

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю
Кафедра біотехнології і мікробіології
Освітній ступінь бакалавр
Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код і назва)
Освітньо-професійна програма «Біотехнології: фармацевтична, промислова,
харчова, природоохоронна»
(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ
Завідувач кафедри біотехнології і
мікробіології
Віктор СТАБНИКОВ
“ 01 ” березня 2024 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

НАУМЕНКА Дмитра Володимировича

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Культивування *Nisseria gonorrhoeae* для одержання
вакцини гонококової

керівник роботи Ст. викл. КЛЮЧКА Лілія Вікторівна

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від 29 березня 2024 року № 238-к

2. Строк подання здобувачем роботи 28 травня 2024 р.

3. Вихідні дані до роботи *Nisseria gonorrhoeae*, гонококова вакцина, 10 л
фермертер, коефіцієнт заповнення 0,60

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно
розробити) РОЗДІЛ 1. Характеристика готової вакцини, РОЗДІЛ 2.
Обґрунтування вибору штаму та характеристика *Neisseria gonorrhoeae*,
РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування, РОЗДІЛ 4. Біосинтез
цільового продукту РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної
схеми, РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання, РОЗДІЛ 7. Опис технологічної
схеми РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва, РОЗДІЛ 9. Охорона довкілля

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема виробництва вакцини гонококової - 2 аркуші А1.

Апаратурна схема виробництва - 2 аркуші А1

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 01.03.2024

р. _____

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
	Характеристика готової вакцини	01.03.24 - 01.04.24	
	Обґрунтування вибору штаму та характеристика <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	06.04.24- 11.04.24	
	Техніко-економічне обґрунтування	12.04.24- 17.04.24	
	Біосинтез цільового продукту	18.04.24- 23.04.24	
	Обґрунтування вибору технологічної схеми	24.04.24- 29.04.24	
	Специфікація обладнання	30.04.24- 05.05.24	
	Опис технологічної схеми	6.05.24- 11.05.24	
	Контроль виробництва	12.05.24- 17.05.24	
	Охорона довкілля	17.05.24- 21.05.24	
	Оформлення пояснювальної записки	21.05.24- 25.05.24	
	Виконання графічної частини	01.04.24- 28.05.24	

Здобувач _____
(підпис)

Дмитро НАУМЕНКО
(ім'я та прізвище)

Керівник роботи _____
(підпис)

Лілія КЛЮЧКА
(ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена виробництву вакцини гонококової шляхом культивування рекомбінантного штаму *Neisseria gonorrhoeae* CDC-F62. Вакцинація, як відомо, є ефективним методом профілактики інфекційних хвороб, що підтверджено досвідом. Технологічний процес включає підготовку різноманітних речовин та основні етапи виробництва, які описані в технологічних та апаратурних схемах.

Робота складається з 79 сторінок друкованого тексту і включає 6 таблиць, а також 1 малюнок. Вона розділена на вступ, десять основних розділів, список використаних джерел літератури (22 джерела) і графічну частину з двома кресленнями формату А1.

Ключові слова: *вакцина. гонокок, Neisseria gonorrhoeae* CDC-F62, *поживне середовище.*

ABSTRACT

This thesis is dedicated to the production of a gonococcal vaccine through cultivation of the recombinant strain *Neisseria gonorrhoeae* CDC-F62. Vaccination is a well-established method for preventing infectious diseases, supported by empirical evidence. The technological process involves preparation of various substances and key production stages, which are detailed in technological and equipment schematics.

The work comprises 79 pages of printed text and includes 6 tables, as well as 1 figure. It is divided into an introduction, ten main sections, a list of 22 references, and a graphical section with two A1-sized drawings.

Keywords: vaccine, gonococcus, *Neisseria gonorrhoeae* CDC-F62, growth medium.

Зміст

РОЗДІЛ 1	9
ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ БІОСИНТЕЗУ	
РОЗДІЛ 2	13
ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування	15
2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента	23
2.3 Таксономічний статус біологічного агента.	25
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ	26
3.1 Потреба у цільовому продукті. Ошибка! Закладка не определена.	
3.1.2. Потреба в цільовому продукті вакцини гонококової	27
3.2. Розрахунок потужностей виробництва	29
3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів	29
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу	31
РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	33
4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента.....	33
4.2 Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт.....	34
РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	36
5.1 Обґрунтування способу культивування і типу ферментера	36
5.1.1. Обґрунтування типу ферментера.....	37
5.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря	37
5.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів	39
5.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища	41
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНЯННЯ	43
РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.	47
РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	61
8.1 Карта постадійного контролю доферментаційних процесів	61
8.2. Мікробіологічний контроль	63
8.3. Показники росту і синтезу цільового продукту	64
8.4. Показники якості готового продукту	65
РОЗДІЛ 9 ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ	67
9.1 Аналіз технологічної схеми виробництва цільового продукту на місця емісії твердих, рідких та газоподібних відходів	67
9.2.2. Система знешкодження та утилізації рідких відходів	69
Використанні джерела:.....	74

