmT*, який імовірно належить до родини трансмембранних транспортних систем, що бере участь у виділенні блеоміцину з клітини. Маніпуляція з репресоом біосинтетичного шляху блеоміцину *blmR* має перспективи і потенціал для збільшення виходу кінцевого продукту у *S. verticillus* [31,32].

N- ацетилглюкозамін значно впливає на ініціацію біосинтезу блеоміцину. Поєднання стратегії внесення N- ацетилглюкозаміну у поживне середовище і надекспресії генів *OBlmT / ManAB* у *S. verticillus* приводить до підвищення концентрації цільового продукту у культуральній рідині [32].

				НУХТ БТЕК 04.01.26 КР ПЗ			
		№ документа	Підпис				
Розробник	Дзядцк.			РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	Літера	Аркуш	Аркушів
Керівник	Красінко В.О.					16	106
Н. контр					Кафедра БТМ¹⁶		
Консульт							
Зав. каф.	Стадніков						

Однак самим ефективним біологічним агентом для біосинтезу блеоміцину є *S. mobaraensis* ATCC 15003. При використанні цього мікроорганізму у поєднанні з сумішшю ростових субстратів виявлено значне збільшення концентрації цільового продукту [33].

Отже, користуючись вище зазначеним і даними з таблиць 2.1, 2.2, 2.3, стає очевидно, що найефективнішим, найбільш економічно обґрунтованим є продуцент *S. mobaraensis* ATCC 15003 з використанням для його культивуванням поживним середовищем.

Особливості одержання блеоміцину на суміші ростових субстратів

Біологічний агент	Склад поживного середовища, г/л	Тривалість культивування, год	Концентрація Блеоміцину, мг/л	Особливості процесу біосинтезу	Використана література
<i>Streptomyces verticillus</i> ATCC15003 штам був сконструйований шляхом надекспресії blmT в штамі з видаленням blmR	Крохмаль – 20; Декстрин – 30; Соєве борошно – 30; дріжджовий екстракт – 5; кукурудзяний екстракт – 2,5; NaCl – 3,0; NaNO ₃ – 3,0; K ₂ HPO ₄ – 1,0; ZnSO ₄ – 0,5; CuSO ₄ ×5H ₂ O – 0,1; CaCO ₃ – 1;	168	80	Культивування у колбах об'ємом 250 мл з 40 мл середовища. на качалці (t ⁰ = 28 ⁰ С; n = 220 об/хв; рН=6,5)	Chen, H., Wang, J., Cui, J., Wang, C., Liang, S., Liu, H., & Wen, J. (2019). Negative regulation of bleomycins biosynthesis by ArsR/SmtB family repressor BlmR in <i>Streptomyces verticillus</i> . Applied Microbiology and Biotechnology. doi:10.1007/s00253-019-09923-8

Продовження табл.
2.1

Таблиця 2.1

	3-морфолінопропан-сульфонова кислота - 5;				
<i>Streptomyces verticillus</i> ATCC15003	Маноза – 10; Хітозан – 5; N- ацетилглюкозамін – 20; Декстрин – 40; KH ₂ PO ₄ – 1,0; MgSO ₄ ×7H ₂ O – 1,0; NaNO ₃ – 6,0; FeSO ₄ ×7H ₂ O – 0,001; MnCl ₂ – 0,001; ZnSO ₄ ×7H ₂ O - 0,001; 3-морфолінопропан-сульфонова кислота – 5; Гістидин – 1,5;	168	98,7	Культивування у колбах об'ємом 250 мл з 40 мл середовища. на качалці (t ⁰ = 28 ⁰ C; n = 220 об/хв; рН=6,5)	Chen, H., Cui, J., Wang, P. et al. Enhancement of bleomycin production in <i>Streptomyces verticillus</i> through global metabolic regulation of N-acetylglucosamine and assisted metabolic profiling analysis. Microb Cell Fact 19, 32 (2020). https://doi.org/10.1186/s12934-020-01301-8

Продовження табл.
2.1

Таблиця 2.1

	Лейцин -- 1,5; Цистеїн-- 1,5;				
<i>Streptomyces mobaraensis</i> ATCC 15003	Крохмаль – 80; Глюкоза – 5; Соевий шрот – 1,75; Рукурудзяний екстракт – 15,0; ZnSO ₄ ×7H ₂ O - 0,15; CuSO ₄ ×7H ₂ O – 2,5; NaNO ₃ – 0,15; K ₂ HPO ₄ – 0,5; Фініковий сироп – 40,0	120	142	Культивування у колбах об'ємом 500 мл з 100 мл середовища. на качалці (t ⁰ = 30 ⁰ C; n = 190 об/хв; рН=6,5)	Hesham H. Radwan, Fars K. Alanazi , Ehab I. Taha , Hamdy A. Dardir, Ihab M. Moussa and Ibrahim A. Alsarra. Development of a new medium containing date syrup for production of bleomycin by <i>Streptomyces mobaraensis</i> ATCC 15003 using response surface methodology. African Journal of Biotechnology Vol. 9(33), pp. 5450-5459, 16 August, 2010
<i>Streptomyces mobaraensis</i> ATCC 15003 *	Крохмаль – 32; Глюкоза – 5; Соевий шрот – 4,375; кукурудзяний екстракт – 7,5;	120	112	Культивування у колбах об'ємом 500 мл з 100 мл середовища. на качалці (t ⁰ = 30 ⁰ C; n = 190 об/хв; рН=6,5)	Hesham H. Radwan, Fars K. Alanazi , Ehab I. Taha , Hamdy A. Dardir, Ihab M. Moussa and Ibrahim A. Alsarra. Development of a new medium containing date syrup for production of bleomycin by <i>Streptomyces mobaraensis</i>

Закінчення табл.
2.1

Таблиця 2.1

	ZnSO ₄ ×7H ₂ O - 0,15; CuSO ₄ ×7H ₂ O – 2,5; NaNO ₃ – 0,15; K ₂ HPO ₄ – 0,5; Фініковий сироп – 25,0				ATCC 15003 using response surface methodology. African Journal of Biotechnology Vol. 9(33), pp. 5450-5459, 16 August, 2010
--	--	--	--	--	--

Примітка. * – склад поживного середовища що є найбільш економічним згідно отогонального плану експерименту наведеного у таблиці публікації

**Вартість поживних середовищ для культивування продуцентів
блеоміцину**

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело Інформації (1, 2, 3,4,5,6,7,8)*
<i>Streptomyces verticillus</i> ATCC15003 штам був сконструйований шляхом надекспресії blmT в штамі з видаленням blmR	Крохмаль -20	21	0,42	1
	Декстрин – 30	28	0,84	1
	Соєве борошно – 30;	29	0,87	1
	кукурудзяний екстракт - 2,5;	100	0,25	2
	NaCl – 3,0;	1,87	0,00561	1
	NaNO ₃ – 3,0	20,04	0,0612	1
	K ₂ HPO ₄ – 1,0;	119,28	0,11928	3
	ZnSO ₄ ×7H ₂ O – 0,5	25	0,0125	1
	CuSO ₄ ×5H ₂ O – 0,1;	80	0,008	1
	CaCO ₃ – 1;	25	0,025	1
	3-морфолінопропан-сульфонова кислота – 5;	2000,21	10,00	4
Вартість 1 л середовища - 12,24 грн				
<i>Streptomyces verticillus</i> ATCC15003	Маноза – 10;	280,03	2,8003	5
	Хітозан – 5	166,34	0,8317	5
	N- ацетилглюкозамін – 20	27,92	0,5584	5
	Декстрин – 40	28	1,12	1
	KH ₂ PO ₄ – 1,0	48	0,048	1
	MgSO ₄ ×7H ₂ O – 1,0	10	0,01	1
	NaNO ₃ – 6,0	20,04	0,1224	1
	FeSO ₄ ×7H ₂ O – 0,001	2,40	0,0000024	6

Продовження табл. 2.2

Таблиця 2.2

	MnCl ₂ – 0,001	55,65	0,00005565	5
	ZnSO ₄ ×7H ₂ O - 0,001	25	0,000025	1
	3-морфолінопропан-сульфонова кислота – 5	2000,21	10,00	5
	Гістидин – 1,5	1365,13	2,04769	7
	Лейцин - - 1,5	468	0,702	1
	Цистеїн– 1,5	650	0,975	1
	Вартість 1 л середовища – 19,22 грн			
<i>Streptomyces mobaraensis</i> ATCC 15003	Крохмаль – 80	19	1,52	1
	Глюкоза – 5	20	0,1	1
	Соевий шрот – 1,75	15	0,02625	1
	кукурудзяний екстракт – 15,0	100	1,5	2
	CuSO ₄ ×7H ₂ O – 2,5	14,79	0,03697	5
	NaNO ₃ – 0,15	13,04	0,00195	1
	K ₂ HPO ₄ – 0,5	17	0,0085	1
	Фініковий сироп – 40,0	151,19	6,0476	8
	Вартість 1 л середовища – 9,24 грн			
<i>Streptomyces mobaraensis</i> ATCC 15003*	Крохмаль – 32	19	0,6	1
	Глюкоза – 5	20	0,1	1
	Соевий шрот – 4,375	15	0,0656	1
	кукурудзяний екстракт – 7,5	100	0,75	2
	CuSO ₄ ×7H ₂ O – 2,5	14,79	0,03697	5
	NaNO ₃ – 0,15	13,04	0,00195	1
	K ₂ HPO ₄ – 0,5	17	0,0085	1
	Фініковий сироп – 25,0	151,19	3,779	8

	Вартість 1 л середовища – 5,34 грн
--	---

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

1. <https://prom.ua/ua/>
2. <https://crazycarp.com.ua/>
3. <https://novohim.com.ua/catalog/>
4. <https://www.carbosynth.com/>
5. <https://russian.alibaba.com/product-detail/>
6. <https://dnepropetrovsk.flagma.ua/uk/>
7. <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/>
8. <https://bulknaturaloils.com/date-syrup-organic.html>

Умовна вартість 1 мг блеоміцину

Біологічний агент	Концентрація блеоміцину, мг/л	Тривалість культивування, год	Кількість утвореного блеоміцину за годину, мг/год	Вартість 1 л середовища, грн/л	Умовна вартість 1 мг цільового продукту, грн/мг
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>
<i>Streptomyces verticillus</i> ATCC15003 штам був сконструйований шляхом надекспресії blmT в штамі з видаленням blmR	80	168	0,476	12,24	0,153
<i>Streptomyces verticillus</i> ATCC15003	98,7	168	0,58	19,22	0,195
<i>Streptomyces mobaraensis</i> ATCC 15003	142	120	1,18	9,24	0,065
<i>Streptomyces mobaraensis</i> ATCC 15003*	112	120	0,93	5,34	0,047

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

S. mobaraensis ATCC 15003 це аеробні, грампозитивні, нитчасті бактерії, які мають добре розвинені вегетативні гіфи (діаметром від 0,5 до 2,0

мкм) з відгалуженнями. Гіфи утворюють складний субстратний міцелій, який допомагає видаляти органічні сполуки з субстратів. Міцелій і повітряні гіфи, що утворюються з нього, малорухливі. Поверхня спор може бути гладкою або бородавчастою. Повітряні гіфи складаються з довгих прямих ниток, що несуть 50 і більше спір через більш менш рівні проміжки часу, розташованих в мутовках. Кожна гілка мутовки утворює на своїй вершині парасольку, яка несе декілька ланцюжків кулястих і гладких зморшкуватих спор.

Оптимальний ріст від 27°C, до 37°C. Зелені відтінки реверсу більш виражені. Відсутність зростання за 45°C. Деякі штами *S. mobaraensis* продукують пірицидин А, пірицидин і детоксин а також виявляють антибактеріальну активність.

S. mobaraensis добре росте на картопляно-глюкозному агарі, колір: зворотний від світло-бежевого до зеленувато-жовтого; повітряний міцелій брудно-білий із зеленими відтінками до зеленувато-сірого.

На агарі Бакто Чапека та агарі Казамінокислоти-Чапека (1 г/л Difco без вітамінів, Казамінокислоти, що замінюють нітрат натрію): дуже поганий ріст; безбарвний; сліди лише брудно-білого повітряного міцелію.

На глюкозо-аспарагіновому агарі (середовище ISP 5 з 1% глюкозою замість гліцерину): швидкий ріст; колір блідо-жовтий; повітряний міцелій білуватий.

На гліцеринно-аспарагіновому агарі: швидкий ріст; колір від світло-коричневого до жовтувато-коричневого; повітряний міцелій від білого до світло-коричневого.

На неорганічному соляно-крохмальному агарі: швидкий ріст; колір від коричнево-жовтого до брудно-зеленого; повітряний міцелій від світло-коричневого до брудно-зеленого.

На агарі з дріжджовим екстрактом та солодовим екстрактом: швидкий ріст; колір - коричнево-жовтий; повітряний міцелій від білого до брудно-коричневого кольору.

На агарі Vasto Emerson: швидкий ріст; колір – блідо-жовтий; повітряний міцелій брудно-білий.

На агарі Беннета (1% глюкози, 0,1% бакто-яловичого агару, 0,1% дріжджового екстракту, 0,2% пептону, 1,5% агару): швидкий ріст; колір – блідо-жовтий; повітряний міцелій білий з блідо-рожевими відтінками у плямах.

На живильному агарі Oxoid: швидкий ріст; колір – блідо-жовтий; дрібний білий повітряний міцелій [34].

2.3. Таксономічний статус біологічного агента

Згідно останнього видання «Довідника Бергі по систематиці бактерій» *S. mobaraensis* ATCC 15003, біологічний агент має наступний таксономічний статус:

Домен: *Bacteria*

Тип: *Actinomycetota*

Клас: *Actinomycetia*

Порядок: *Streptomycetales*

Родина: *Streptomycetaceae*

Рід: *Streptomyces*

Вид: *Streptomyces mobaraensis*

Штам: *Streptomyces mobaraensis* ATCC 15003 [34].

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

3.1 Потреба у цільовому продукті

3.1.1 Оцінка терапевтичного застосування блеоміцину

Хвороба Ходжкіна

Для лікування лімфоми Ходжкіна на різних стадіях захворювання своєю ефективністю показали дві основні поліхіміотерапії ABVD і BEACOPP [35]. За даними Національного Інституту Раку у 2019 році в Україні було зафіксовано 875 випадків захворювання Ходжкіна [36]. Використовуючи дані протоколів лікування, та за припущення, що поліхіміотерапії ABVD і BEACOPP будуть використовуватися рівноцінно для лікування всіх хворих, потреба у блеоміцині становить [37]:

6 курсів ABVD (20 мг за курс) для 50% хворих , $438 \times (6 \times 20) = 52560$ мг

6 курсів BEACOPP (10 мг за курс) для 50% хворих , $437 \times (6 \times 10) = 26220$ мг

Неходжкінська лімфома

Блеоміцин може використовуватися у поліхіміотерапії R-ACVBP для лікування дифузної крупноклітинної В-клітинної лімфоми яка становить приблизно третину від усіх неходжкінських лімфом [38]. За даними Національного Інституту Раку у 2019 році було зафіксовано 2336 випадків захворювання неходжкінською лімфомою [36]. За припущення, що поліхіміотерапія R-ACVBP буде використовуватися у половині випадків захворювання, потреба у блеоміцині становить [39]:

					НУХТ БТЕК 04.01.26 КР ПЗ		
		№ документа	Підпис				
Розробник	Дзядцк.			РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО- ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ	Літера	Аркуш	Аркушів
Керівник	Красінько В.О.					28	106
Н. контр					Кафедра БТМ²⁸		
Консульт							
Зав. каф.	Стабніков						

4 курси R-ACVBP (10 мг за курс) $2336/3/2 \times 10 \times 4 = 15574$ мг

Злоякісні новоутворення яєчника

Блеоміцин застосовується у поліхіміотерапії ВЕР для лікування різноманітних форм раку яєчника. За даними Національного Інституту Раку у 2019 році було зафіксовано 3545 випадків злоякісних новоутворень яєчників [36]. За припущення що у 20 % випадків буде використовуватися поліхіміотерапія ВЕР, потреба у блеоміцині становить [40]:

4 курси ВЕР (30 мг за курс) $709 \times 30 \times 4 = 85080$ мг

Злоякісні новоутворення яєчка

За даними ВООЗ рак яєчка зустрічається у 1,8 % від усіх злоякісних новоутворень що виникають у чоловіків. Всього в Україні було зафіксовано 66021 випадків злоякісних новоутворень, з яких 1189 це рак яєчка [36]. За припущення що у 30 % випадків буде використовуватися поліхіміотерапія ВЕР, потреба у блеоміцині становить [40]:

4 курси ВЕР (30 мг за курс) $357 \times 30 \times 4 = 42840$ мг

Плоскоклітинна карцинома шкіри

Плоскоклітинна карцинома шкіри становить 20-50 % від усіх злоякісних новоутворень шкіри. За даними Національного Інституту Раку у 2019 році було зафіксовано 15882 випадків злоякісних новоутворень шкіри [36]. За припущення що у 35 % випадків раку шкіри становить плоскоклітинна карцинома і в 15 % хворих буде використовуватися поліхіміотерапія, потреба у блеоміцині становить:

4 курси (30 мг за курс) $834 \times 30 \times 4 = 100080$ мг

Узагальнені дані щодо річної потреби України в блеоміцині наведено у таблиці 3.1.

Вихідні дані для розрахунку річної потреби в блеоміцині

Захворювання	Доза препарат у на добу (разова), мг	Тривалість прийому, днів	Кількість препарат у (в мг) на 1 людину	Кількість хворих в Україні на 2019 рік	Загальна кількість препарат у на всіх хворих, мг (г)
Хвороба Ходжкіна	10-20	6	60-120	875	78780
Неходжкінська лімфома	10	4	40	2336 (терапія 16,7% хворих)	15574
Злоякі новоутворення яєчника	30	4	120	3545 (терапія 20% хворих)	85080
Злоякісні новоутворення яєчка	30	4	120	1189 (терапія 30% хворих)	42840
Плоскоклітинна карцинома шкіри	30	4	120	5559 (терапія 15% хворих)	100080
Разом:					322,354 (323 г)

3.2 Розрахунок потужності виробництва

За даними Державного реєстру лікарських засобів до застосування в Україні мають дозвіл препарати:

Блеоміцину сульфат виробництва Жеянг Хісун Фармасьютікал КО., ЛТД, Китай

Блеоміцину сульфат виробництва Сікор Сочіета' Італіана Кортікостероїді С.Р.Л., Італія

Блеоцин виробництва Ніппон Каяку Ко., Лтд., Такасакі Планта, Японія

Блеоцин-С виробництва ТОВ "Люм'єр Фарма" (виробництво з продукції in bulk фірми-виробника Ніппон Каяку Ко., Лтд., Такасакі Планта, Японія), Україна

Лайбле 15 виробництва Юнітед Біотеч (П) Лімітед, Індія

Оскільки на території України відсутній повний технологічний цикл виробництва блеоміцину, виникає необхідність спроектувати виробничий біосинтез препарату у нашій країні. За умови виробництва вітчизняного хіміотерапевтичного препарату можна покрити потребу України у блеоміцині на 60 %. Отже потужність нашого виробництва складе:

$$G_{\text{гп}} = 323 \text{ г} \times 0,6 = 194 \text{ г}$$

Кількість культуральної рідини необхідної для отримання 194 г блеоміцину при культивуванні *Streptomyces mobaraensis* ATCC 15003 [33] становить:

$$0,112 \text{ г} - 1 \text{ л};$$

$$194 \text{ г} - X \text{ л};$$

$$X = 1732,2 \text{ л}.$$

Враховуючи сумарні втрати цільового продукту при виділенні (55%), необхідно отримати таку кількість культуральної рідини:

$$V_{\text{кр}} = 1732,2 / (1 - 0,55) = 3849,4 \text{ л}.$$

3.3 Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера

Плануємо що вибрану кількість блеоміцину (194 г) будем виробляти за 216 трудоднів, тоді кількість продукту на добу (V_d) становитиме:

$$V_d = V_{кр}/T_{рд} = 3849/216 = 17,82 \text{ л}$$

Розрахунок партій продукту (виробничих циклів)

Цикл роботи ферментера:

$T_{цф}$ = тривалість виробничого біосинтезу (120 год) та час підготовки ферментера до роботи (5,5 год). Підготовка ферментера включає: миття та огляд (1 год), перевірка на герметичність (0,5 год), стерилізація (1 год), охолодження (0,5 год), підігрів апарату (0,5 год), завантаження середовища (1 год), засів (0,5 год), вивантаження культуральної рідини (0,5 год).

Кількість продукту на добу, $G_{нтд} = G_{нт}/T_{рд} = 194/216 = 0,898$ г/добу

Кількість антибіотика за цикл, $G_{цк} = G_{пд} \cdot T_{цф}/24 = 0,898 \times 125,5/24 = 4,695$ г/цикл

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

$$V_{кр} = (K_1 \times V_d \times T_{цф})/24 = (1,1 \times 17,82 \times 125,5)/24 = 102,5 \text{ л/цикл}$$

Кількість ферментацій (циклів) на рік $N_{цк} = G_{нт}/G_{цк} = 194/4,695 = 41,3$.

Округлюємо кількість циклів до цілого $N_{цк} = 42$.

При одержанні культуральної рідини потрібно врахувати її втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря що становлять 10 %.

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

$$V_{роб.1} = V_{кр}/(1-Eф) = 102,5/(1-0,1) = 113,89 \text{ л.}$$

113,89 л культуральної рідини можна отримати у ферментері, геометричний об'єм якого становить:

$V_r = 113,89/0,6 = 189,82$ л, найближчий доступний ферментер з геометричним об'ємом 200 л

Уточнений коефіцієнт заповнення:

$$K_{зф} = 114,16/200 = 0,57.$$

3.4 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного посівного матеріалу для біосинтезу

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

Тоді кількість поживного середовища в ферментері буде становити:

$V_{пс1} = V_{роб.1}/(1+X_{ф}) = 113,89/(1+0,1) = 103,54$ л , де $X_{ф}$ – доза посівного матеріалу.

Кількість посівного матеріалу становить $V_{пм1} = V_{роб1} - V_{пс1} = 113,89 - 103,78 = 10,35$ л.

Для одержання 10,35 л інокуляту в посівному апараті враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 %.

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

$$V_{роб.2} = V_{пм1}/(1 - E_{па}) = 10,35/(1-0,1) = 11,5$$

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

Тоді кількість поживного середовища в посівному апараті буде становити:

$V_{пс2} = V_{роб.2}/(1+X_{па}) = 11,5/(1+0,1) = 10,46$ л , де $X_{па}$ – доза посівного матеріалу.

Кількість посівного матеріалу для інокулятора становить

$$V_{пм2} = V_{роб2} - V_{пс2} = 11,5 - 10,46 = 1,04$$
 л

Кількість інокуляту $V_{роб.2} = 11,5$ можна одержати під час культивування стрептоміцета у посівному апараті геометричним об'ємом $V_{па2} = V_{роб.2}/K_{зап} = 11,5/0,6 = 19,16$ л . Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{сф} = 20$ л, уточнюємо раніше прийнятий коефіцієнт заповнення $K_3 = V_{роб.2}/V_{сф} = 11,5/20 = 0,57$

Кількість інокуляту для засіву інокулятора на 20 л $V_{\text{пм2}} = 1,04$ л можна отримати культивуванням у колбах на качалці. Для цього використовують качалочні колби об'ємом $V_{\text{колб}} = 750$ мл та коефіцієнтом заповнення $K_{\text{зк}} = 0,2$.

Тоді кількість колб для отримання посівного матеріалу становитиме

$$N_{\text{колб}} = V_{\text{пм2}} / (V_{\text{колб}} \times K_{\text{зк}}) = 1040 / (750 \times 0,2) = 6,93$$

Таким чином, для одержання посівного матеріалу необхідно 7 качалочних колб.

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу блеоміцину у ферментері об'ємом 200 л з коефіцієнтом заповнення 0,6 буде проходити у два етапи.

Таким чином, за результатами розрахунків для біосинтезу блеоміцину з використанням *S. tobaroensis* ATCC 15003 приймаємо до встановлення один ферментер об'ємом 200 л і один інокулятор об'ємом 20 л.

РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

4.1 Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу

Для правильного вибору умов і способу культивування необхідно опиратися на фізіолого-біохімічні характеристики біологічного агента. У Керівництві з систематики та ідифікації бартерій зазначено, що *Streptomyces mobaraensis* є аеробом, нейтрофілом, росте за температури 27-45°C. Але при промисловому культивуванні необхідно мати більш чіткі параметри ферментації, які в свою чергу можна запозичити у науковій і патентній літературі [33].

Опираючись на публікацію «Development of a new medium containing date syrup for production of bleomycin by *Streptomyces mobaraensis* ATCC 15003 using response surface methodology» [34] оптимальні умови для культивування продуцента становлять: температура є 30°C, рН = 6,5 і наявність аераційного повітря. За таких параметрів виникає необхідність асептичних умов культивування, досягти які можна при стерилізації аераційного повітря, обладнання і комунікацій, поживного середовища.

Оскільки глибинне культивування має ряд переваг у порівнянні з поверхневим, а також опираючись на склад поживного середовища, доцільно використовувати саме глибинний спосіб.

Блеоміцин є вторинним метаболітом, його значна концентрація спостерігається у стаціонарній фазі росту клітин, тому незважаючи на значні переваги безперервного культивування виникає необхідність застосування періодичного способу культивування.

					НУХТ БТЕК 04.01.26 КР ПЗ		
		№ документа	Підпис				
Розробник	Дзядук.			РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	Літера	Аркуш	Аркушів
Керівник	Красінько В.О.					35	106
Н. контр					Кафедра БТМ³⁵		
Консульт							
Зав. каф.	Стадніков						

4.2 Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Використовуючи фізіолого-біохімічні характеристики та вище описані умови і способи культивування *S. tobaqaensis* виникає необхідність вибору типу ферментера і його оснащення. Конструкція ферментера для культивування продуцента має забезпечувати:

1. Аерацію та інтенсифікацію масообмінних процесів (ферментер оснащується газорозподільним барботером, клапаном для виходу повітря з біореактора і мішалкою)
2. Сталу температуру культивування (ферментер оснащується сорочкою і датчиком температури).
3. Для запобігання можливого утворення піни будемо використовувати механічний спосіб піногасіння, принцип дії якого полягає у встановленні мішалки у верхній частині апарата, яка по команді датчика буде обертатися і розбивати піну.
4. Контролю рівня рН культуральної рідини (ферментер оснащується датчиком рН).

З замовленням щодо виробництва ферментера з заданими параметрами, що наведені вище і об'ємом 0,2 м³ можна звернутися до фірми Bionet F3-200 (Іспанія).

У ферментерах даного виробника передбачена автоматична система стерилізації, можливість внесення інокуляту в стерильних умовах, розміщені порти для відбору проб, встановлення датчиків контролю рівня піни, тиску, рН, температури, оптичної густини, передбачається подача аераційного повітря до ферментеру і наявність перемішуючого пристрою. Для контролю процесів, які протікають в ферментері, він оснащується відповідними датчиками, під'єднаними до автоматизованої системи управління процесом [41].

4.3 Обґрунтування стадій підготовки аераційного повітря.

Оскільки продуцент блеоміцину є строгим аеробом виникає необхідність підготовки стерильного аераційного повітря для процесів підготовки посівного матеріалу і виробничого біосинтезу.

До системи підготовки стерильного аераційного повітря висуваються наступні вимоги:

- підготовка великих об'ємів повітря;
- високий ступінь надійної стерилізації;
- економічність [42].

Для біотехнологічних виробництв традиційними методами підготовки повітря є метод фільтрування через перегородки з різних матеріалів. Ця методика має ряд переваг у порівнянні з стерилізацією аераційного повітря термічним методом чи іонізуючим випромінюванням, УФ-випромінюванням, оскільки процес культивування продуцента потребує великої кількості повітря, економічно доцільніше використовувати систему поетапного фільтрування [43].

Потреби продуцента в аераційному повітрі становлять 1,5 vvm, тому система очищення та стерилізації повітря повинна забезпечити наступну кількість повітря:

- для посівного апарату на 20 л (об'єм культуральної рідини становить 11,5 л) це 1,04 м³/год, а протягом всього часу культивування 48 годин – 49,92 м³
- для виробничого біосинтезу у ферментері на 200 л (об'єм культуральної рідини становить 113,9 л) це 10,25 м³/год, а протягом всього часу культивування 120 годин – 1230 м³.

Система очищення та стерилізації аераційного повітря складається з наступних структурних одиниць:

- попереднє очищення повітря;
- стиснення повітря;
- охолодження та видалення зайвої вологи;
- підігрів повітря;
- стерилізація повітря у головних фільтрах;
- стерилізація повітря в індивідуальних фільтрах.

Ефективність роботи системи очищення повітря оцінюють коефіцієнтом проскоку K_p , %, для асептичних процесів біосинтезу K_p повинен становити $10^{-8} \dots 10^{-11}$ % [43].

Фільтр попередньої очистки повітря встановлюють перед повітродувкою, щоб у неї не потрапляли пил та механічні забруднення повітря. Після цього повітря потрапляє в головний повітряний фільтр, який використовують для підготовки повітря інкулятора і ферментера. Головний повітряний фільтр встановлюється поблизу повітродувки, при роботі якої повітря внаслідок адіабатичного стискання нагрівається до 120 – 180 °С і вище. Повітря, що поступає у ферментер не має перевищувати температуру 60 °С. Для стабілізації потоку повітря і попередження його пульсацій потрібно встановити місткість – ресивер.

Для остаточного очищення повітря перед кожним ферментером встановлюється індивідуальний повітряний фільтр, фільтруючим матеріалом якого супертонке волокно з розгорнутою поверхнею, або з нефіксованими порами (абсолютні сита). При однаковому ступені надійності, абсолютні сита мають перевагу над фільтрами з розгорнутою поверхнею, а саме можливість працювати при нижчому тиску і вищій швидкості повітряного потоку. Це означає, що можна використовувати меншу площу фільтра та знизити експлуатаційні витрати. Ці системи, як і системи для стерилізації

рідин, або містяться в модулях з нержавіючої сталі і стерилізуються паром, або використовуються як одноразові капсули (переважно використовуються для процесів з клітинами тварин). Матеріали мембран для фільтрації повітря повинні бути гідрофобними і не накопичувати вологу на поверхні фільтра. Політетрафторетилен (ПТФЕ) є матеріалом, що найчастіше використовується і задовільняє вимоги до фільтруючих матеріалів. Розширений ПТФЕ є єдиною безперервною структурою, в якій всі волокна і точки перетину з'єднані, тому відсутні вільні кінці або частинки, які можуть потрапити в повітряний потік і викликати контамінацію. ПТФЕ також стійкий до нагрівання та дії активних хімічних сполук.

Таким чином, фільтри з ПТФЕ можна багаторазово стерилізувати пором без погіршення робочих характеристик, для контролю рН можна вводити аміак у повітряний потік перед фільтром. Очікуваний термін служби фільтра є важливим фактором при ферментації в промисловому масштабі, таким чином, міцність і надійність мембран з ПТФЕ приводить до збільшення робочих циклів і зменшує частоту заміни фільтра. Це в свою чергу знижує ймовірність контамінації а також витрати на утилізацію, пов'язані з використаними фільтраційними картриджами [42,44].

Отже, зважаючи на переваги фільтрів патроного типу з політетрафторетиленом, доцільно використовувати цей матеріал для індивідуальних фільтрів інокулятора на 20 л та ферментера об'ємом 200 л.

4.4 Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

Обґрунтування вибору способу способу дезінфекції

Оскільки кінцевий продукт мікробного синтезу – Блеоміцин відноситься до стерильних лікарських засобів, виникає потреба застосування галузевого стандарту – Належної Виробничої Практики [45].

Для досягнення мінімальної кількості контамінантів у всіх ділянках виробничого процесу необхідно забезпечувати чистоту на виробничих ділянках де чистота та асептика впливають на якість продукції. Тому для зниження рівня загального забруднення та мікроної контамінації проводиться комплекс робіт з такими учасниками технологічного процесу:

- дезінфекція зовнішніх поверхонь обладнання і комунікацій
- дезінфекція виробничих приміщень

Для дезінфекції обраних ділянок виробничого процесу доцільно використовувати хімічні сполуки, а для стерилізації повітря у приміщеннях – УФ-лампи. В якості хімічної сполуки використовується хімдеззасіб, а ручна дезінфекція здійснюється силами персоналу.

Критерії вибору хімдеззасобів

Дезінфікуючі засоби згідно GMP повинні відповідати наступним вимогам:

- дезінфікуючий засіб повинен мати широкий спектр дії
- дезінфікуючий засіб повинен інактивувати не тільки вегетативні форми мікроорганізмів, а також бактеріальні і грибні спори
- дезінфікуючий засіб повинен здійснювати бистру дію і мати час контакту менше 10 хвилин
- для регулярної стерилізації необхідно застосовувати два різних дезінфікуючі засоби. Вибрані засоби повинні мати різні механізми дії для попередження появи дезрезистентних штамів мікроорганізмів
- поверхні перед дезінфекцією необхідно спочатку очистити миючими засобами. Миючі засоби не повинні вступати в реакції з деззасобом та інактивувати його
- дезінфікуючий засіб не повинен залишати залишки на поверхнях
- дезінфікуючий засіб не повинен вступати в реакцію з поверхнею що обробляється

- дезінфікуючий засіб повинен використовуватися у приміщенні де температура не знижує активність засобу
- перед застосуванням партія дезінфікуючого засібів повинна пройти перевірку на бактероцидну, фунгіцидні і спороцидну дії
- дезінфікуючий засіб повинен бути безпечний для людини
- використання дезінфікуючого засобу повинно бути економічно доцільним [45,46,47].

4.4.1 Порівняльна оцінка різних класів хімдеззасобів

Дезінфікуючий засіб - хімічний засіб, що використовується для інактивації мікроорганізмів або перешкодженню їх розмноження.