ВСТУП

Історія вакцинації, як ефективного засобу запобігання інфекційним захворюванням, налічує понад два сторіччя успішної практики. Протягом цього часу значно змінилися не лише медичні підходи, але й технології виробництва вакцин. Сучасна імунопрофілактика відзначається розширеним спектром захворювань, на які можна захистити людину, а також високими стандартами якості та безпеки вакцин.[1]

Принципи вакцинації, які є основою цього методу профілактики, залишаються незмінними і в сучасних умовах. Основною ідеєю вакцинації є стимуляція імунної системи організму для розпізнавання та боротьби з інфекційним агентом без активної форми хвороби. Цей підхід відображається в усіх вакцинах, включаючи ті, які розроблені для боротьби зі складними бактеріями, такими як *Neisseria gonorrhoeae*. [1,2]

Neisseria gonorrhoeae є бактерією, яка прогресивно набула статусу "супербактерії" через її здатність швидко розвивати антибіотикорезистентність. Це означає, що стандартні методи лікування за допомогою антибіотиків стають менш ефективними, оскільки бактерія змінює свій генетичний склад для уникнення знищення антибіотиками. Такий стан речей ускладнює не лише лікування інфекцій, але й робить невідкладною необхідність розробки ефективної вакцини проти *Neisseria gonorrhoeae*.

Neisseria gonorrhoeae завдає значних труднощів глобальному здоров'ю, з щорічним тягарем інфекцій, що перевищує 67 мільйонів випадків. Особливо вразливі країни з низьким і середнім рівнем доходу,

Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	НУХТ БТЕК 04.03.39 КР ПЗ			
Розробив		Науменко			ВСТУП	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевірів.		Ключка Л.В.					3	79
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н.Контр								
Затверд		Стабніков В.П.						

де існуючі стратегії контролю виявилися неефективними перед поширенням резистентних штамів.

Поверхневі молекули *Neisseria gonorrhoeae*, що є варіабельними в антигенному відношенні, ускладнюють розробку вакцини. Проте розробка такого препарату є надзвичайно важливою, оскільки необроблені або недиагностовані інфекції можуть призвести до серйозних наслідків для репродуктивного здоров'я жінок і новонароджених.[3]

Таким чином, впровадження вакцинації проти гонореї виглядає як критично важлива стратегія зниження глобального тягаря захворювання і витрат на його лікування. Однак перед цим стоїть ряд викликів, включаючи необхідність додаткових досліджень і розробки, оцінку соціально-економічного впливу та збільшення усвідомлення громадськості про необхідність цього заходу.

Актуальність: З ростом стійкості до антибіотиків стає все більш важливим завданням розробка вакцини проти *N. gonorrhoeae*. Створення ефективної вакцини проти гонореї має велике значення для сучасного суспільства, оскільки можливість її широкого використання в медицині може врятувати здоров'я мільйонів людей. Це відкриває потенціал для активізації досліджень у сфері вакцинології проти гонореї та спрямовує подальші дослідження антигенів і механізмів, необхідних для захисту від цієї інфекції.[3,4]

РОЗДІЛ 1

ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ БІОСИНТЕЗУ

Вакцина гонококова інактивована – це комплексний медичний засіб, створений на основі суспензії інактивованих культур гонококів, які знаходяться у 0,9% розчині натрію хлориду. Гонококи - це бактерії, які є основним патогеном, викликаючим гонорею - інфекційну захворюваність, передається статевим шляхом.

Ця вакцина має унікальну властивість підвищувати специфічну реактивність організму, що робить її ефективним інструментом не лише для діагностики гонореї, але й як додатковий метод її лікування, особливо у випадках, коли інші методи терапії не є достатньо ефективними.

На жаль, на сьогоднішній день вакцина гонококова, яка має велике значення для медичної практики, не виробляється в Україні та недоступна на ринку. Раніше цей препарат виготовляло підприємство ПАТ "Фармстандарт – Біолік" у Харкові. Однак, зараз виробництво його було припинено, і вакцина вийшла з обігу. Це створює серйозні труднощі для медичних закладів, які використовували цей препарат для діагностики та лікування гонореї.