Дезінфікуючі засоби розрізняються за спектром дії (таб. 4.1), способом дії (таб. 4.2) та ефективністю. Деякі з них є бактеріостатичними, що перешкоджає зростанню бактеріальної популяції. Тут дезінфікуючий засіб може викликати селективні та оборотні зміни в клітинах, взаємодіючи з нуклеїновими кислотами, інгібуючи ферменти або проникаючи у клітинну стінку.

Після того, як дезінфікуючий засіб буде видалено від контакту з клітинами бактерій, популяція бактерій, що вижила, потенційно може вирости. Інші засоби, що дезінфікують, є бактерицидними, оскільки вони руйнують бактеріальні клітини за допомогою різних механізмів, включаючи структурне пошкодження клітини; автоліз; лізис клітин та витік або коагуляція цитоплазми [48]. У межах цих груп спектр активності мінливий: одні дезінфікуючі засоби ефективні лише проти вегетативних грампозитивних та грамнегативних мікроорганізмів, тоді як інші ефективні проти грибків. Деякі дезінфікуючі засоби мають спороцидну дію, оскільки вони можуть викликати руйнування бактерій, що утворюють ендоспори (це найбільш стійких форм мікроорганізмів, які важко усунути з поверхонь чистих приміщень). Однак хімічний агент не обов'язково повинен мати

спороцидну дію, щоб його можна було класифікувати як «дезінфікуючий засіб» [49].

Таблиця 4.1

Спектр дії основних дезінфікуючих засобів

Спектр дії	Бактерициди		Мікобактерициди	Спороциди	Фунгіциди	Віруциди	
	Грам + бактерії	Грам - бактерії	Мікобактерії	Бактеріальні спори	Дріжді	Гриби	Віруси
Спирти	+++	+++	+++	-	+	++	+
Четвертинні амонійні сполуки	+++	++	-	-	++	+++	+
Гуанідини	+++	+++	-	-	+	++	+
Альдегіди	+++	+++	+++	+++	+	++	+
Активний кисень	+++	+++	+++	+++	++	+++	++
Надоцитова кислота	+++	+++	+++	+++	++	+++	++

[50]

Таблиця 4.2

Механізм дії основних дезінфікуючих засобів

Мішень	Четвертинні амонійні сполуки	Формальдегід	Спирти	Феноли	H ₂ O ₂	Натрій гіпохлорид	Глутаральдегід
Клітинна стінка		+		+		+	+
Ферменти		+				+	+
АТФ		+					
Метбрани	+	+	+	+			

табл. 4.2

Коагулянти	+	+		+			+
Нуклеїнові кислоти		+					
Амінокислоти		+				+	+
Рибосоми		+					

[51]

4.4.2 Коротка характеристика основних діючих речовин у дезінфікуючих засобах

Дезінфікуючі засоби на спиртовій основі

Переваги:

- швидкодіючі засоби загального призначення;
- швидкий час висихання- стабільно при зберіганні;
- недорогий;
- ефективний проти вегетативних мікроорганізмів;
- комбіновані дезінфікуючі засоби на спиртовій основі видаляють багато поверхневих забруднення, а також залишки дезінфікуючих та миючих засобів;
- практично не залишають залишків на поверхнях.

Недоліки:

- не спороцидні;
- цільові поверхні необхідно попередньо очистити;
- є подразниками очей і спалахують, тому їх слід застосовувати з обережністю;
- зберігати далеко від джерел тепла та окислювачів;
- не ефективні проти певних типів вірусів;

- швидко випаровується, тому цільова поверхня повинна бути достатньо зволоженою, або продукт необхідно часто наносити повторно, щоб забезпечити належний час контакту.

Дезінфікуючі засоби на основі хлору

Переваги:

- швидка дія;
- ефективний проти широкого спектру організмів;
- спорицидність (залежно від розведення);
- не залишають токсичних залишків;
- ефективно видаляє закріплені організми та біоплівки з поверхонь;
- не залежить від жорсткості води;
- відносно недорогий;
- універсальні агенти (якщо концентрація розчину змінюється, один і той же дезінфікуючий засіб може використовуватися як для звичайних, так і для спеціальних дезінфекційних завдань).

Недоліки:

- цільові поверхні необхідно попередньо очистити миючим засобом;
- може залишати сліди, що сприяють корозії, якщо залишки не будуть вчасно та належним чином видалені;
- гіпохлорит натрію в концентрації, що міститься в дезінфікуючому засобі, може спричинити опіки ротоглотки, стравоходу та шлунка, а також подразнення очей;
- інактивується органічними речовинами;
- може виділятися токсичний газоподібний хлор при змішуванні з аміаком чи кислотою, що потребує окремого зберігання;
- необхідно зберігати далеко від легкозаймистих продуктів;
- має неприємний запах;
- може спричиняти корозію, особливо при контакті з деякими металами;

- може пошкодити покриття підлоги, килими та одяг при використанні у більш високих концентраціях;

- оброблені поверхні необхідно промити стерильною водою з миючим засобом.

Дезінфікуючі засоби на основі перекису водню

Переваги:

- засоби швидкої дії;
- не залишують хімічні залишки, які можуть негативно вплинути на навколишнє середовище або призвести виникнення стійких мікроорганізмів;
- виявляють хорошу бактерицидну активність;
- ефективні проти широкого спектру патогенів, включаючи дріжджі, грибки, бактерії, вірусів у відповідних концентраціях;
- нові засоби на ринку забезпечують швидку дію, покращену сумісність матеріалів та необхідні профілі безпеки;
- не потребує промивання після використання;
- зазвичай не викликає корозії більшості поверхонь у розведеному вигляді;
- у нормальних умовах дуже стабільні при правильному зберіганні.

Недоліки:

- може спричиняти корозію якщо використовується з низьким рН при нанесення на чорні або інші важкі метали.

Комбіновані дезінфікуючі засоби надоцтової кислоти та перекису водню

Переваги:

- мають широкий спектр дії;
- мала токсичність;
- відсутність негативного впливу на довкілля;
- спороцидні при низьких концентраціях та температурі навколишнього середовища;

- швидка дію проти всіх мікроорганізмів та інактивація грампозитивних та грамнегативних бактерій, грибів, дріжджів, вірусів;

- побічні продукти (кисень, оцтова кислота, вода) екологічно не шкідливі;

- поліпшене видалення органічних забруднень;

- не інактивуються органічними речовинами;

- не виділяють шкідливих продуктів під час розпаду;

- не залишають побічних продуктів.

Недоліки:

- може спричинити корозію деяких металів (наприклад, міді, латуні, бронзи, гальванізованого заліза), але цей ефект можна зменшити за допомогою добавок та/або зміни рН.

Фенольні засоби дезинфекції

Переваги:

- ефективні в широкому діапазоні рН;

- стабільні у зберіганні;

- мають фунгіцидну, віруцидну та бактерицидну дію при рекомендованому розведенні;

- мала вартість.

Недоліки:

- не спороцидні;

- можуть викликати подразнення шкіри та очей у персоналу;

- деякі (зазвичай ті, що містять пропелен) легкозаймисті;

- можуть видавати неприємний запах;

- можуть пошкодити поверхню підлог та інших поверхонь;

- мають низьку розчинність у воді;

- може знадобитися попереднє очищення цільових поверхонь;

- зазвичай залишають липкий залишок, який потрібно промити, щоб видалити;

- певною мірою токсичні для навколишнього середовища;

- утилізація потребує дотримання державних стандартів.

Засоби на основі четвертинних сполук амонію

Переваги:

- зазвичай мають фунгіцидну, бактерицидну та віруцидну дію проти покритих оболонкою вірусів;
- менш токсичні та менш агресивні, ніж багато інших засобів;
- швидка дезинфекція;
- зазвичай не подразнюють шкіру;
- стабільні при зберіганні;
- ефективні при температурі до 100°C.

Недоліки:

- виявляють слабку мікобактерицидну активність;
- не споророцидні;
- деякі засоби не мають віруцидної дії щодо гідрофільних (без оболонки) вірусів;
- може спалахувати, якщо до складу входять спирти;
- ефективність знижується жорсткою водою та органічними речовинами та нейтралізується деякими мийними засобами;
- подразнюють очі та шкіру [51,52].

4.4.3 Обґрунтування вибору дезінфікуючого засобу

Використовуючи данні наведені вище, а також проаналізувавши всі недоліки і переваги та механізми дії на мікроорганізми основних груп дезінфікуючих засобів було обрано засоби «Секусепт Актив», діючою речовиною якого є надоцитова кислота (НОК) та «Бланідас оксідес» з діючими речовинами – пероксид водню, алкілдиметилетилбензиламоній хлорид, полігексаметиленгканідин гідрохлорид. Хоч вибрані засоби мають ряд недоліків у порівнянні з комбінованими дезінфікуючими засоби надоцтової кислоти та перекису водню, їх використання є набагато дешевшим.

Таблиця 4.3

**Габаритні розміри основного обладнання для виробництва
блеоміцину**

Обладнання	Геометричний об'єм, л (м ³)
Ферментер	200
Реактор-змішувач для розчинення та приготування композиції Б (NaNO ₃ , CuSO ₄ ×7H ₂ O, ZnSO ₄ ×7H ₂ O) при виробничому біосинтезі	30
Реактор-змішувач для розварювання, приготування і стерилізації композиції А (Крохмаль, соєвий шрот, глюкоза, кукурудзяний екстракт, фініковий сироп)	100
Інокулятор	20
Реактор-змішувач для приготування розчину (глюкози, фінікового сиропу і кукурудзяного екстракту) при виробничому біосинтезі	20
Реактор-змішувач для розварювання, приготування і стерилізації композиції А (Крохмаль, соєвий шрот, глюкоза, кукурудзяний екстракт, фініковий сироп)	15
Мірник для подачі стерильних титрувальних розчинів та піногасника в інокулятор і ферментер (6 шт об'ємом 1 л)	6
Всього	0,391 м³

Виробництво блеоміцину здійснюється упродовж 170 днів. Оптимальна цеху виробничого біосинтезу в якому встановлено ферментер (200 л), інокулятор 20 л становить 20 м² (4×5 м). Висота стін – 2,5 м, відстань між стінами та апаратами становить 1,0 - 1,5 метра. Загальна площа стін становить ((4×2,5) + (5×2,5))×2 = 45 м². Площа підлоги – 20 м², загальна площа 20+45 = 65 м². Узагальнені дані наведені у таблиці 4.4.

Таблиця 4.4

Розрахунок загальної площі стін та підлоги виробничих приміщень

Приміщення	Площа підлоги, м ²	Площа стін, м ²	Загальна площа, м ²
Цех виробничого біосинтезу та вирощування інокуляту	20	45	65

Цех приготування поживного середовища	20	45	65
Мікробіологічна лабораторія	30	55	85
Загальна площа	70	145	215

З метою забезпечення чистоти виробничих приміщень, миття підлоги проводиться після кожної зміни (тричі на день) , тобто 510 разів. Також, раз на тиждень здійснюється генеральне прибирання (оброблюються стіни, підлога, вікна тощо).

Миття та дезинфекцію треба здійснити в наступних виробничих цехах: приміщення виробничого біосинтезу та вирощування іннокуляту, цех підготовки поживного середовища, лабораторне приміщення де знаходяться автоклав, бокс, термостати, холодильник, центрифуги, контрольно-вимірювальна апаратура.

Розрахунок загальної площі (об'єму) миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва. Миття обладнання відбувається перед кожним циклом, кількість процесів миття за весь період виробництва складає 27. З урахуванням додаткового миття після останнього циклу кількість процесів миття – 28. Тоді загальний об'єм миття становитиме:

$$0,391 \times 28 = 10,95 \text{ м}^3$$

Розчини для миття обладнання складають приблизно 50% від загального об'єму, тоді за один цикл миття буде витрачатися:

$$0,391 \times 0,5 = 0,195 \text{ м}^3 \text{ миючого розчину}$$

За весь час виробництва блеоміцину буде використано наступну розчину для миття:

$$0,195 \times 27 = 5,27 \text{ м}^3.$$

Таблиця 4.5

**Розрахунок загальної площі миття та/або дезінфекції
оброблюваного об'єкту за весь період виробництва блеоміцину**

Об'єкт миття та/або дезінфекції	Площа (об'єм) оброблюваного об'єкту, м² (м³)	Кількість процесів миття та/або дезінфекції за весь період виробництва	Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м² (м³)
Обладнання	0,391	27	10,59
Підлога	70	510	35700
Стіни, двері, вікна	145	25	3625

Засіб «Секусепт Актив» (Sekusept Aktiv) на основі надоцтової кислоти розроблений з використанням системи PerOxyBalance, що створює буферний розчин оптимального рН для збалансованої дії 5 основних властивостей НОК.

Активні речовини: пероксигідрат карбонату натрію - 44,55%; тетраацетилетилендіамін– 25,0%. Діюча речовина - надоцтова кислота (НОК), що утворюється при приготуванні водного розчину засобу. Вміст надоцтової кислоти в 1,0%-ному водному розчині засобу після 15 хв розчинення становить не менше 1000 ppm (0,1%), в 2,0%-ному водному розчині засобу після 15 хв розчинення - не менше 2000 ppm (0,2%).

Система PerOxyBalance забезпечує максимальну мікробіологічну активність повного спектру дії (включаючи спори *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Clostridium difficile*) протягом усього терміну придатності робочого розчину. Засіб забезпечує відмінні очисні характеристики та стабільність робочого розчину протягом усього терміну придатності робочого розчину.

Розчин сумісний з матеріалами (допоміжні речовини зменшують агресивність дії НОК) та має високий рівень безпеки для персоналу (менш виражений запах НОК). Засіб набагато безпечніший у порівнянні з альдегідними засобами та, на відміну від останніх, не фіксує білкові сполуки на поверхнях. Засіб протестований згідно з останніми нормами Європейського комітету зі стандартизації.

Засіб Секусепт Актив добре розчиняється у воді, робочі розчини засобу прозорі, зі слабким блакитним відтінком, виявляють відмінні миючі та дезінфікуючі властивості. Робочі розчини засобу не фіксують білкові та інші органічні та неорганічні забруднення, ефективно видаляють неорганічні та органічні забруднення, включаючи білкові, жирові із зовнішніх поверхонь та різноманітних матеріалів та обладнання. Засіб має відмінну сумісність з матеріалами всіх типів поверхонь [53].

Засіб дезінфікуючий «Бланідас оксидез» являє собою однорідну прозору рідину від безбарвного до інтенсивного жовтого кольору зі слабким специфічним запахом. Має виражені миючі, змочувальні, дезодоруючі, емульгуючі властивості. Робочі розчини не пошкоджують об'єкти, що виготовлені із корозійностійких і не стійких до корозії металів, термостабільних і термолабільних матеріалів, скла, гуми, полімерів, дерева.

Діючі речовини: пероксид водню – 12,0, алкілдиметилетилбензиламоній хлорид – 3,75, полігексаметиленгуанідин гідрохорид – 2,0, вода – до 100,0 [54].

4.4.4 Обрані миючі засоби

Кальцинована сода. Являє собою зневоднений вуглекислий натрій Na_2CO_3 - білий дрібнокристалічний порошок, добре розчинний у воді. У водних розчинах кальцинована сода частково розпадається, утворюючи їдкий луг і гідрокарбонат, які є діючим миючим початком. Гарячі (50-60 °С) розчини кальцинованої соди добре омиляють забруднені поверхні та

руйнують білкові залишки. Якщо температура миючих розчинів знижується до 40-30°C, їхня миюча здатність різко падає. Рекомендують використовувати 0,5% розчини кальцинованої соди при температурі 40-50°C для ручного миття обладнання і 1-2% розчини температурою 70-80°C при циркуляційній мийці.

Каустична сода. Являє собою безбарвну кристалічну речовину. (NaOH – їдкий натр). Їдкий натр – NaOH – активно розчиняється у воді, утворюючи розчини з високим рН. На повітрі їдкий натр значно поглинає вологу і з'єднується з вуглекислотою повітря, утворюючи пухнастий білий наліт вуглекислого натрію, дезінфікуючий і миючий ефект якого значно слабший за вихідний препарат. Гарячі 2-3% розчини каустичної соди добре омиляють забруднені поверхні, гідролізують білок, розщеплюють вуглеводи. Розчини такої концентрації при температурі 60-70°C мають значну бактерицидну дію. Для миття обладнання можна використовувати 0,15-0,5% розчини каустичної соди при ручному митті та 1-2% розчини при циркуляційній мийці [55].

Біомой - багатокомпонентний, поліфункціональний, біоактивний миючий засіб з дезінфікуючим ефектом рекомендований Міністерством здоров'я України.

Препарат являє собою порошок, світлих тонів (допускається присутність забарвлених включень ензимів). Добре розчиняється у воді (розчинність не менше 30 г/дм³); робочі розчини Біомою безбарвні, не ушкоджують оброблювані вироби і володіють вираженими емульгуючими і миючими властивостями, легко видаляють білково-жирову плівку, добре змиваються, не залишаючи нальоту на оброблюваних поверхнях. Не сумісний з катіонами поверхнево-активних речовин.

Біомой належить до малонебезпечних речовин (4 клас небезпеки) при попаданні в шлунок і на шкіру, не проявляють кумулятивних, шкіро-поздражнюючих і сенсебілізуєчих властивостей. У концентраціях

рекомендованих до застосування, не подразнює слизову оболонку очей. Завдяки вдало збалансованій рецептурі, яка включає ряд миючих компонентів ферменти з високою протеолітичною активністю Біомой має виражені властивості по очищенню поверхонь, які обробляються, від жирів і білка.

Області застосування Біомою: передстерилізаційне очищення та миття виробів медичного призначення з металу, скла, полімерів і гуми, включаючи жорсткі та гнучкі ендоскопи. При цьому не потрібно застосування в комплексі з ним перекису водню; миття та дезінфекція різноманітного технологічного обладнання, інвентарю, комунікацій і тари.

Для приготування робочого розчину біомоя використовується концентрація 0,15-0,5%. Робочий розчин Біомою готують в тарі будь-якого матеріалу шляхом розчинення в питній воді [56].

Таблиця 4.6

Узагальнена характеристика основних мийних та дезінфікуючих засобів для виробництва блеоміцину

Назва мийного/ дезінфікувального засобу	Об'єкт миття та/або дезінфекції	Конц. робочого розчину, %	Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м ² (м ³)	Кількість робочого розчину за весь період виробництва, л	Витрата на 1 м ² поверхні, л	Вартість 1 л/кг мийного або дезінфікувального засобу, грн.	Вартість 1 л робочого розчину, грн	Загальна вартість миття та/або дезінфекції за весь період виробництва, грн
Кальцинована сода [1]	Обладнання, інвертар, комунікації	2,0	10,58	5,29	0,5	14,8	0,3	1,59
Каустична сода [2]		2,0	10,58	5,29	0,5	37	0,74	3,92
Біомой [3]	Стіни, підлога, вікна, двері	0,3	39325	3932,5	0,1	174,3	0,52	2045
Секусепт Актив [4]	Стіни, підлога, вікна, двері	2,0	39325	3932,5	0,1	562	10,52	41370
Бланідас оксидез [5]	Стіни, підлога, вікна, двері	0,25	39325	3932,5	0,1	247,4	0,61	2399

1. https://prom.ua/p544336778-soda-kaltsinirovannaya-soda.html?utm_source=google_pla&utm_medium=cpc&utm_content=pla&utm_campaign=cpa_50_B2B&gclid=Cj0KCQiAtJeNBhCVARIsANJUJ2GoEL9gL8flUJSZce3c2LelrrV60xau4To9cMaYUWesQUULAe7ErEaAhh7EALw_wcB
2. <https://prom.ua/p1202831195-soda-kausticheskaya.html?&primelead=My4y>
3. <https://prom.ua/p3538341-biomoj-moyuschee-dezinfitsiruyushee.html?&primelead=MS41>
4. <https://hlorka.in.ua/p629894711-sekusept-aktiv.html>
5. <https://hlorka.in.ua/p587583533-blanidas-oksidez.html>

4.5 Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища.

Для виробничого біосинтезу блеоміцину *S. mobaraensis* ATCC 15003 використовується середовище такого складу (г/л):

Крохмаль – 32;

Глюкоза – 5;

Соевий шрот – 4,375;

Кукурудзяний екстракт – 7,5;

ZnSO₄×7H₂O - 0,15;

CuSO₄×7H₂O – 2,5;

NaNO₃ – 0,15;

K₂HPO₄ – 0,5;

Фініковий сироп – 25,0;

pH при культивуванні - 6,5 [33].

Виробничий біосинтез здійснюється у ферментері об'ємом 200 л з коефіцієнтом заповнення 0,6. Підготовка посівного матеріалу відбувається у дві стадії (у колбах на качалці, в інокуляторі об'ємом 20 л).

Стерилізацію середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках будемо здійснювати в автоклаві, оскільки його об'єм невеликий (1,04 л).

Для культивування в інокуляторі і ферментері – солі (NaNO_3 , $\text{CuSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, K_2HPO_4 , $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$) безпосередньо у самих апаратах. Після розварювання крохмалю і соєвого шроту у збірнику здійснюємо додавання розчину глюкози, кукурудзяного екстракту та фінікового сиропу для подальшої стерилізації.

4.5.1 Вирощування інокуляту в колбах на качалках

Компоненти композиції А - дріжджовий автолізат, кукурудзяний екстракт, крохмаль, глюкоза, соєвий шрот, фініковий сироп є термолабільними і потребують м'якого режиму стерилізації. Солі композиції Б стерилізують при стандартній для солей температурі.

Проаналізувавши склад поживного середовища для вирощування *S. tobaraensis* ATCC 15003, стерилізуємо його в автоклаві та умовно ділимо на такі композиції (залежно від режиму стерилізації компонентів):

Композиція А: кукурудзяний екстракт, крохмаль, глюкоза, соєвий шрот, фініковий сироп (режим стерилізації: температура 112 °С тиск 0,05 МПа, 30 хв).

Композиція Б: NaNO_3 , $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, K_2HPO_4 , $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (режим стерилізації: температура 131 °С, тиск 0,15 МПа, 40 хв).

4.5.2 Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 20 л

Стерилізація 10,5 л поживного середовища, необхідного для цієї стадії, здійснюється в автоклаві за таких композицій:

Композиція А: кукурудзяний екстракт, крохмаль, глюкоза, соєвий шрот, фініковий сироп (режим стерилізації: температура 112 °С, тиск 0,05 МПа, 30 хв).

Композиція Б: NaNO_3 , $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, K_2HPO_4 , $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (режим стерилізації: температура 131 °С, тиск 0,15 МПа, 40 хв).

Стерилізація композиції Б відбувається в посівному апараті, тому що умови її стерилізації є жорсткішими, ніж композиції А. Солі розчиняють в окремому збірнику, з якого потім вони будуть подані в посівний апарат, де проводиться стерилізація.

4.5.3 Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 200 л

Середовище ділять на такі композиції:

Композиція А: кукурудзяний екстракт, крохмаль, глюкоза, соєвий шрот, фініковий сироп (режим стерилізації: температура 112 °С, тиск 0,05 МПа, 30 хв).

Композиція Б: NaNO_3 , $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, K_2HPO_4 , $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (режим стерилізації: температура 131 °С, тиск 0,15 МПа, 40 хв).

Стерилізація композиції Б відбувається в ферментері, композиція А стерилізується у збірнику.

Для підготовки поживного середовища необхідно передбачити такі збірники:

- для стерилізації композиції А;
- для змішування та розчинення солей композиції Б

4.6 Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН та піногасника

4.6.1 Вибір розчинів для регуляції рН

Для підтримання рівня рН 6,5 під час вирощування посівного матеріалу в інокуляторі та виробничого біосинтезу ферментері необхідно приготувати стерильні 6% розчини натрію гідроксиду і хлоридної кислоти. Використовувати органічні підкислювачі і розчини аміаку недопустимо, оскільки синтез цільового продукту залежить від співвідношення вуглець/азот.

Оскільки продуцент не виділяє в культуральну рідину велику кількість речовин що здатні значно змінювати рН середовища, пропонується використовувати 2 мл 6% розчинів титрувальних агентів для зміни рН на одну одиницю в більшу чи меншу сторону.

Зважаючи на наявність у складі поживного середовища компонентів що можуть мати різний хімічний склад в залежності від партії (кукурудзяний екстракт, фініковий сироп, соєвий шрот), а також можливість контамінації культуральної рідини, варто приготувати на 25% більше титрувальних агентів для їх запасу в системі автоматизації. Підвищення вмісту титрувальних агентів майже не впливає вартість культивування, оскільки їх загальний об'єм на всіх технологічних стадіях не буде перевищувати 1 л.

Розрахунок кількості титрувальних агентів для інокулятора об'ємом 20 л. Для 11,5 л культуральної рідини кількість титрувальних агентів буде становити:

HCl – 29 мл;

NaOH – 29 мл.

Розрахунок кількості титрувальних агентів для ферментера об'ємом 200 л. Для 113,9 л культуральної рідини кількість титрувальних агентів буде становити:

HCl – 285 мл;

NaOH – 285 мл.

4.7 Вибір піногасника

Піна являє собою різноманітні тонкошарові структури заповнені газом. Під час культивування піна виникає за рахунок механічних процесів на межі поділу фаз а також через надходження газів у культуральну рідину [57]. Білки та інші метаболіти продуцента можуть підвищувати стійкість піни [58]. У виробничому біосинтезі серйозною проблемою є піноутворення, оскільки цей процес може здійснювати наступні негативні наслідки:

- зниження кількості розчиненого кисню в культуральній рідині;
- піна може пошкодити індивідуальний фільтр у ферментері;
- піна разом з відпрацьованим аераційним повітрям може потрапити у повітряні викиди, що зменшує кількість культуральної рідини у ферментері [59].

Оскільки в складі поживного середовища наявні компоненти що здатні підвищувати піноутворення (кромаль, соєвий шрот, кукурудзяний екстракт) виникає необхідність використання хімічного піногасника.

Хімічні піногасники – повернево-активні речовини які знижують поверхневий натяг піни і дестабілізують білкові плівки за рахунок:

- гідрофобних мостиків між двома поверхнями;
- усунення абсорбуючого білка;
- швидкого розповсюдження молекул піногасника по всій поверхні плівки.

Хімічний піногасник повинен відповідати наступним вимогам:

- швидко диспергуватися і швидко усувати піну;
- повинен бути активним при низьких концентраціях;
- мати тривалу дію для унеможливлення утворення нової піни;
- не метаболізуватися мікроорганізмами;
- не бути токсичним для продуцента;

- не виявляти негативної дії на концентрації розчиненого кисню;
- не утруднювати процес виділення і очистки цільового продукту;
- бути економічно доступним [44].

У біотехнологічних процесах використовуються наступні піногасники що відповідають вищепереліченим вимогам:

- спирти (стеарил, окрил деканол);
- складні ефіри;
- жирні кислоти та їх похідні;
- силікони;
- сульфонати;
- інші за хімічною будовою сполуки (оксизалін, поліпропіленгліколь) [44,60].

З урахуванням всіх вищеперелічених вимог для гасіння піни буде використовуватися Twin 60 (полісорбат) в концентрації 0,03 % на 1 л культуральної рідини [61].

4.7.1 Розрахунок необхідної кількості піногасника для інокулятора об'ємом 20 л та ферментара на 200 л

Для інокулятора з об'ємом культуральної рідини 11,5 л необхідно:

11500 мл – 100%

X – 0,03%

X = 3,45 г піногасника

Для ферментара з об'ємом культуральної рідини 113,9 л необхідно:

113900 мл – 100%

X – 0,03%

X = 34,17 г піногасника

Стерилізація готового розчину піногасника на всіх стадіях культивування буде відбуватися в автоклаві при 112 °С, тиску 0,05 МПа протягом 30 хв.

РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Таблиця 5.1

Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу блеоміцину

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
-1	ПЗ Повітрязабірник	1	Корпус повітрязабірника моделі В10-0400-МТ-010 виготовлений з нержавіючої сталі та обладнений захисним кожухом [1].
2	Ф- Фільтр попередньої очистки	1	Модель VGXL11-610x305x292-P-PS виробництва Camfil (Швеція) Фільтруючий матеріал – скловолокно, продуктивність 1500 м ³ /год, Е = 95 % [2]

				НУХТ БТЕК 04.01.26 КР ПЗ		
		<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>			
<i>Розробник</i>	<i>Дзядук..</i>			РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ	<i>Літера</i>	<i>Аркуш</i>
<i>Керівник</i>	<i>Красінько В.О.</i>					<i>62</i>
<i>Н. контр</i>						<i>106</i>
<i>Консульт</i>					Кафедра БТМ₂	
<i>Зав. каф.</i>	<i>Стадніков</i>					

табл. 5.1

К-3	Компресор	1	Компресор A1110 фірми Comrag (Німеччина) потужність – 11кВт, тиск – 1 МПа, продуктивність 1,4 м ³ /хв. Габаритні розміри (мм): ширина 900 довжина 1170 мм висота 7000 мм [3]
Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Теплообмінник-охолоджувач моделі Cool Pro AF025 фірми МТА (Італія) продуктивність на виході з апарату 1,2 м ³ /хв, габаритні розміри, (мм): довжина 600, висота 870, робочий тиск до 1МПа [4]
Рс-5	Ресивер-вологівідділювач	1	Ресивер серії РВ-500 фірми «Укргазкомплект» (Україна), об'єм 500 л, робочий тиск 1 МПа, габаритні розміри (мм): діаметр 600, висота 3000 [5]
Т-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Пластинчастий теплообмінник LC-110-5-2 фірми Secespol (Польща) виготовлений з нержавіючої сталі, габаритні розміри, мм: 110×225×463, робочий

Продовження табл. 5.1			тиск до 2,3 МПа, Таблиця 5.1
			макс./мін. робоча температура (°С)- 10...200, поверхня теплообміну 5,4 м ² [6]
Ф-7	Фільтр головний	1	Модель VGXL14-610x305x292-P-PS виробництва Camfil (Швеція) Фільтруючий матеріал – скловолокно, продуктивність 1500 м ³ /год , E = 99,995 % [2]
Р-8	Реактор-змішувач для розварювання, приготування і стерилізації композиції А (Крохмаль, соєвий шрот, глюкоза, кукурудзяний екстракт, фініковий сироп)	1	Реактор-змішувач моделі IFP-021-1115-EJ виробництва International Filter Products (США), виготовлений з сталі марки SS316, оснащений паровою сорочкою та перемішувачим пристроєм. Загальний об'єм 15 л, швидкість перемішування до 100 об/хв. Габаритні розміри (мм): ширина 394, висота 513 [7]
Р-9	Реактор-змішувач для приготування розчину (глюкози, фінікового сиропу і кукурудзяного екстракту) при виробничому біосинтезі	1	Реактор-змішувач моделі ТОРТ-TFCF20-10 виробництва Shaanxi (Китай), виготовлений з сталі макри SS304, оснащений паровою

табл. 5.1

			сорочкою та перемішуючим пристроєм. Загальний об'єм 20 л, швидкість перемішування до 500 об/хв. Габаритні розміри (мм): ширина 325, висота 775 [8]
Д-10	Проточний дозатор	1	Проточний дозатор моделі ПДЖ-1-15 виробництва СЕМЗ (Росія), максимальна потужність 20 Вт, межа жозування 0,1-999,9 л, точність дозування $\pm 2\%$, максимальний тиск на вході 0,8 МПа, швидкість дозування 20-40 л/хв [9]
Р-11	Реактор-змішувач для розварювання, приготування і стерилізації композиції А (Крохмаль, соєвий шрот, глюкоза, кукурудзяний екстракт, фініковий сироп)	1	Реактор-змішувач об'ємом 100 л моделі АЕ 100 виробництва Pfaudler (Німеччина), виготовлений з сталі макри SA 516GR 60, оснащений паровою сорочкою та перемішуючим пристроєм до 500 об/хв, робочий тиск до 0,6 МПа, температура до 200 °С. Габаритні розміри (мм):

табл. 5.1

			ширина 680, висота 931 [10]
P-12	Реактор-змішувач для розчинення та приготування композиції Б (NaNO_3 , $\text{CuSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$) при виробничому біосинтезі	1	Реактор-змішувач об'ємом 30 л моделі 30L DBT виробництва Lee Industries (США), виготовлений з сталі макри SS304, оснащений паровою сорочкою та перемішувачем пристроєм до 100 об/хв, робочий тиск до 0,5 МПа, температура до 205 °С. Габаритні розміри (мм): ширина 305, висота 458 [12]
ФІ-13 ФІ-14	Фільтри індивідуальної очистки	2	Фільтр моделі HIGH FLOW BIO-X виробництва Domnick Hunter (Велика Британія) Фільтруючий матеріал – політетрафторетиленовий полімер, фільтрація частинок до 0,01 мкм, продуктивність до 700 м ³ /год, температура стерилізації до 142 °С, рекомендований тиск на вході фільтра до 0,35 МПа, рекомендована

Продовження

Таблица 5.1

табл. 5.1

			температура на вході до 60 °С [13]
Мр-15 Мр-16 Мр-17 Мр-18 Мр-19 Мр-20	Мірник для подачі стерильних титрувальних розчинів та піногасника в інокулятор і ферментер	6	Мірник об'ємом 1 л моделі М2р-1г виробництва «Дейс» (Україна) виготовлени з сталі макри SS304, похибка не більше 0,1%. Габаритні розміри (мм): діаметр – 152; висота – 250 [14]
ПА-21	Посівний апарат (інокулятор)	1	Ферментер Biostat RCP-C20L. Робочий об'єм 20 л, обладнений сорочкою, швидкість перемішування трьох-рівневої лопатевої мішалки 20 - 1000 об/хв, виготовлений з нержавіючої сталі марки AISI 304/ AISI 316, наявна система автоматизованого управління з цифровим дисплеєм, присутній пробовідбірник. Датчики: температури, розчиненого кисню, мутності, піни, рН, тиску; Мінімальне заповнення –