Ситуація в Україні відображає загальний глобальний тренд у виробництві медичних препаратів. Нестача вакцини гонококової ставить під загрозу можливість ефективного контролю та лікування гонореї, що може призвести до подальшого поширення цієї інфекції. Тому, важливо звернути увагу на цю проблему і здійснити заходи для відновлення виробництва вакцини або забезпечення доступу до неї за допомогою імпорту.

					НУХТ БТЕК 04.03.39 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив	Науменко				РОЗДІЛ 1	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.	Ключка Л.В.						6	72
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд	Стабніков В.П.							

Вакцина гонококова інактивована, також відома як гоновакцина, продається у вигляді суспензії, яка призначена для внутрішньо-м'язового введення. Цей медичний засіб доступний у формі ампул об'ємом 1 мл. Колір суспензії може бути описаним як жовтувато-сірий, а також може містити осад, який легко розчиняється при струшуванні. Важливою особливістю є відсутність будь-яких сторонніх видимих включень у вакцині.

Склад препарату детально розкривається наступним чином:

1 мілілітр вакцини містить такі компоненти:

Активна речовина: суспензія інактивованої культури гонококів, що становить 10 міжнародних одиниць стандартного зразка каламутності (10МЕ).

Допоміжні речовини: фенол, що виступає як консервант у кількості 2,5 мг, натрію хлорид у кількості 9 мг та вода для ін'єкцій у необхідній кількості для досягнення обсягу 1 мл. [4]

Цей препарат відноситься до клініко-фармакологічної групи вакцин, призначених для лікування та діагностики гонореї, а також до фармако-терапевтичної групи мікробно-препаратів для ін'єкцій обсягом 1 мл.

Щодо фармакологічної дії, ця вакцина стимулює вироблення антитіл у організмі, які мають нейтралізуючу та захисну дію, підвищуючи специфічну реактивність.

Режим дозування передбачає введення вакцини внутрішньо-м'язово. Препарат повинен бути на температурі тіла перед введенням. Перед відбиранням в шприц ампулу з вакциною необхідно струсити для отримання однорідної суспензії. Відкриту ампулу не можна зберігати.

У разі гонорейної інфекції дорослим рекомендується введення ін'єкцій з інтервалом 1-2 днів в залежності від реакції організму. Початкова доза вакцини становить 0,3-0,4 мл, а при ускладненій гонореї - 0,2-0,3 мл. При температурі не більше 36,9 °C дозу вакцини збільшують на 0,3 мл з інтервалом введення 1 добу. У разі підвищення температури на менш ніж 1,5 °C від нормальної дозу збільшують на 0,15 мл з інтервалом 2 доби. Максимальна одноразова доза

вакцини - 2,0 мл, а введення вакцини проводять один раз на день. Тривалість курсу лікування становить до 6-8 ін'єкцій.[4,5]

Показання до застосування

Гонококова вакцина рекомендована для пацієнтів, які стикаються з наступними умовами:

Безуспішна антибіотикотерапія та рецидиви: Вакцинація розглядається для осіб, які перенесли гонорею та мають мляво протікаючі рецидиви після невдалих курсів антибіотиків. [6]

Гострі та хронічні форми захворювання: Використання вакцини обґрунтоване у хворих з гострими або хронічними формами гонореї.

Ускладнена гонорея у чоловіків та висхідна гонорея у жінок: Вакцинація рекомендована для чоловіків з ускладненою гонореєю та жінок, після зменшення запальних процесів.

Гінекологічні захворювання: Вакцина може використовуватися у гінекологічній практиці для лікування запальних процесів[5,6].

Застосування у дорослих

У дорослих вакцинація може бути використана для:

Лікування гонореї після неефективної антибіотикотерапії та при хронічних формах - вакцина використовується у складі комплексної терапії.

Застосування у дітей з 3-річного віку

У дітей від трьох років вакцинація може бути застосована для:

Лікування гонореї у складі комплексної терапії.

Діагностика гонореї: Вакцинація може використовуватися для обстеження хворих з хронічними захворюваннями сечостатевої системи.[4]

Показання до застосування

Гонококова вакцина рекомендована для пацієнтів, які стикаються з наступними умовами:

Безуспішна антибіотикотерапія та рецидиви: Вакцинація розглядається для осіб, які перенесли гонорею та мають мляво протікаючі рецидиви після невдалих курсів антибіотиків.

Гострі та хронічні форми захворювання: Використання вакцини обґрунтоване у хворих з гострими або хронічними формами гонореї.

Ускладнена гонорея у чоловіків та висхідна гонорея у жінок: Вакцинація рекомендована для чоловіків з ускладненою гонореєю та жінок, після зменшення запальних процесів.

Гінекологічні захворювання: Вакцина може використовуватися у гінекологічній практиці для лікування запальних процесів [4] .

РОЗДІЛ 2

ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

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

Гонококи, що належать до виду *Neisseria gonorrhoeae*, виявляють особливу чутливість до свого оточуючого середовища для зростання. На сьогоднішній день існує обмежена кількість рідинних середовищ, які можуть ефективно підтримувати ці бактерії при низькій концентрації посівного матеріалу. Стандартні поживні середовища сприяють розмноженню деяких штамів *N. gonorrhoeae* за умови високої концентрації посіву, але їх склад не завжди чітко визначений і може включати різні компоненти, такі як інфузати і екстракти.

У таблиці 2.1 продемонстровано типові приклади поживних середовищ, які можуть бути використані для культивування *N. gonorrhoeae*.

					НУХТ БТЕК 04.03.39 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив		Науменко Д.В.			РОЗДІЛ 2	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір..		Ключка Л.В.					10	72
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд		Стабніков В.П.						

Порівняльна характеристика поживних середовищ використуваних для культивування *Neisseria gonorrhoeae*

Продуцент	Склад поживного середовища г/л	Умови культивування	Конц. біомаси г/л	Особливості процесу біосинтезу	Література
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> JCM33543	Середовище CW L-орнітин 0.02 Нікотинамід-аденинунуклеотид 0.02 Гідрокарбонат амонію 4.0 Тригідрат ацетату натрію 2.0 L-глутамін 1.5 Спермідин 0.4 L-аргінін 0.2 Гіпоксантин 0.1 Урацил 0.1 Оксалоацетат 0.1 Тіамін гідрохлорид 0.1 DL-лактат натрію 2,5 мл 60% розчин Глюкоза 20.0	37°C, тривалість 24 години, рН 6,8	6	Культивується за температури 37°C. Постійне перемішування й аерація	Jeremy James Wade, Michelle Angela Graver. A fully defined, clear and protein-free liquid medium permitting dense growth of <i>Neisseria gonorrhoeae</i> from very low inocula. FEMS Microbiology Letters, 7 June 2007 273(1),35–37. doi:10.1111/j.1574-6968.2007.00776.
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> ATCC 19424	Середовище Fastidious Broth Дріжджовий автолізат 5.0 Неопептон 2.0 Агароза 0.75 Гематин 0.03 НАД 0.0015 Глюкоза 5.0	Температура 37°C Тривалість культивування 24 год рН 7,0	2	Культивується за температури 37°C. Постійне перемішування й аерація	Huss, H., & Eggert, J. (2000). Evaluation of different selective media for the isolation of <i>Escherichia coli</i> from food samples. International Journal of Food Microbiology, 60(1-2), 23-27.
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> CDC-F62	Середовище GCB Хлорид літію 5.0 Дріжджовий автолізат 5.0 Хлористий натрій 5.0 Гліцин 1.3 Піруват натрію 3.0 Манітол 20 Триптон 10 Порошок LabLemco 10	Температура 37 °C Тривалість культивування 24 годин рН 6,9	7	Культивується за температури 37°C. Постійне перемішування й аерація	Prescott, L. M., Harley, R. P., & Klein, D. A. (2010). Microbiology (8th ed.). New York: McGraw-Hill.

Вартість компонентів поживного середовища

Біологічний агент	Компонент середовища г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> JCM33543 Середовище CW	L-орнітин 0.02	27040	0,5
	Нікотинамід-аденінуноклеотид 0.02	2310045	46,2
	Амонію гідрокарбонат 4.0	12	0,06
	Ацетату натрію тригідрат 2.0	66	0,01
	L-глутамін 1.5	680	0,1
	Спермідин 0.4	6450	25.8
	L-аргінін 0.2	655	0,13
	Гіпоксантин 0.1	91310	9.1
	Урацил 0.1	23500	2,3
	Оксалоацетат 0.1	344230	34,4
	Гідрохлорид тіамід 0.1	23630	2.3
	DL-лактат натрію 2,5	9570	23,8
	Глюкоза 20.0	60	1.2
Вартість 1 л середовища – 145,47грн			
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> ATCC 19424 Середовище Fastidious Broth	Автолізат дріжджовий 5.0	1760	8,8
	Неопептон 2.0	6640	13,2
	Агароза 0.75	7450	55.8
	Гематин 0.03	13450	4
	НАД 0.0015	58674	0.88
	Глюкоза 5.0	70	0.35
Вартість 1 л середовища – 83,13 грн			
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> CDC-F62 Середовище GCB	Хлорид літію 5.0	970	4.8
	Натрій хлористий 5.0	32	0.6
	Гліцин 1.3	210	0,3
	Натрію піруват 3.0	2034	0.61
	Манітол 20	4650	93
	Триптон 10	3745	37.4
	Автолізат дріжджовий 5.0	1540	7.7
Вартість 1 л середовища – 144.41грн			