Продовження

Таблиця 5.1

табл. 5.1

			7,5 л. Робочий тиск до 0,4 МПа, робоча температура до 150 °С. Геометричні розміри - ширина, висота, товщина (мм): 1020 × 1900 × 750 [15]
ФР-22	Ферментер	1	Ферментер Bionet F3-200 Робочий об'єм 200 л, обладнений сорочкою, швидкість перемішування шести-рівневої лопатевої мішалки 100 - 800 об/хв, виготовлений з нержавіючої сталі марки AISI 304/ AISI 316, наявна система автоматизованого управління з цифровим дисплеєм, присутній пробовідбірник. Датчики: температури, розчиненого кисню, мутності, піни, рН, тиску; Робочий тиск до 0,4 МПа, робоча температура до 150 °С. Геометричні розміри - висота, діаметр (мм): 1601 × 530 [16]
Н-23	Перистальтичний насос	1	Продуктивність 453 л/год, тиск 0,3 Мпа,

Закінчення

Таблиця 5.1

табл 5.1

			потужність 0,18 кВт. Габаритні розміри (мм): висота 444, ширина 289 [11]
--	--	--	---

1. <https://www.filters.com/product-category/air-gas-filters/air-intake-housing/>
2. <https://www.camfil.com/product/documents/dam/42225/Product-Documentation-Absolute-VGXL-VGXXL-ProSafe.pdf>
3. <https://airgroup.com.ua/p538372758-vozdushnyj-vintovoj-kompressor.html>
4. https://www.mta-it.com/backend/prodotti/file_upload/allegato/2002131207111_d_coolpro_eng_02_2020.pdf
5. <https://prom.ua/p1434175400-resiver-vozduhosbornik-500.html>
6. <https://kotelzip.com.ua/p453864813-secespol-110-plastinchatyj.html>
7. https://assets-us-01.kc-usercontent.com/26f67346-36e9-000a-c830-ecce4cca89bd4/7e21b1ca-6f54-441a-b278-c4d7f5137be6/Sanitary%20Jacketed%20Mini-Bioreactor_V8.pdf
8. https://www.kgcscientific.com/images/CHEMICAL%20REACTOR_LATEST.pdf
9. <https://semz.ru/podgotovka-i-dozirovanie-zhidkih-komponentov/nakopiteli-i-doatory-vody/protochnyy-doator-zhidkostey-pdzh-1-15/>
10. https://www.pfaudler.com/uploads/files/A_Pfaudler-DIN-AE-Reactors-622-4E.pdf
11. https://www.bibus.pt/fileadmin/product_data/FLUIMAC/documents/FLUIMAC_Peristaltic_Pumps.pdf
12. <https://www.bid-on-equipment.com/reactors/stainless-steel-reactors/363239~30-liter-lee-industries-30l-dbt-reactor---stainless-steel.htm>
13. https://www.parker.com/Literature/Bioscience-Division/FoodBev/UK-Lit/DS_FBG_01_HIGH_FLOW_BIO_X_1B.pdf
14. https://prom.ua/ua/p714407011-mernik-etalonnyj.html?utm_source=google_pmax&utm_medium=cpc&utm_content=pmax&utm_campaign=Pmax_cpa_50_dom_i_sad&gclid=Cj0KCQiAwqC OBhCdARIsAEPyW9kNGFkGWpE5qgJjUEJGOIFngHFz0YWCMZtxbTrP qhlW2PAvkSH_8UcaAkvVEALw_wcB
15. https://www.sartogsm.ru/pdf/Data_BIOSTATCplusEclusiveFlow.pdf

	16. https://bionet.com/vp-content/uploads/2021/04/f3_stainless-steel-pilot-sip-bioreactor-fermenter-fermentor1.pdf						
Розробник	Дзяцк.	РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ			Літеря	Аркуш	Аркушів
Керівник	Красінко В.О.	ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ					106
Н. контр					Кафедра БТМ ⁹		
Консульт							
Зав. каф.	Стадніков						

ДР 1. Підготовка стерильного аераційного повітря

ДР 1.1 Забір атмосферного повітря

Забір атмосферного повітря здійснюється вертикальною трубою з повітрязабірником (ПЗ-1) вистою 10 м, яка встановлена на даху виробничої будівлі.

ДР 1.2. Попереднє грубе очищення повітря

Повітря яке пройшло через повітрязабірник далі по комунікаціям аераційної системи піддається грубій очистці через скловолокнистий фільтр (Ф-2) з ступенем очистки $E = 95\%$, і видаленням частинок $\delta > 50$ мкм.

ДР 1.3 Компресування повітря

Для видалення зайвої вологи у повітрі та належного подальшого проходження по системі підготовки і подолання місцевих опорів, повітря необхідно стиснути до 0,1 – 0,35 МПа і $t = 120 - 180^\circ\text{C}$ – цей процес забезпечується компресором (К-3).

ДР 1.4. Охолодження повітря та видалення вологи

Для видалення зайвої вологи що утворилася при компресуванні, повітря необхідно охолодити у водяному теплообміннику (Т-4) до температури $25-30^\circ\text{C}$. При цьому зайва волога видаляється у ресивері (Рс-5), де регулюється пульсація руху повітря, оскільки цей параметр може негативно вплинути на роботу подальших підсистем підготовки повітря. Вологість на виході з ресивера не повинна перевищувати $W = 60-65\%$.

					НУХТ БТЕК 04.01.26 КР ПЗ		
		<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>				
<i>Розробник</i>		<i>Дзядук</i>			<i>Літера</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Керівник</i>		<i>Драєвський</i>	<i>ДР 1.5 Насичення повітря</i>			70	
<i>Н. контр</i>					Кафедра БТМО		
<i>Консульт</i>							
<i>Зав. каф.</i>		<i>Стадніков</i>					

Повітря нагрівають до температури 45-50°C у теплообміннику-нагрівачі (Т-6).

ДР 1.6 Головне тонке очищення повітря

Підігріте повітря з попередньої стадії надходить у головний фільтр (Ф-7) який встановлений неподалік ферментаційного цеху. Ступінь очищення повітря становить $E = 99,995\%$.

ДР 1.7 Очищення повітря в індивідуальних фільтрах

Повітря з ступенем очищення $E = 99,995\%$ через трубопроводи подається в індивідуальні фільтри з ПТФЕ інокулятора на 20 л (ФІ-13) та ферментера на 200 л (ФІ-13), фільтрація частинок до 0,01 мкм.

ДР 2. Приготування та стерилізація піногасника

ДР 2.1 Приготування піногасника для колб на качалках

На технічних терезах зважують 0,4 г піногасника Twin 60, після чого додають в колбу об'ємом 50 мл і вносять 20 мл питної води, перемішують до повного розчинення.

Отриманий розчин піногасника до ДР 4.1.2

ДР 2.2 Приготування та стерилізація піногасника для інокулятора об'ємом 20 л

На технічних терезах зважують 3,5 г піногасника Twin 60, після чого додають в колбу об'ємом 100 мл і вносять 50 мл питної води, перемішують до повного розчинення. Отриманий розчин стерилізують в автоклаві при $t = 112\text{ }^{\circ}\text{C}$ (30 хв) під тиском 0,05 МПа. Стерильний розчин піногасника в асептичних умовах переносять до стерильного мірника об'ємом 1 л (Мр-15), підключеного до системи автоматизації інокулятора об'ємом 20 л (ПА-21).

Отриманий розчин піногасника до ТП 5.5

ДР 2.3 Приготування та стерилізація піногасника для ферментера об'ємом 200 л

На технічних терезах зважують 34,2 г піногасника Twin 60, після чого додають в колбу об'ємом 1 л і вносять 600 мл питної води, перемішують до повного розчинення. Отриманий розчин стерилізують в автоклаві при $t = 112$ °С (30 хв) під тиском 0,05 МПа. Стерильний розчин піногасника в асептичних умовах переносять до стерильного мірника об'ємом 1 л (Мр-18), підключеного до системи автоматизації ферментера об'ємом 200 л (ФР-22).

Отриманий розчин піногасника до ТП 6.1.

ДР 3. Приготування та стерилізація титрувальних розчинів

ДР 3.1 Приготування і стерилізація титрувальних агентів для підтримання рН в посівному апараті об'ємом 20 л .

ДР 3.1.1 Приготування стерильного 6% розчину хлоридної кислоти

Для підтримання рН культуральної рідини під час вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємо 20 л необхідно приготувати 29 мл 6% НСІ.

Для цього в колбу об'ємом 100 мл наливають 24 мл стерильної дистильованої води, при постійному перемішуванні подають 5 мл концентрованої 36% хлоридної кислоти. Колбу закривають скляним корком і отриманий розчин в асептичних умовах переносять до стерильного мірника об'ємом 1 л (Мр-16), підключеного до системи автоматизації інокулятора об'ємом 20 л (ПА-21).

Отриманий розчин до ТП 5.5.

ДР 3.1.2 Приготування і стерилізація 6% розчину гідроксиду натрію

Для підтримання рН культуральної рідини під час вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 20 л необхідно приготувати 29 мл 6% NaOH.

Для цього на технічних вагах зважують 1,74 г кристалічного NaOH. Наважку поміщають в колбу об'ємом 50 мл, додають 29 мл дистильованої

води і перемішують до повного розчинення, закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізують в автоклаві при 131°C (0,15 МПа) протягом 40 хв. Отриманий стерильний розчин в асептичних умовах до стерильного мірника об'ємом 1 л (Мр-17), підключеного до системи автоматизації інокулятора об'ємом 20 л (ПА-21).

Отриманий розчин до ТП 5.5.

ДР 3.2 Приготування і стерлізація тирувальних агентів для підтримання рН в ферментері об'ємом 200 л .

ДР 3.2.1 Приготування стерильного 6% розчину хлоридної кислоти

Для підтримання рН культуральної рідини під час виробничого біосинтезу в ферментері об'ємом 200 л необхідно приготувати 285 мл 6% НСІ.

Для цього в колбу об'ємом 500 мл наливають 237 мл стерильної дистильованої води, при постійному перемішуванні подають 48 мл концентрованої 36% хлоридної кислоти. Колбу закривають скляним корком і отриманий розчин в асептичних умовах до стерильного мірника об'ємом 1 л (Мр-19), підключеного до системи автоматизації ферментера об'ємом 200 л (ФР-22).

Отриманий розчин до ТП 6.1.

ДР 3.2.2 Приготування і стерлізація 6% розчину гідроксиду натрію

Для підтримання рН культуральної рідини під час виробничого біосинтезу в ферментері об'ємом 200 л необхідно приготувати 285 мл 6% NaOH.

Для цього на технічних вагах зважують 17,1 г кристалічного NaOH. Наважку поміщають в колбу об'ємом 500 мл, додають 285 мл дистильованої води і перемішують до повного розчинення, закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізують в автоклаві при 131°C (0,15 МПа) протягом 40 хв. Отриманий стерильний до стерильного мірника об'ємом 1 л (Мр-20), підключеного до системи автоматизації ферментера об'ємом 200 л (ФР-22).

Отриманий розчин до ТП 6.1.

ДР 4. Приготування та стерилізація поживного середовища

ДР 4.1. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці

Для вирощування інокуляту потрібно 1040 мл поживного середовища (ПС), вміст компонентів для приготування ПС заданого об'єму наведено у табл. 6.1.

Таблиця 6.1

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 1040 мл середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, V, мл
Кукурудзяний екстракт	7,5	7,8	А	940
Крохмаль	32	33,28		
Соевий шрот	4,375	4,55		
Фініковий сироп	25	26		
Глюкоза	5	5,2		
Вода	-	940 (мл)		
$\text{CuSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	2,5	2,6	Б	100
K_2HPO_4	0,5	0,52		
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,15	0,156		
NaNO_3	0,15	0,156		

Вода	-	100 (мл)		
------	---	----------	--	--

ДР.4.1.1 Розварювання соєвого шроту і крохмалю для приготування 1040 мл поживного середовища

На технічних терезах у попередньо відтарованій склянці зважують 33,3 г крохмалю і 4,6 г соєвого шроту. Наважки поміщають у колбу об'ємом 2 л, поступово при постійному перемішуванні додають 700 мл холодної питної води, після чого здійснюють розварювання крохмалю і соєвого шроту на водяній бані за 70 °С протягом 25 хвилин, ретельно перемішуючи розчин.

Приготовлений розчин до ДР 4.1.2.

ДР.4.1.2 Приготування і стерилізація композиції А

На технічних терезах у попередньо відтарованій склянці зважують 7,8 г кукурудзяного екстракту, 26 г фінікового сиропу і 5,2 г глюкози. Наважки поміщають у колбу об'ємом 500 мл, додають 240 мл питної води, перемішують і переливають (від ДР 4.1.1) у колбу на 2 л з розвареним крохмалем і соєвим шротом, туди ж доливають розчин піногасника з колби на 50 мл (від ДР 2.1). Отриману композицію А, ще раз перемішують протягом 10 хв, закривають ватно – марлевим корком і стерилізують в автоклаві при $t = 112\text{ }^{\circ}\text{C}$ (30 хв).

Простерилізована композиція до ТП 5.4.

ДР.4.1.3 Приготування запасного розчину солей

На технічних терезах зважують 26 г $\text{CuSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 1,6 г $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 5,2 г K_2HPO_4 і 1,6 г NaNO_3 . Наважки поміщають у колбу об'ємом 500 мл додають 300 мл питної води, перемішують до повного розчинення солей.

Готовий розчин до ДР 4.1.4.

ДР.4.1.4 Приготування і стерилізація композиції Б

З колби на 500 мл (від ДР 4.1.3) мірною піпеткою відбирають 30 мл розчину та поміщають у колбу об'ємом 250 мл, додають 70 мл питної води, перемішують, закривають ватно – марлевим корком і стерилізують в автоклаві при $t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}$ (40 хв) під тиском 0,15 МПа.

Простерилізована композиція до ТП 5.4.

ДР 4.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 20 л

Для одержання рідкого посівного матеріалу в посівному апараті об'єм якого становить 20 л, слід приготувати 10,5 л поживного середовища. Враховуючи кількість конденсату (10%), утвореного під час стерилізації поживного середовища, загальна кількість води, яку необхідно додати для приготування поживного середовища становить 9,6 л. Вміст компонентів для приготування ПС заданого об'єму наведено у табл. 6.2.

Таблиця 6.2

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 20 л

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 10,5 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, V, л
Кукурудзяний екстракт	7,5	78,75	А	9
Крохмаль	32	336		
Соевий шрот	4,375	45,94		
Фініковий сироп	25	262,5		

Глюкоза	5	52,5		
---------	---	------	--	--

Закінчення табл.
6.2

Таблиця 6.2

Вода	-	8,1 (л)		
Конденсат	-	0,9 (л)		
CuSO ₄ × 7H ₂ O	2,5	26,25	Б	1,5
K ₂ HPO ₄	0,5	5,25		
ZnSO ₄ × 7H ₂ O	0,15	1,575		
NaNO ₃	0,15	1,575		
Вода	-	1,5 (л)		
Конденсат	-	-		

ДР 4.2.1 Приготування і стерилізація композиції А для 10,5 л поживного середовища

ДР 4.2.1.1 Приготування розчину кукурудзяного екстракту, фінікового сиропу і глюкози

На технічних терезах зважують 78,8 г кукурудзяного екстракту, 262,5 г фінікового сиропу і 52,5 г глюкози. Наважки поміщають у колбу об'ємом 3 л, додають 1,6 л питної води, ретельно перемішують.

Приготовлений розчин до ДР 4.2.1.3

ДР 4.2.1.2 Розварювання соєвого шроту і крохмалю

На технічних терезах зважують 336 г крохмалю і 46 г соєвого шроту. Наважки поміщають у збірник об'ємом 15 л (Р-8), поступово додають 6,5 л питної води, після чого здійснюють розварювання крохмалю і соєвого шроту

за 70 °С протягом 25 хвилин при увімкненому (50-100 об/хв) перемішуючому пристрої.

ДР 4.2.1.3 Гомогенізація і стерилізація компонентів композиції А для 10,5 л поживного середовища

У збірник об'ємом 15 л (Р-8) який містить розварений крохмаль і соєвий шрот переливають вміст колби на 3 л (від ДР 4.2.1.1). Отриманий розчин композиції А, ще раз гомогенізують за допомогою перемішуючого пристрою протягом 15 хв при 50-100 об/хв, герметично закривають збірник і стерилізують у ньому при $t = 112\text{ °C}$ (30 хв) під тиском 0,05 МПа.

Простерилізована композиція до ТП 5.5.

ДР 4.2.2 Приготування і стерилізація композиції Б для 10,5 л поживного середовища

На технічних терезах зважують 1,6 г $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 1,6 г NaNO_3 , 5,3 г K_2HPO_4 і 26,3 г $\text{CuSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$. Наважки поміщають у колбу об'ємом 3 л, додають 1,5 л питної води, ретельно перемішують до повного розчинення солей. Отриманий розчин стерилізують в автоклаві при $t = 131\text{ °C}$ (40 хв) під тиском 0,15 МПа.

Простерилізована композиція до ТП 5.5.

ДР 4.3 Приготування та стерилізація поживного середовища для ферментера об'ємом 200 л

Для культивування *S. tobaraeensis* ATCC 15003 у ферментері необхідно приготувати 103,6 л поживного середовища.

Враховуючи кількість конденсату (10%), утвореного під час стерилізації поживного середовища, загальна кількість води, яку необхідно додати для приготування поживного середовища становить 93,24 л.

Таблиця 4.4

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу у ферментері об'ємом 200 л

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 103,6 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, V, л
Кукурудзяний екстракт	7,5	777	А	88
Крохмаль	32	3316		
Соевий шрот	4,375	454		
Фініковий сироп	25	2590		
Глюкоза	5	519		
Вода	-	79,2 (л)		
Конденсат	-	8,8 (л)		
$\text{CuSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	2,5	259		
K_2HPO_4	0,5	51,8		
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,15	15,54		
NaNO_3	0,15	15,54		
Вода	-	14,04 (л)		

Конденсат	-	1,56 (л)		
-----------	---	----------	--	--

ДР 4.3.1 Приготування і стерилізація композиції А для 103,6 л поживного середовища

ДР 4.3.1.1 Приготування розчину кукурудзяного екстракту, фінікового сиропу і глюкози

На технічних терезах зважують 777 г кукурудзяного екстракту, 2590 г фінікового сиропу і 518 г глюкози. Наважки поміщають у реактор-змішувач на 20 л (Р-9), додають 14,2 л питної води, вмикають перемішуючий пристрій на 50-100 об/хв протягом 15 хв.

Приготовлений розчин до ДР 4.3.1.3.

ДР 4.3.1.2 Розварювання соєвого шроту і крохмалю

На технічних терезах зважують 3316 г крохмалю і 454 г соєвого шроту. Наважки поміщають у збірник об'ємом 100 л (Р-11), за допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-10) додають 65 л питної води, після чого здійснюють розварювання крохмалю і соєвого шроту за 70 °С протягом 25 хвилин при увімкненому перемішувачу пристрою на 50-100 об/хв.

ДР 4.3.1.3 Гомогенізація і стерилізація компонентів композиції А для 103,6 л поживного середовища

У збірник об'ємом 100 л (Р-11) який містить розварений крохмаль і соєвий шрот (ДР 4.3.1.3) самопливом подають вміст збірника на 20 л (Р-9) (від ДР 4.3.1.1). Отриманий розчин композиції А ще раз гомогенізують за допомогою перемішувача пристрою протягом 15 хв при 50-100 об/хв, герметично закривають збірник і стерилізують у ньому при $t = 112\text{ }^{\circ}\text{C}$ (30 хв) під тиском 0,05 МПа.

Простерилізована композиція до ТП 6.1.

ДР 4.3.2 Приготування і стерилізація композиції Б для 103,6 л поживного середовища

На технічних терезах зважують 15,6 г $ZnSO_4 \times 7H_2O$, 15,6 г $NaNO_3$, 51,8 г K_2HPO_4 і 259,5 г $CuSO_4 \times 7H_2O$. Наважки поміщають у збірник об'ємом 30 л (Р-12), додають 14,1 л питної води, перемішують. Отриманий розчин самопливом подають у попередньо простерилізований ферментер (ФР-22), стерилізують у ньому при $t = 131 \text{ }^\circ\text{C}$ (40 хв) під тиском 0,15 МПа.

Простерилізована композиція до *ТП 6.1*.

ТП. 5 Підготовка посівного матеріалу

ТП 5.1. Підтримання колекційної культури

Суспензію спор *S. tobaraensis* ATCC 15003 підтримують в криогенних флаконах об'ємом 0,5 мл. Аліквоти суспензії спор ($2,0 \times 10^7$ спор / мл $\pm 5\%$) зберігають у гліцериновому бульйоні (40%, об. / об.) При $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ протягом 1 року, пересіви культури здійснюють 1 раз протягом 1 року. Всі роботи з колекційною культурою проводяться в строго асептичних умовах.

ТП 5.2. Одержання робочої культури

Колекційну культуру методом виснажувального штриха пересівають на чашку Петрі з МПА (м'ясо–пептонний агар) для одержання ізольованих колоній. Культивують в термостаті при $t = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ (48 год).

ТП 5.3. Вирощування інокуляту на агаризованих поживних середовищах

Отримані ізольовані колонії з чашки Петрі (від *ТП 4.2*) пересівають петлею в пробірки зі скошеним МПА (одна ізольована колонія використовується для засіву однієї пробірки). В пробірки пересівають ізольовані колонії, що знаходяться на відстані не менше 1 см. Культивують в термостаті при $t = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ (24 год).

ТП 5.4 Вирощування культури в колбах на качалках

Для вирощування рідкого посівного матеріалу у колбу об'ємом 2 л до 940 мл розчину композиції А (від ДР 4.1.2), в асептичних умовах вносять 100 мл розчину композиції Б (від ДР 3.1.4), перемішують і розливають по 148 мл у 7 качалочних колб об'ємом 750 мл.

У пробірку з робочою культурою *S. mobaraensis* ATCC 15003 (від ТП 5.3) згідно правил асептики вносять 8 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини (змивають культуру), піпеткою відбирають одержану бактеріальну суспензію і вносять у качалочні колби з поживним середовищем. Для засіву однієї колби використовують бактеріальну суспензію, одержану з однієї пробірки. Культивують на качалках $t = 30^{\circ}\text{C}$, $w = 190$ об/хв (48 год).

ТП 5.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 20 л

В інокулятор об'ємом 20 л (ПА-21) через стерильну засівну колбу об'ємом 3 л подають композицію Б (від ДР 4.2.2) самопливом із збірника (Р-8) об'ємом 15 л подають стерильну композицію А (від ДР 4.2.1.3). Через засівну колбу вносять посівний матеріал (перед цим у боксі в попередньо простерилізовану колбу об'ємом 2 л зливають посівний матеріал з 7 колб (від ТП 5.4), далі в сорочку інокулятора подають холодну воду.

Культивування здійснюють з частотою обертів перемішуючого пристрою 100 - 450 об/хв при температурі 30°C рН=6,5, впродовж 24 годин і постійній аерації через індивідуальний фільтр (ФІ-13), обсяг повітря при стандартних умовах на обсяг рідини в хвилину (VVM) = 1,5, концентрацію розчиненого кисню ($p\text{O}_2$) підтримують на рівні 40% від насичення повітрям. Для гасіння піни, що утворюється в процесі культивування подають піногасник через систему автоматизації (від ДР 2.2).

ТП 6. Виробничий біосинтез

ТП 6.1 Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 200 л

Виробниче культивування здійснюють у ферментері з об'ємом 200 л (ФР-22). У попередньо простерилізований ферментер що містить 15,6 л стерильного розчину композиції Б (від ДР 4.3.2), подають самопливом 88 л розчину стерильної композиції А (від ДР 4.3.1.3).

Далі через трубу перетискування подають посівний матеріал з інокулятора (ПА-21) на 20 л (від ТП. 5.5). Вмикають перемішувач, здійснюють аерацію стерильним повітрям через індивідуальний фільтр (ФІ-14), в сорочку ферментера подають холодну воду.

Для гасіння піни, що утворюється в процесі культивування подають піногасник через систему автоматизації (від ДР 2.3).

Культивування проводять до досягнення концентрації блеоміцину 112 мг/л, при температурі 30°C, рН=6,5, з частотою обертів перемішувача 100 - 500 об/хв впродовж 120 годин, постійна аерація (обсяг повітря при стандартних умовах на обсяг рідини в хвилину (VVM) = 1,5 , концентрацію розчиненого кисню підтримують на рівні 40% від насичення повітрям).

РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

Упродовж культивування, для забезпечення максимальної продуктивності біотехнологічного процесу виникає необхідність періодично (кожні 4 год) з інокулятора та ферментера відбирати проби культуральної рідини для контролю таких показників :

- відсутність сторонньої мікробіоти
- концентрація блеоміцину
- концентрація вуглецю та азоту.

Об'єм проби стерильного поживного середовища для визначення вище наведених показників під час інкубування в інокуляторах і виробничому ферментері становить 30 мл.

7.1. Мікробіологічний контроль

Оскільки культивування *S. mobaraensis* ATCC 15003 здійснюється в асептичних умовах виникає необхідність проведення мікробіологічного контролю на всіх передферментаційних етапах і стадії виробничого біосинтезу, щоб впевнитись у відсутності контамінації. Тому кожні 4 години з інокулятора і ферментера здійснюють відбір зразків культуральної рідини для аналізу.

Мікробіологічний контроль стерильності поживного середовища.

Мікробіологічний контроль здійснюється двома шляхами: прямий висів на агаризовані поживні середовища і мікроскопіювання.

Прямий висів здійснюється посівом культуральної рідини до ізолюваних колоній на чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром (МПА) для

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.26 КР ПЗ</i>				
		<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>		РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА				
<i>Розробник</i>	<i>Дзядук..</i>			<i>Літера</i>				<i>Аркуш</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Керівник</i>	<i>Красінько В.О.</i>							85	106
<i>Н. контр</i>				<i>Кафедра БТМ&A</i>					
<i>Консульт</i>									
<i>Зав. каф.</i>	<i>Стадніков</i>								

виявлення бактерій, сусло–агаром (СА) – грибів та дріжджів.

Підготовка чашок Петрі. У попередньо простерилізовані в сухожаровій шафі чашки Петрі розливають по 20-30 мл розплавлені на киплячій водяній бані агаризовані середовища: СА (сусло-агар) і МПА (м'ясо-пептонний агар). Чашки залишають на рівній поверхні для рівномірного застигання агару і витримують протягом 2-3 діб при температурі 30 °С кришками донизу.

Виконання посівів. Посіви здійснюють шляхом відбору 0,1 мл з об'єма проби стерильною піпеткою і нанесення її на поверхню СА – для виявлення грибів і дріжджів і МПА – для виявлення бактерій. Суспензію рівномірно розподіляють по поверхні середовища за допомогою стерильної бактеріологічної петлі або стерильного шпателя Дригальського. Чашки з посівами поміщають у термостат за температури 30...32 °С. Аналіз посівів здійснюють, починаючи з 6...8 год. На поверхні поживних середовищ візуально визначають відсутність ознак росту мікроорганізмів [62, 63].

Мікроскопіювання проводять у світловому мікроскопі з імерсійною системою. Для приготування препарату на чисте знежирене предметне скло, в асептичних умовах, за допомогою стерильної петлі наносять невелику краплину культуральної рідини. Краплю, яка містить мікроорганізми, розподіляють по склу за допомогою бактеріальної петлі (діаметр мазка близько 1 см). Мазок висушують без нагрівання, при кімнатній температурі, до повного випаровування вологи. Потім на абсолютно сухий препарат за допомогою скляної палички наносять 1–2 краплини імерсійного масла. Після роботи ватую, змоченою етиловим спиртом, знімають залишки масла з імерсійного об'єктива [63].

За відсутності у зразку сторонньої мікробіоти під час мікроскопіювання можна побачити клітини *S. mobaraensis* ATCC 15003 рис. 7.1

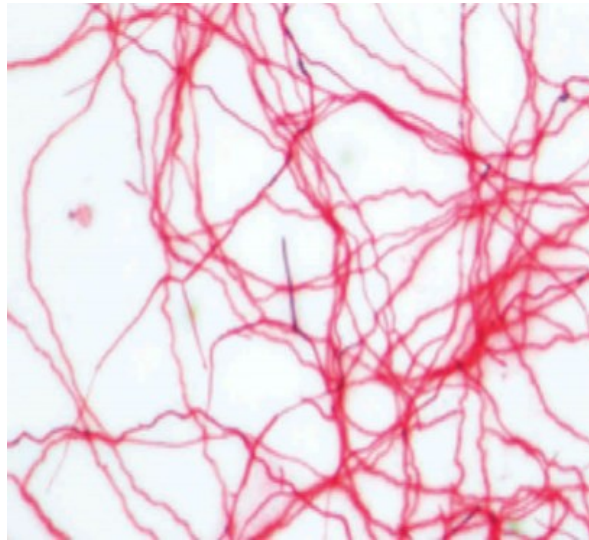


Рис. 7.1 Світлова мікроскопія x 1000 *S. mobaraensis* [64].

При рості *S. mobaraensis* на агарі з неорганічними солями і крохмалі (хімічний склад агару подібний поживному середовищу на якому здійснюється культивування) : колір від коричнево-жовтуватого до зеленувато-жовтого; повітряний міцелій від бежевого до зеленувато-бежевого (рис. 7.2) [34].

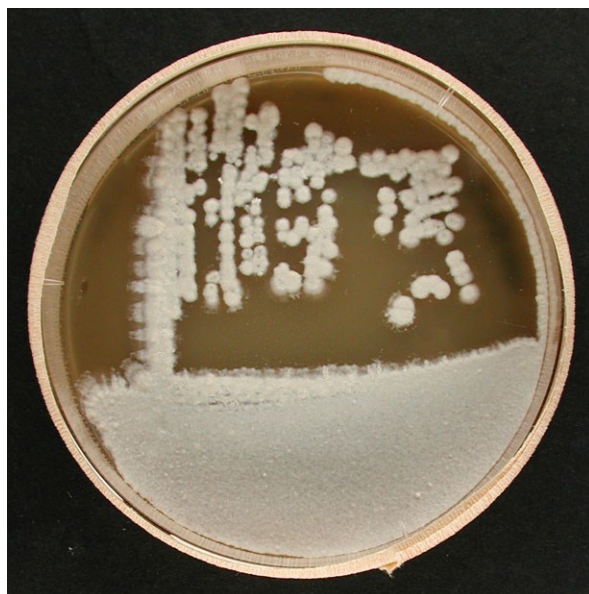


Рис. 7.2 колонії *S. mobaraensis* ATCC 15003 [65]

7.2. Показники росту

7.2.1 Визначення концентрації блеоміцину

Біологічний метод – дифузії в агар. Ця методика визначення концентрації блеоміцину базується на порівнянні ступенів пригнічення росту тест-культури у результаті дії антибіотика, який випробовується, і розчину антибіотика стандартного зразка з відомими концентраціями.

Одержану культуральну рідину центрифугують і фільтрують, після чого 0,1 мл виділеного зразку невідомої концентрації антибіотика переміщують у три лунки в чашці Петрі з тест-культурою *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607 (методика проготування інокуляту тест-організму зазначена в ДФУ), де також у лунках міститься відома концентрація блеоміцину. Чашки Петрі витримують при 4 °С на 24 години, щоб забезпечити дифузію антибіотика, а потім інкубують при 37 °С протягом 18 годин. Стандартна крива будується шляхом нанесення діаметрів чистих зон, утворених розчинами блеоміцину, в залежності від стандартної концентрації блеоміцину. Концентрації антибіотика невідомих зразків вимірюють за допомогою стандартної кривої [33,66].

Оскільки біологічний метод визначення концентрації антибіотика володіє рядом недоліків, а саме довготривалість проведення аналізу і залежність точності від багатьох зовнішніх факторів, тому у промисловому виробництві блеоміцину виникає необхідність використовувати набагато швидший метод - високоефективну рідинну хроматографію (ВЕРХ).

Методика визначення концентрації блеоміцину за допомогою ВЕРХ

Високоефективна рідинна хроматографія – хроматографія, принцип якої полягає в поділі компонентів суміші, заснованому на різниці в рівноважному розподілі їх між двома незмішуваними фазами, одна з яких нерухома, а інша рухома (елюент). Ця аналітична методика,

використовується для розділення, ідентифікації або кількісного визначення кожного компонента в суміші. Розділену суміш ідентифікують і визначають кількісно за допомогою спектроскопії. Відмінною особливістю ВЕРХ є використання високого тиску, що забезпечує значну швидкість проведення процесу і знижує коефіцієнт молекулярної дифузії.

Відбирають 5 мл культуральної рідини і центрифугують при 8000 об/хв протягом 8 хв. Потім фільтрують через мембрану з діаметром пор 0,22 мкм. (рис.7.3) Супернатант аналізують за допомогою хроматографа (рис.7.4) з використанням колонки Venusil MP-C18 (5 мкм, 250 мм×4,6 мм) (рис.7.5). Рухливу фазу отримують розчиненням 1,00 г K_2SO_4 і 1,86 г динатрієвої солі етилендіамінтетраоцтової кислоти в 1000 мл 0,08 М оцтової кислоти і доведенням рН до 4,3 гідроксидом амонію. Крім того, в якості органічної рухомої фази використовують метанол і ацетонітрил (7:3). Швидкість потоку колонки становить 0,8 мл/хв, температура колонки 40 °С, довжина хвили диференціальному рефрактометри встановлена на 294 нм [67].



Рис. 7.3 Фільтр Tisch з діаметром пор 0,22 мкм [68].



Рис. 7.4 Хроматограф UltiMate 3000 [69].



Рис. 7.5 Колонка Venusil MP-C18 (5 мкм, 250 мм×4,6 мм) [70].

7.2.2. Концентрація джерел Карбону і Нітрогену

Визначення концентрації джерела вуглецю у поживному середовищі

До складу поживного середовища входять такі джерела вуглецю:

- Крохмаль;
- Глюкоза;

- Фініковий сироп (основні вуглецеві компоненти – глюкоза і фруктоза).