Під час культивування штамів бактерій *Neisseria gonorrhoeae* як показник процесу наводиться концентрація живих клітин. У цьому разі концентрація біомаси зазвичай становить 7–8 г/л. Отже, необхідно приблизно визначити концентрацію біомаси за складом поживного середовища (за концентрацією азоту, зокрема).[10]

Основним джерелом азоту в середовищі CW виступає гідрокарбонат амонію, що міститься в середовищі в кількості 4 г/л. Розрахуємо теоретично можливий вихід біомаси за азотом.

Вміст азоту в біомасі бактерій становить від 12 до 16 % від маси сухої речовини. Для визначення рівня біомаси, якого можна досягнути при культивуванні бактерій на середовищі з 4 г/л гідрокарбонату амонію, потрібно спочатку розрахувати вміст елементарного азоту в даній солі. Визначаємо кількість елементарного азоту в 4 г/л гідрокарбонату амонію. Для цього розрахуємо молярну масу гідрокарбонату амонію: молярна маса гідрокарбонату амонію 80,05 г/моль. Визначимо кількість азоту (в грамах), що знаходиться в гідрокарбонаті амонію: із 80,05 г сполуки на азот припадає 14,1 г (так як за формулою в заданій речовині міститься 1 атом нітрогену, а атомна маса одного нітрогену = 14,1 г).

За отриманими даними ми можемо скласти пропорцію і визначити кількість нітрогену в 4 г гідрокарбонаті амонію:

$$80 \text{ г NH}_4\text{HCO}_3 - 14 \text{ г N}$$

$$5 \text{ г NH}_4\text{HCO}_3 - X \text{ г N}$$

$$X = \frac{14 \cdot 5}{80} = 0,88 = 0,8$$

Так як у біомасі міститься 16% азоту, то з 0,8 г N за пропорцією можна визначити теоретично можливий рівень біомаси:

$$0,8 \text{ г/л} - 16 \%$$

$$Y \text{ г/л} - 100 \%$$

$$(0,8 \times 100) / 16 = 5$$

Звідси 5 г/л біомаси. Теоретично можливий рівень біомаси за азотом через гідрокарбонатамонію амонію становить 5 г/л.

Розрахунок вмісту в середовищі джерела вуглецевого живлення

Для початку потрібно встановити кількість елементарного вуглецю в 20 г/л глюкози. Для цього розрахуємо молярну масу глюкози: молярна маса глюкози ($C_6H_{12}O_6$) = 180 г/моль. Далі необхідно визначити кількість карбону що припадає на 180 г глюкози: із 180 г глюкози на карбон припадає 72 г (так як згідно формулі в глюкозі міститься 6 атомів карбону, а атомна маса одного карбону = 12 г, тому $6 \times 12 = 72$ г).

Отже, за отриманими даними ми можемо скласти пропорцію і дізнатися кількість карбону в 20 грамах глюкози:

$$180 \text{ г } C_6H_{12}O_6 - 72 \text{ г } C$$

$$20 \text{ г } C_6H_{12}O_6 - X \text{ г } C,$$

Звідки,

$$(72 \times 20) / 180 = 8$$

г (вміст карбону в 20 г глюкози), також це число можна вважати як теоретично можливий рівень біомаси, це пояснюється тим що, клітини у процесі свого росту використовують половину вуглецю на синтез АТФ (утворення енергії), а інша половина (тобто 3 г) припадає на утворення біомаси, але так як у біомасі 50% становить вуглець, то за пропорцією:

$$3 \text{ г/л} - 50 \%$$

$$У \text{ г/л} - 100 \%$$

Звідси

$$(3 \times 100) / 50 = 6$$

г/л біомаси. Отже, теоретично можливий рівень біомаси за вуглецем в глюкозі = 6 г/л.

Отже, лімітуючим фактором в середовищі CW виступає вміст нітрогену в середовищі, з цього можна зробити висновок що концентрація біомаси бактерій *Neisseria gonorrhoeae* JCM33543 культивованих в середовищі CW становитиме 6г/л.

Одним із джерел азоту в середовищі Fastidious Broth виступає дріжджовий автолізат в кількості 5 г/л. Відомо, що загальний вміст нітрогену в дріжджовому автолізаті становить близько 8%, тому розрахуємо вміст нітрогену в 5 г дріжджового автолізату: складаємо пропорцію, оскільки вміст нітрогену в дріжджовому автолізаті 8%

Розрахунок вмісту нітрогену в 5 г дріжджового автолізату

1. Визначення даних:

- **Кількість дріжджового автолізату: 5 г**
- **Вміст нітрогену в дріжджовому автолізаті: 8%**

2. Розрахунок пропорції:

Щоб розрахувати вміст нітрогену в 5 г дріжджового автолізату, нам потрібно скласти пропорцію, де:

- **X** - невідома кількість нітрогену в 5 г дріжджового автолізату
- **8%** - відомий вміст нітрогену в 100 г дріжджового автолізату
- **5 г** - відома кількість дріжджового автолізату
- **100 г** - відома кількість дріжджового автолізату

3. Формування пропорції:

$$X / 5 \text{ г} = 8\% / 100 \text{ г}$$

4. Розв'язання пропорції:

- Перемножимо обидві частини рівняння на 5 г:
 - $X = (8\% / 100 \text{ г}) * 5 \text{ г}$
- Перемножимо обидві частини рівняння на 100 г:
 - $X = 8\% * (5 \text{ г} / 100 \text{ г})$
- Скоротимо подібні члени:

- $X = 0,08 * 5 \text{ г}$
- Обчислимо результат:
- $X = 0,4 \text{ г}$

Отже, в 5 г дріжджового автолізату міститься 0,4 г нітрогену.

Оскільки у біомасі міститься 10% азоту, то за допомогою пропорції можна визначити теоретично можливий рівень біомаси, враховуючи наявну кількість азоту в 0,4 г.

$$0,4 \text{ г/л} - 10 \%$$

$$Y \text{ г/л} - 100 \%$$

$$Y = \frac{0,4 \times 100}{10} = 4$$

Звідси 4 г/л біомаси. Теоретично можливий рівень біомаси за азотом через дріжджовий автолізат становить 4 г/л.

Ще одним джерелом Нітрогену в данному середовищі є неопептон в кількості 2 г/л. Загальний вміст Нітрогену в неопептоні становить 16,1% тому розрахуємо вміст нітрогену в 2 г неопептону: Розрахунок вмісту нітрогену в 2 г неопептону

1. Визначення даних:

- **Кількість неопептону: 2 г**
- **Вміст нітрогену в неопептоні: 16,1%**

2. Розрахунок пропорції:

Щоб розрахувати вміст нітрогену в 2 г неопептону, нам потрібно скласти пропорцію, де:

- **X** - невідома кількість нітрогену в 2 г неопептону
- **16,1%** - відомий вміст нітрогену в неопептоні
- **2 г** - відома кількість неопептону
- **100 г** - відома кількість неопептону

3. Формування пропорції:

$$X / 2 \text{ г} = 16,1\% / 100 \%$$

4. Розв'язання пропорції:

- Перемножимо обидві частини рівняння на 2 г:
 - $X = (16,1\% / 100 \%) * 2 \text{ г}$
- Перемножимо обидві частини рівняння на 100 %:
 - $X = 16,1\% * (2 \text{ г} / 100 \%)$
- Скоротимо подібні члени:
 - $X = 0,161 * 2 \text{ г}$
- Обчислимо результат:
 - $X = 0,322 \text{ г}$

Отже, в 2 г неопептону міститься 0,322 г нітрогену.

Так як у біомасі міститься 10% азоту, то з 0,32г N за пропорцією можна визначити теоретично можливий рівень біомаси:

$$0,32\text{г/л} - 10 \%$$

$$Y \text{ г/л} - 100 \%$$

$$Y = \frac{0,32 \times 100}{10} = 3.2$$

Отже, ми отримали 3.2 г/л біомаси з використанням азоту через неопептон.

Це може вказувати на те, що теоретично можливий рівень біомаси з обох джерел азоту в середовищі складе (4 г/л за дріжджовим автолізатом + 3.2 г/л за неопептоном) = 6.2 г/л.

Розраховуємо кількість вуглецю в 5 г/л глюкози. Молярна маса глюкози ($C_6H_{12}O_6$) = 180 г/моль. Далі необхідно визначити кількість карбону що припадає на 180 г глюкози: із 180 г глюкози на карбон припадає 73 г (так як згідно формулі в глюкозі міститься 6 атомів карбону, а атомна маса одного карбону = 12 г, тому $6 \times 12 = 72$ г).