Визначення концентрації крохмалю і глюкози здійснюють з використанням ВЕРХ. Високоєфективна рідинна хроматографія – хроматографія, принцип якої полягає в поділі компонентів суміші, заснованому на різниці в рівноважному розподілі їх між двома незмішуваними фазами, одна з яких нерухома, а інша рухома (елюент). Ця аналітична методика, використовується для розділення, ідентифікації або кількісного визначення кожного компонента в суміші. Розділену суміш ідентифікують і визначають кількісно за допомогою спектроскопії. Відмінною особливістю ВЕРХ є використання високого тиску, що забезпечує значну швидкість проведення процесу і знижує коефіцієнт молекулярної дифузії.

Перелік необхідних матеріалів, реактивів і обладнання: мембрана з діаметром пор 0,45 мкм (рис. 7.3), 2 н HCl, мірна піпетка на 1мл, мірна піпетра на 2 мл, пробірка, термостійкий циліндр на 100 мл, 2 н NaOH, 0,01 н H₂SO₄, хроматограф UltiMate 3000 (рис.7.4), хроматографічна колонка Aminex HPX87H (рис.7.7), диференціальний рефрактометр ACQUITY RI Detector (рис.7.8).

Умови проведення дослідю

Перед проведенням аналізу ВЕРХ культуральну рідину центрифугують при параметрах: 4000 об/хв, протягом 10 хв. Потім фільтрують на мембранному фільтрі з розміром пор 0,45 мкм. Елюювання колонки Aminex HPX87H здійснюють 0,01 н. H₂SO₄ при кімнатній температурі і швидкості потоку 0,6 мл/хв, довжина хвилі диференціальному рефрактометрі встановлена на 210 нм. Концентрацію глюкози розраховують за відношенням кривих стандартних концентрацій до площі піків.

Кількість крохмалю визначають розрахунком одиниць глюкози, присутніх в 2 мл середовища після обробки 1 мл 2 н НСІ, повний гідроліз здійснюють шляхом нагрівання суміші на киплячій водяній бані протягом 30 хв. Після нейтралізації гідролізату 1 мл 2 н NaOH кількість відновлених цукрів, що вивільняються з крохмалю, визначають за допомогою ВЕРХ [71].



Рис. 7.6 Мембрана з діаметром пор 0,45 мкм Whatman 7404-009 [72].

Обладнання для здійснення ВЕРХ



Рис.7.7 Хроматографічна колонка Aminex HPX87H [73].

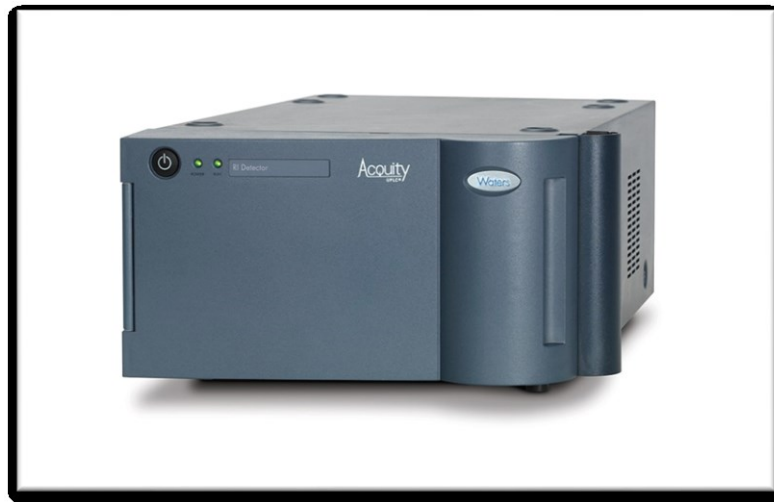


Рис. 7.8 Диференціальний рефрактометр ACQUITY RI Detector [74].

Визначення концентрації фруктози.

Спочатку здійснюють центрифугування культуральної рідини при параметрах: 4000 об/хв, протягом 10 хв.

Супернатант аналізують з використанням ВЕРХ. У хроматографі встановлена колонка Shodex Asahipak NH2P-50 4E (5 мкм, 250 мм×4,6 мм) (рис. 7.9). ВЕРХ здійснюють при 30 °С, швидкість потоку 1 мл/хв, в якості рухливої фази використовують 60% водний розчин ацетонітрилу. Фруктозу ідентифікують за довжиною хвилі, що встановлена на диференціальному рефрактометрі (рис.7.8) [75].



Рис. 7.9 Колонка Shodex Asahipak NH2P-50 4E [76].

Визначення концентрації джерела азоту у поживному середовищі

До складу поживного середовища входять такі джерела азоту:

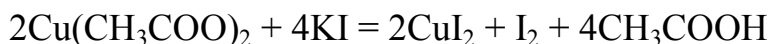
- кукурудзяний екстракт

- NaNO_3

Визначення амінного азоту у кукурудзяному екстракті мідним способом.

Метод заснований на здатності амінокислот і різних пептидів утворювати комплексні розчинні сполуки з міддю, яка визначається йодометричним методом.

Суть методу в наступному: до певної кількості випробуваного розчину додається при слаболужної реакції надлишок суспензії фосфорнокислої міді в боратному буферном розчині, в результаті чого після збовтування розчину утворюються мідні солі більшості амінокислот. Потім надлишок фосфату міді фільтрується, і в прозорому розчині після додавання CH_3COOH і KI визначається мідь об'ємним способом по йоду що виділяється, шляхом титрування слабким $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. При цьому реакція протікає так:



Кожен мл 0,01 н. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ відповідає 0,28 мг амінного азоту.

Методика проведення аналізу

Після центрифугування культуральної рідини (7000 об/хв, протягом 10 хв), її фільтрують і беруть 5 мл отриманого супернатанту, який поміщають в мірну колбу на 25 мл, додають 2 краплі тимолфталеїну і 10 мл суміші, що складається з зваженого осаду фосфату міді в боратному розчині. Зміст колби доводять до мітки дистильованою водою, добре струшують і центрифугують або фільтрують через щільний фільтр.

Фільтрат повинен бути зовсім прозорий, бо за наявності частинок осаду завищується кінцевий результат.

З фільтрату відбирають по 5-10 мл в порцелянову чашку або колбу, подкисляють 0,25-0,5 мл міцної CH_3COOH , додають 0,2-0,4 г KI і титрують

виділений йод 0,01 н. свіжоприготовленим розчином $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, доливаючи до кінця титрування 4-5 крапель крохмалю до зникнення синього забарвлення. Число мл 0,01 н. розчину $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ множать на 0,28, в результаті чого отримують 1 мг амінного азоту в узятій пробі супернатанту [77].

Визначення азоту в NaNO_3 за допомогою іонної хроматографії

Спочатку здійснюють центрифугування культуральної рідини при параметрах: 7000 об/хв, протягом 10 хв.

Супернатант пропускають через шприц-фільтр 0,2 мкм, концентрацію нітрату визначають з використанням іонного хроматографа (883 Basic IC plus, Metrohm, Швейцарія) і аніонної колонки (Metrosep A Supp 5). Елюент складається з 3,2 мМ Na_2CO_3 і 1 мМ NaHCO_3 , який подають зі швидкістю 0,7 мл/хв в колонку для аналізу [78].

7.3. Карта постадійного контролю виробництва

Таблиця 7.1

Карта постадійного контролю виробництва блеоміцину з використанням *Streptomyces mobaraensis* ATCC 15003

<i>Номер контрольної точки та назва стадії</i>	<i>Об'єкт контролю та показник, що визначається</i>	<i>Засоби та методи контролю</i>	<i>Періодичність перевірки та відбору проб</i>	<i>Нормативні значення показника</i>
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>
Кт 1.1 <i>Забір атмосферного повітря</i>	Повітрозбірник, висота забору повітря	Висота труби забору		H=10 м
Кт 1.2 <i>Попереднє грубе очищення повітря</i>	Очищене повітря, ступінь очищення повітря на виході з фільтра, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеню очищення згідно паспорту фільтра	Після проходження повітря через фільтр грубого очищення	E=95%, тиск згідно паспорту
Кт 1.3 <i>Компресування повітря</i>	Стиснене повітря, температура, тиск	Манометр технічний, термометр	Після компресування	P=0,1-0,35 МПа, t=120-180° C
Кт 1.4 <i>Охолодження повітря та видалення вологи</i>	Охоложене повітря, температура, частка вологи	Термометр технічний, психрометричний метод	Після охолодження повітря і видалення вологи	t=25-30° C, W=60-65%
Кт 1.5 <i>Нагрівання повітря</i>	Нагріте повітря, температура, частка вологи	Термометр технічний, психометричний метод	Після нагріву повітря	t=45-50° C, W ≤ 35%

Продовження табл. 7.1

Таблиця 7.1

Кт 1.6 <i>Головне тонке очищення повітря</i>	Очищене повітря, перепади тисків, ступінь очищення повітря на виході з фільтра	Манометр технічний, перевірка ступеню очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки у фільтрі головного очищення	E=99,995%, тиск згідно паспорту
Кт, Км 1.7 <i>Очищення повітря на індивідуальних фільтрах</i>	Очищене повітря, ступінь очищення повітря, мікробіологічна чистота	Перевірка ступеню очищення повітря згідно паспорту фільтра, мікробіологічний контроль	Після проходження повітря через індивідуальні фільтри	E > 99,999%
Кх 2.1 <i>Приготування піногасника для колб на качалках</i>	Концентрація піногасника	Хімічний метод	Концентрація перевіряється в кінці приготування розчину	C=2%
Кт, Кх, Км 2.2 <i>Приготування та стерилізація піногасника для інокулятора об'ємом 20 л</i>	Концентрація піногасника, тиск, час, стерильність	Хімічний метод, манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Концентрація перевіряється в кінці приготування розчину, тиск перевіряють під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації розчину	C=7%, t=112°C, P=0,05 МПа, τ=30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Кх, Км 2.3 <i>Приготування та стерилізація піногасника для ферментера об'ємом 200 л</i>	Концентрація піногасника, тиск, час, стерильність	Хімічний метод, манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Концентрація перевіряється в кінці приготування розчину, тиск перевіряють під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації розчину	C=5,7%, t=112°C, P=0,05 МПа, τ=30 хв, відсутність мікробіоти
Кх 3.1.1 <i>Приготування стерильного 6% розчину хлоридної кислоти</i>	Концентрація HCl	Хімічний метод	Концентрація перевіряється в кінці приготування розчину	C=6%

Продовження табл. 7.1

Таблица 7.1

Кт, Кх, Км 3.1.2 <i>Приготування і стерилізація 6% гідроксиду натрію</i>	Розчин NaOH, концентрація, тиск, час, стерильність	Хімічний метод, манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Концентрація перевіряється в кінці приготування розчину, тиск перевіряють під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації розчину	C=6%, t=131°C, P=0,15 МПа, τ=40 хв, відсутність мікробіоти
Кх 3.2.1 <i>Приготування стерильного 6% розчину хлоридної кислоти</i>	Концентрація HCl	Хімічний метод	Концентрація перевіряється в кінці приготування розчину	C=6%
Кт, Кх, Км 3.2.2 <i>Приготування і стерилізація 6% гідроксиду натрію</i>	Розчин NaOH, концентрація, тиск, час, стерильність	Хімічний метод, манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Концентрація перевіряється в кінці приготування розчину, тиск перевіряють під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації розчину	C=6%, t=131°C, P=0,15 МПа, τ=40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1.1 <i>Розварювання соєвого шроту і крохмалю для приготування 1040 мл поживного середовища</i>	Певні компоненти композиції А (соєвий шрот, крохмаль), час	Годинник	Час розварювання контролюють після внесення всіх компонентів у колбу з водою	τ= 25 хв
Кт, Км 4.1.2 <i>Приготування і стерилізація композиції А</i>	Композиція А Тиск, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск перевіряють під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 112 °С, P=0,05 МПа, τ= 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1.4 <i>Приготування і стерилізація композиції Б</i>	Композиція Б Тиск, температура, час, стерильність	Манометр, Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск перевіряють під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °С, P=0,15 МПа, τ= 40 хв, відсутність мікробіоти

Кт 4.2.1.1 <i>Приготування розчину кукурудзяного екстракту, фінікового сиропу і глюкози</i>	Певні компоненти композиції А (кукурудзяний екстракт, фініковий сироп, глюкоза), час	Годинник	Час розчинення контролюють після внесення всіх компонентів у колбу з водою	$\tau = 20$ хв
Кт 4.2.1.2 <i>Розварювання соєвого шроту і крохмалю</i>	Певні компоненти композиції А (соєвий шрот, крохмаль), температура, час, частота обертів мішалки	Термометр технічний, годинник, технічний тахометр	Температура, швидкість обертання мішалки, час розварювання контролюють після внесення всіх компонентів у збірник з водою	$t = 70$ °С, $\tau = 25$ хв, $\omega = 50-100$ об/хв
Кт, Км 4.2.1.3 <i>Гомогенізація і стерилізація компонентів композиції А для 10,5 л поживного середовища</i>	Композиція А Тиск, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск перевіряють під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 112$ °С, $P = 0,05$ МПа, $\tau = 30$ хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.2.2 <i>Приготування і стерилізація композиції Б для 10,5 л поживного середовища</i>	Композиція Б Тиск, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск перевіряють під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 131$ °С, $P = 0,15$ МПа, $\tau = 40$ хв, відсутність мікробіоти
Кт 4.3.1.1 <i>Приготування розчину кукурудзяного екстракту, фінікового сиропу і глюкози</i>	Певні компоненти композиції А (кукурудзяний екстракт, фініковий сироп, глюкоза), час	Годинник	Час розчинення контролюють після внесення всіх компонентів у колбу з водою	$\tau = 20$ хв
Кт 4.3.1.2 <i>Розварювання соєвого шроту і крохмалю</i>	Певні компоненти композиції А (соєвий шрот, крохмаль), температура, час, частота обертів мішалки	Термометр технічний, годинник, технічний тахометр	Температура, швидкість обертання мішалки, час розварювання контролюють після внесення всіх компонентів у збірник з водою	$t = 70$ °С, $\tau = 25$ хв, $\omega = 50-100$ об/хв

Продовження табл. 7.1

Таблиця 7.1

Кт, Км 4.3.1.3 <i>Гомогенізація і стерилізація компонентів композиції А для 103,6 л поживного середовища</i>	Композиція А Тиск, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск перевіряють під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 112°C, P=0,05 МПа, τ= 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.3.2 <i>Приготування і стерилізація композиції Б для 103,6 л поживного середовища</i>	Композиція Б Тиск, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск перевіряють під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131°C, P=0,15 МПа, τ= 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 5.4. <i>Вирощування культури в колбах на качалках</i>	Посівний матеріал, температура, тривалість вирощування, частота обертів качалки, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, технічний тахометр, мікробіологічний контроль	Швидкість обертання качалки встановлюється на початку культивування, температура контролюється протягом всього періоду	t = 30 °С, τ = 48 год, ω=190 об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 5.5 <i>Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 20 л</i>	Посівний матеріал, температура, тривалість культивування, рН, рО ₂ , витрати повітря, частота обертів мішалки, мікробіологічна чистота культури	Датчик температури, рО ₂ , рН, годинник, технічний тахометр, ротометр, пробовідбірник, мікробіологічний контроль	Температура, швидкість обертання мішалки, рівень рН, рО ₂ , витрати повітря автоматично контролюються протягом культивування, рівень джерела карбону і вуглецю, кожні 4 год, проводять мікробіологічний контроль	t = 30 °С, τ = 48 год, рО ₂ =40%, рН = 6,5 ω = 100-500 об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти

Продовження табл. 7.1

Таблиця 7.1

<p>КТ, Кх, Км 6.1 <i>Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 200 л</i></p>	<p>Культуральна рідина, температура, тривалість культивування, частота обертів мішалки, рівень рО₂ та рН, мікробіологічна чистота культури, концентрація біомаси, концентрація блеоміцину, Концентрації джерела карбону та нітрогену</p>	<p>Датчик температури, рО₂, рН, годинник, технічний тахометр, ротометр, хроматограф (метод ВЕРХ – визначення концентрації блеоміцину) мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура, швидкість обертання мішалки, рівень рН, рО₂, витрати повітря автоматично контролюються протягом культивування, визначають рівень джерела карбону і вуглецю, концентрацію блеоміцину визначають після закінчення процесу культивування, мікробіологічний контроль кожні 4 год</p>	<p>t = 30 °С, τ = 120 год, рО₂=40%, ω = 100-500 об/хв, рН = 6,5, С_{блеоміцину}=0,112 мг/л, відсутність сторонньої мікробіоти</p>
---	---	--	---	---

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Falzone L, Salomone S, Libra M. Evolution of Cancer Pharmacological Treatments at the Turn of the Third Millennium. *Front Pharmacol.* 2018 Nov 13;9:1300. doi: 10.3389/fphar.2018.01300. PMID: 30483135; PMCID: PMC6243123.
2. L. von Ranke, N., M. Fierro, I., & M.S. Antunes, A. (2016). Trends in Biotechnological Drugs for Cancer Treatment. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, 11(1), 112–120.
3. Umezawa, H., Maeda, K., Takeuchi, T., and Okami, Y. (1966) *J. Antibiot.* 19, 200–209.
4. Ishizuka, M.; H. Takayama, T. Takeuchi & H. Umezawa : Activity and toxicity of bleomycin. *J. Antibiotics, Ser. A* 20 : 15-24, 1967.
5. Ichikawa, T., Nakano, I., & Hirokawa, I. (1969). Bleomycin Treatment of the Tumors of Penis and Scrotum. *The Journal of Urology*, 102(6), 699–707. doi:10.1016/s0022-5347(17)62235-3.
6. Umezawa, H., Takeuchi, T., Hori, S., Sawa, T., Ishizuka, M., Ichikawa, T., & Komai, T. (1972). Studies on the mechanism of antitumor effect of bleomycin on squamous cell carcinoma. *The Journal of Antibiotics*, 25(7), 409–420. doi:10.7164/antibiotics.25.409.
7. Samuels, M. L., Holoye, P. Y., & Johnson, D. E. (1975). Bleomycin combination chemotherapy in the management of testicular neoplasia. *Cancer*, 36(2), 318–326. doi:10.1002/1097-0142(197508)36:2<318::aid-cncr2820360205>3.0.co;2-v.
8. Takita, T., Muraoka, Y., Nakatani, T., Fujii, A., Umezawa, Y., Naganawa, H., & Umezawa, H. (1978). Chemistry of bleomycin. XIX. Revised structures of bleomycin and phleomycin. *The Journal of Antibiotics*, 31(8), 801–804. doi:10.7164/antibiotics.31.801.
9. Takita, T., Umezawa, Y., Saito, S., Morishima, H., Naganawa, H., Umezawa, H., ... Ohno, M. (1982). Total synthesis of bleomycin A21). *Tetrahedron Letters*, 23(5), 521–524. doi:10.1016/s0040-4039(00)86878-1.

10. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021 May;71(3):209-249. doi: 10.3322/caac.21660.
11. Koshkaryev, A.; Piroyan, A.; Torchilin, V. P. Bleomycin in octaarginine-modified fusogenic liposomes results in improved tumor growth inhibition. *Cancer Lett.*, 2013, 334, 293-301.
12. Miklavcic, D.; Mali, B.; Kos, B.; Heller, R.; Sersa, G. Electrochemotherapy: From the drawing board into medical practice. *Biomed. Eng. Online*, 2014, 13, 29-49.
13. Lamanuskas, N.; Novell, A.; Escoffre, J.-M.; Venslauskas, M.; Šatkauskas, S.; Bouakaz, A. Bleomycin delivery into cancer cells in vitro with ultrasound and sonovue® or br14® microbubbles. *J. Drug Target.*, 2013, 21, 407-414.
14. Berg, K.; Nordstrand, S.; Selbo, P. K.; Diem, T. T. T.; AngellPetersen, E.; Hogset, A. Disulfonated tetraphenyl chlorin (tpcs2a), a novel photosensitizer developed for clinical utilization of photochemical internalization. *Photoch. Photobio. Sci.*, 2011, 10, 1637-1651.
15. Shatskaya, N. V.; Levina, A. S.; Repkova, M. N.; Baiborodin, S. I.; Shikina, N. V.; Ismagilov, Z. R.; Zarytova, V. F. Delivery of bleomycin a5 into cells using tio2 nanoparticles to enhance the degradation of intracellular DNA. *Nanotechnol. Russ.*, 2013, 8, 277-282.
16. Arndt, D.; Zeisig, R.; Bechtel, D.; Fichtner, I. Liposomal bleomycin: Increased therapeutic activity and decreased pulmonary toxicity in mice. *Drug Deliv.*, 2001, 8, 1-7.
17. Mir, L. M.; Belehradec, M.; Domenge, C.; Orłowski, S.; Poddevin, B.; Belehradec, J., Jr.; Schwaab, G.; Luboinski, B.; Paoletti, C. Electrochemotherapy, a new antitumor treatment: First clinical trial. *C. R. Acad. Sci. III*, 1991, 313, 613-618.

18. Georgelin, T.; Bombard, S.; Siaugue, J. M.; Cabuil, V. Nanoparticle-mediated delivery of bleomycin. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2010, 49, 8897-8901.
19. Kavaz, D.; Odabas, S.; Guven, E.; Demirbilek, M.; Denkbas, E. B. Bleomycin loaded magnetic chitosan nanoparticles as multifunctional nanocarriers. *J. Bioact. Compat. Polym.*, 2010, 25, 305-318.
20. Jain, S.; Coulter, J. A.; Hounsell, A. R.; Butterworth, K. T.; McMahon, S. J.; Hyland, W. B.; Muir, M. F.; Dickson, G. R.; Prise, K. M.; Currell, F. J.; O'Sullivan, J. M.; Hirst, D. G. Cellspecific radiosensitization by gold nanoparticles at megavoltage radiation energies. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 2011, 79, 531539.
21. Kong, J., Yi, L., Xiong, Y., Huang, Y., Yang, D., Yan, X., ... Zhu, X. (2018). The discovery and development of microbial bleomycin analogues. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(16), 6791–6798.
22. Sneader, Walter (2005). *Drug discovery : a history* (Rev. and updated ed.). Chichester: Wiley. ISBN 9780471899792 p. 312
23. The United States Pharmacopeial Convention 12601 Twinbrook Parkway, Rockville, MD 20852 p. 546-547
24. [Электронный ресурс] // Режим доступа <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5360373#section=Stability-Shelf-Life>
25. AHFS Drug Information 2008. Bethesda, Maryland 2008, p. 947
26. Galm U, Hager MH, Van Lanen SG, Ju J, Thorson JS, Shen B. Antitumor antibiotics: bleomycin, enediynes, and mitomycin. *Chem Rev.* 2005 Feb;105(2):739-58. PMID: 15700963.
27. Murray, V., Chen, J. K., & Tanaka, M. M. (2016). The genome-wide DNA sequence specificity of the anti-tumour drug bleomycin in human cells. *Molecular Biology Reports*, 43(7), 639–651. doi:10.1007/s11033-016-3998-7
28. Delou JMA, Souza ASO, Souza LCM, Borges HL. Highlights in Resistance Mechanism Pathways for Combination Therapy. *Cells.* 2019 Aug 30;8(9):1013. doi: 10.3390/cells8091013. PMID: 31480389.

29. Примерный перечень ВОЗ основных лекарственных средств 18-й перечень (апрель 2013 г.).
30. [Электронный ресурс] // Режим доступа <https://www.fresenius-kabi.com/en-ca/products/bleomycin-for-injection>
31. Chen, H., Wang, J., Cui, J., Wang, C., Liang, S., Liu, H., & Wen, J. (2019). Negative regulation of bleomycins biosynthesis by ArsR/SmtB family repressor BImR in *Streptomyces verticillus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. doi:10.1007/s00253-019-09923-8.
32. Chen, H., Cui, J., Wang, P. et al. Enhancement of bleomycin production in *Streptomyces verticillus* through global metabolic regulation of N-acetylglucosamine and assisted metabolic profiling analysis. *Microb Cell Fact* 19, 32 (2020). <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01301-8>.
33. Hesham H. Radwan , Fars K. Alanazi , Ehab I. Taha , Hamdy A. Dardir , Ihab M. Moussa and Ibrahim A. Alsarra. Development of a new medium containing date syrup for production of bleomycin by *Streptomyces mobaraensis* ATCC 15003 using response surface methodology. *African Journal of Biotechnology* Vol. 9(33), pp. 5450-5459, 16 August, 2010.
34. Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H.-J., Trujillo, M. E., Suzuki, K., Ludwig, W., & Whitman, W. B. (Eds.). (2012). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. p. 1689.
35. Mahajan A, Singh M, Bakhshi S, Jain S, Radhakrishnan V, Verma N, Seth R, Arora RS, Dinand V, Kalra M, Mandal P, Kapoor G, Sajid M, Thulkar S, Arora A, Taluja A, Chandra J. Treating early-stage Hodgkin lymphoma in resource-limited settings: InPOG-HL-15-01 experience. *Pediatr Blood Cancer*. 2021 Oct;68(10):e29219. doi: 10.1002/pbc.29219. Epub 2021 Jul 22. PMID: 34291860.
36. Бюлетень Національного канцер-реєстру № 21 - "Рак в Україні, 2019-2020"

37. Уніфікований клінічний протокол первинної, вторинної (спеціалізованої), третинної (високоспеціалізованої) медичної допомоги. Неходжкінські лімфоми та лімфома Ходжкіна.

38. Shankland KR, Armitage JO, Hancock BW. Non-Hodgkin lymphoma. *Lancet*. 2012 Sep 1;380(9844):848-57. doi: 10.1016/S0140-6736(12)60605-9. Epub 2012 Jul 25. PMID: 22835603.

39. Récher C, Coiffier B, Haioun C, Molina TJ, Fermé C, Casasnovas O, Thiéblemont C, Bosly A, Laurent G, Morschhauser F, Ghesquières H, Jardin F, Bologna S, Fruchart C, Corront B, Gabarre J, Bonnet C, Janvier M, Canioni D, Jais JP, Salles G, Tilly H; Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. Intensified chemotherapy with ACVBP plus rituximab versus standard CHOP plus rituximab for the treatment of diffuse large B-cell lymphoma (LNH03-2B): an open-label randomised phase 3 trial. *Lancet*. 2011 Nov 26;378(9806):1858-67. doi: 10.1016/S0140-6736(11)61040-4. PMID: 22118442.

40. NCCP Chemotherapy Regimen.

41. [Електронний ресурс] // Режим доступу https://bionet.com/wp-content/uploads/2021/04/f3_stainless-steel_-pilot_sip_bioreactor_fermenter_fermentor-1.pdf

42. Jornitz, Maik & Meltzer, & Quigley, & Ostreicher, & Arnold, & Conway, & Maloda, & Badenhop, & Akers, & Bardo, & Manfredi, & Madsen, & Stinavage, & Colton, & Bestwick, & Berzofsky, & Cole, & Gottschalk, & Dosmar, Michael & Mittelman,. (2008). *Filtration and Purification in the Biopharmaceutical Industry*. p. 659-662.

43. Карлаш Ю.В., Омельчук Є.О. Основи проектування біотехнологічних виробництв. [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобувачів освітнього ступеня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» освітньо-професійної програми «Біотехнологія» денної та заочної форм навчання /Ю.В. Карлаш, Є.О.Омельчук - К: НУХТ, 2019. с. 44-49.

44. Stanbury, Peter & Whitaker, A. & Hall, S.J.. (2016). Principles of Fermentation Technology: Third Edition. p. 240 – 249.
45. СТ-Н МОЗУ 42-4.9:2020 Лікарські засоби. Належна виробнича практика. Спеціальні правила належної виробничої практики лікарських засобів передової терапії.
46. Sandle, T. (2014) A Practical Approach to the Selection of Cleanroom Disinfectants, Pharma Focus Asia, Issue 21, pp. 27-30.
47. Selection of Disinfectants for Use in the Pharmaceutical Industry. Tim Sandle Head of Microbiology Bio Products Laboratory.
48. Cooper MS. Biocides, Disinfectants and Preservatives, The Microbiological Update, June 2000, 18(3): 1–4
49. Sandle, T.: ‘Selection and use of cleaning and disinfection agents in pharmaceutical manufacturing’ in Hodges, N and Hanlon, G. (2003): ‘Industrial Pharmaceutical Microbiology Standards and Controls’, Euromed Communications, England.
50. Steinhauer, Katrin. (2010). Antimicrobial efficacy and systematic use of disinfectants.
51. Microbial Contamination Control in the Pharmaceutical Industry edited by Luis Jimenez Genomic Profiling Systems, Inc. Bedford, Massachusetts, U.S.A p. 251-258.
52. Kastango, Eric & Douglass, Kate & Patel, K. & Givehchi, B. & Brister, P. & Postlewaite, Jay & Taraban, L.. (2015). SAFER STERILE COMPOUNDING: Choosing and Using Disinfectants for the Cleanroom. 19. 268-278.
53. Інструкція щодо застосування засобу "Секусепт Актив (Sekusept Aktiv)" з метою дезінфекції, передстерилізаційного очищення та хімічної стерилізації.
54. Інструкція щодо застосування дезінфікуючого засобу «Бланідас оксидез» (Blanidas Oxides)» з метою дезінфекції, достерилізаційного очищення та стерилізації.

55. [Електронний ресурс] // Режим доступу
<https://zakonbase.ru/content/part/196958?print=1>
56. [Електронний ресурс] // Режим доступу
<https://dezmed.com.ua/ru/instruktsiia/item/biomoj-metodicheskie-rekomendatsii-instruktsiya-po-primeneniyu/>
57. Routledge SJ. Beyond de-foaming: the effects of antifoams on bioprocess productivity. *Comput Struct Biotechnol J*. 2012 Dec 1;3:e201210014. doi: 10.5936/csbj.201210014. PMID: 24688674; PMCID: PMC3962157.
58. Hilberer, A. and Chao, S.-H. (2012). Antifoaming Agents. In *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, (Ed.).
59. Etoc A, Delvigne F, Lecomte JP, Thonart P. Foam control in fermentation bioprocess: from simple aeration tests to bioreactor. *Appl Biochem Biotechnol*. 2006 Spring;129-132:392-404. doi: 10.1385/abab:130:1:392. PMID: 16915656.
60. Allikian, Kathrine, Rebecca J. Edgar, Rashad Syed and Shuguang Zhang. "Fundamentals of Fermentation Media." *Essentials in Fermentation Technology* (2019): n. pag. p. 63-64.
61. Uma Maheswar Rao JL, Satyanarayana T. Enhanced secretion and low temperature stabilization of a hyperthermostable and Ca²⁺-independent alpha-amylase of *Geobacillus thermoleovorans* by surfactants. *Lett Appl Microbiol*. 2003;36(4):191-6. doi: 10.1046/j.1472-765x.2003.01283.x. PMID: 12641709.
62. Denyer, S.P., Baird, R.M., & Hodges, N.A. (Eds.). (2000). *Handbook of Microbiological Quality Control in Pharmaceuticals and Medical Devices* (1st ed.). p 23-88. CRC Press.
63. 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.

64. Xue, T., Zheng, X., Su, X., Chen, D., Liu, K., Yuan, X., ... Chen, Y. (2020). Directed evolution of the transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* and its enhanced expression in *Escherichia coli*. *Food Biotechnology*, 34(1), 42–61. doi:10.1080/08905436.2019.1711111.
65. [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://www.atcc.org/products/15003>
66. European Pharmacopoeia, 7th ed., EDQM, European Pharmacopoeia, Council of Europe, P. 202-207, F - 67029, Strasbourg, France, July 2004.
67. Chen, H., Cui, J., Wang, P. et al. Enhancement of bleomycin production in *Streptomyces verticillus* through global metabolic regulation of N-acetylglucosamine and assisted metabolic profiling analysis. *Microb Cell Fact* 19, 32 (2020). <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01301-8>.
68. [Электронный ресурс] Синтетік фільтерс // Режим доступа: <https://scientificfilters.com/nylon-membrane-filters-sf1453>.
69. [Электронный ресурс] Аврора // Режим доступа: <https://avroga-analyt.ru/catalog/zhidkostnaykhromatografiya/sistemy-vezhkh-uvezhkh-thermo-scientific-ultimate-3000/standartnaya-vezhkh-ultimate-3000-sd-s-chetvernym-gradientom/>.
70. [Электронный ресурс] // Режим доступа: <http://www.chromatographyworld.com/product-detail/2350>
71. Ledesma-Amaro, R., Dulermo, T., & Nicaud, J. M. (2015). Engineering *Yarrowia lipolytica* to produce biodiesel from raw starch. *Biotechnology for Biofuels*, 8(1). doi:10.1186/s13068-015-0335-7.
72. [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://scientificfilters.com/membranes-nylon-membranes-7404-009>
73. [Электронный ресурс] Алгімед // Режим доступа: <https://algimed.com/katalog/consumables/khromatografiya/kolonki-khromatograficheskie/kolonka-khromatograficheskaya-aminex-hpx-87h-column-300-x-7-8-mm-bio-rad-laboratories-1250140.html>

74. [Электронный ресурс] Ватерс.com // Режим доступа:https://www.waters.com/waters/en_US/ACQUITY-UPLC-Refractive-Index-Detector/nav.htm?cid=134726507&locale=en_US

75. Nazir, Y., Shuib, S., Kalil, M.S. *et al.* Optimization of Culture Conditions for Enhanced Growth, Lipid and Docosahexaenoic Acid (DHA) Production of *Aurantiochytrium* SW1 by Response Surface Methodology. *Sci Rep* 8, 8909 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27309-0>

76. [Электронный ресурс] Шоп декс ШПЛС // Режим доступа:<https://www.shodexhplc.com/product/asahipak-nh2p-50-4e/>

77. Большой практикум «Биохимия». Лабораторные работы: учеб. пособие / сост. М.Г. Кусакина, В.И. Суворов, Л.А. Чудинова; Перм. гос. нац. исслед. унт.- Пермь, 2012. с. 17-18.

78. Sung, M.-G., Lee, B., Kim, C. W., Nam, K., & Chang, Y. K. (2017). Enhancement of lipid productivity by adopting multi-stage continuous cultivation strategy in *Nannochloropsis gaditana*. *Bioresource Technology*, 229, 20–25. doi:10.1016/j.biortech.2016.12.100.