Отже, за отриманими даними ми можемо скласти пропорцію і дізнатися кількість карбону в 20 грамах глюкози:

180 г C₆H₁₂O₆ – 73 г С

5 г C₆H₁₂O₆ – X г С,

Звідки, $Y = \frac{73 \times 5}{180} = 2.03$ г (вміст карбону в 5 г глюкози), це число також

можна розглядати як потенційний рівень біомаси. Пояснюється це тим, що клітини, у процесі свого зростання, використовують половину вуглецю на синтез АТФ (для створення енергії), а інша половина (тобто 1 г) використовується для формування біомаси. Але оскільки у біомасі вуглець становить 50%, то за пропорцією:

1 г/л – 50% Y г/л – 100%

Випливає, що можливий рівень біомаси дорівнює Y г/л. Таким чином, теоретично можливий рівень біомаси за вуглицем у глюкозі становить 2 г/л.

Отже, лімітуючим фактором в середовищі Fastidious Broth виступає вміст вуглецю в середовищі, з цього можна зробити висновок що концентрація біомаси бактерій *Neisseria gonorrhoeae* ATCC 19424 культивованих в середовищі Fastidious Broth становитиме 2 г/л.

Основним джерелом азоту в середовищі GCB виступає триптон, що міститься в середовищі в кількості 10 г/л. Розрахуємо теоретично можливий вихід біомаси за азотом. Загальний вміст Нітрогену в якому становить 11% тому розрахуємо вміст нітрогену в 10 г триптоні: складаємо пропорцію, оскільки вміст нітрогену в триптоні 11 %, отже в 100г міститься 11г Нітрогену, а в 10г – X г

100 г – 11г

10 г – X г

Звідси, $X = (10 \times 11) / 100 = 1.1$ г Нітрогену

Так як у біомасі міститься 10% азоту, то з 1.1 г N за пропорцією можна визначити теоретично можливий рівень біомаси:

1.1 г/л – 10 %

Y г/л – 100 %

$$y = \frac{1.1 \times 100}{.5} = 2.03$$

Звідси 11 г/л біомаси. Теоретично можливий рівень біомаси за азотом через є триптон становить 11 г/л.

Розрахуємо теоретично можливий вихід біомаси за вуглецем

Для початку потрібно встановити кількість елементарного вуглецю в 20 г/л манітолу. Для цього розрахуємо молярну масу манітолу: молярна маса манітолу ($C_6H_{14}O_6$) = 182 г/моль. Далі необхідно визначити кількість карбону що припадає на 182 г манітолу: із 180 г манітолу на карбон припадає 72 г (так як згідно формули міститься 6 атомів карбону, а атомна маса одного карбону = 12 г, тому $6 \times 12 = 72$ г).

Отже, за отриманими даними ми можемо скласти пропорцію і дізнатися кількість карбону в 20 грамах манітолу:

$$180 \text{ г } C_6H_{14}O_6 - 72 \text{ г } C$$

$$20 \text{ г } C_6H_{14}O_6 - X \text{ г } C,$$

$$\text{Звідки, } X = \frac{72 \times 20}{180} = ; \text{ г (вміст карбону в 20 г манітолу), також це число}$$

можна вважати як теоретично можливий рівень біомаси, це пояснюється тим що, клітини у процесі свого росту використовують половину вуглецю на синтез АТФ (утворення енергії), а інша половина (тобто 4 г) припадає на утворення біомаси, але так як у біомасі 50% становить вуглець, то за пропорцією:

$$4 \text{ г/л} - 50 \%$$

$$Y \text{ г/л} - 100 \%$$

$$\text{Звідси } Y = \frac{4 \times 100}{50} = ; \text{ г/л біомаси. Отже, теоретично можливий рівень}$$

біомаси за вуглецем = 8 г/л.

Отже, лімітуючим фактором в середовищі GCB виступає вміст вуглецю в середовищі, з цього можна зробити висновок що концентрація біомаси бактерій

Neisseria gonorrhoeae CDC-F62 культивованих в середовищі GCB становитиме 8 г/л.

Таблиця 2.3

Умовна вартість 1 г/л цільового продукту при культивуванні штамів

Neisseria gonorrhoeae ATCC 19424

Neisseria gonorrhoeae CDC-F62, *Neisseria gonorrhoeae* JCM33543

Біологічний агент	Вартість 1л середовища, грн	Концентрація біомаси	Тривалість культивування, год
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> Середовище CW	145,47	6	24
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> ATCC 19424 Середовище Fastidious Broth	83,13	2	24
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> CDC-F62 Середовище GCB	240.82	8	24

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

• **Морфологічні ознаки:**

- *Neisseria gonorrhoeae* є грам-негативною коко-бактерією, що зазвичай має форму парабазальних диплококів (коків, які з'єднуються у пари). Кожна клітина має діаметр приблизно 0,6-1,0 мкм.
- Клітини можуть бути симетричними або асиметричними, залежно від їхньої розташованості у парі.

Культуральні ознаки:

Для вирощування *Neisseria gonorrhoeae* використовують спеціальні культуральні середовища, які оптимізовані для цього мікроорганізму, зокрема середовища

Graver-Wade або GCB. Ці середовища містять спеціальні складники, такі як ферментативні гідролізати білків, аміни, вітаміни та інші фактори, які сприяють росту *Neisseria gonorrhoeae*.

На петрівських плитках *Neisseria gonorrhoeae* формує маленькі (0,5-1,0 мм), круглі, слизькі колонії. Ці колонії можуть мати сіре або жовтувате забарвлення, що допомагає в їхній візуальній ідентифікації.

Ці культуральні ознаки є характерними для *Neisseria gonorrhoeae* і використовуються у лабораторній практиці для постановки діагнозу гонореї шляхом виявлення і ідентифікації цього патогена.

Фізіологічні ознаки:

- *Neisseria gonorrhoeae* є факультативним анаеробом, тобто вона може рости як у наявності кисню, так і без нього.
- Бактерія є каталазо-позитивною і оксидазо-позитивною, що означає, що вона продукує каталазу і оксидазу. Реакція на оксидазу зазвичай використовується для швидкої ідентифікації *Neisseria gonorrhoeae*.

Біохімічні ознаки:

- *Neisseria gonorrhoeae* є глюкозофільною бактерією, що означає, що вона може метаболізувати глюкозу.
- Крім того, вона може розщеплювати мальтозу, лактозу і мальтотриозу, що є важливими біохімічними властивостями для її ідентифікації та диференціації від інших видів *Neisseria*.

[7].

Фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента

Neisseria gonorrhoeae є організмом, який може рости як в присутності, так і в відсутності кисню, що робить його факультативним аеробом. Його оптимальна температура для росту знаходиться в діапазоні від 34 до 36 °С, а рН від 5,8 до 8,0, з максимальним приростом при рівні рН 7,0 - 7,2.

Колонії цього виду бактерій мають прозору структуру з шпильковими, дискретними круглими краями. Біохімічно вони позитивно реагують на оксидазу, ферментують глюкозу, але не ферментують мальтозу. Вони відзначаються певною термостійкістю, припиняючи ріст при температурі 60 °С, і не можуть стійко протистояти агресивним умовам.

Колонії *Neisseria gonorrhoeae* мають рожево-буре забарвлення. Золотисто-коричнева пігментація стає видимою після 48 годин інкубації, що є результатом аутолізу клітин.

[8].

2.3 Таксономічний статус біологічного агента

Neisseria gonorrhoeae належить до таксономічної групи бактерій, яка включається до наступного класифікаційного рангу: [9]

Домен – *Bacteria*

Тип – *Proteobacteria*

Клас – *Betaproteobacteria*

Родина – *Neisseriaceae*

Рід – *Neisseria*

Вид – *gonorrhoeae*

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

3.1 Потреба у цільовому продукті

Україна, так само як і багато інших країн, зіткнулася з проблемою збільшення рівня гонореї. Однією з причин є розвиток резистентності гонококів до антибіотиків, що ускладнює лікування інфекції. Тому важливо продовжувати наукові дослідження з метою розробки ефективної вакцини проти гонореї, щоб зменшити поширення цієї інфекції в Україні та світі загалом. За оцінками Всесвітньої організації охорони здоров'я, щорічно в світі відзначається приблизно 66 мільйонів нових випадків гонореї, половина з яких припадає на країни з низьким та середнім рівнем доходу. Це свідчить про глобальний характер проблеми та необхідність міжнародної співпраці у боротьбі з інфекційними хворобами, які передаються переважно через сексуальний контакт.[10]

Розробка гонококової вакцини в Україні є однією з найбільш актуальних проблем у галузі медицини. Головною метою цього проекту є створення ефективного засобу запобігання захворюванню та/або зараженню серед тих, хто отримує щеплення. Очікується, що впровадження комплексної програми вакцинації допоможе зменшити поширення гонореї серед населення та знизити загальну вірусну навантаженість на систему охорони здоров'я.

Попит на гонококову вакцину в Україні визначений потребою у профілактиці гонореї, яка є однією з найпоширеніших ППСШ. Дослідження показують, що присутність цих інфекцій значно збільшує ризик передачі та зараження ВІЛ статевим шляхом.

					НУХТ БТЕК 04.03.39 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив		Науменко Д.В			РОЗДІЛ 3	Літ.	Арк.	Аркуше
Перевір.		Ключка Л.В.					23	72
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр								
Затверд		Стабніков В.П						

Гонококова вакцина використовується у складі комплексної терапії для дорослих і дітей віком від 3 років. Вона рекомендується у разі безуспішної антибіотикотерапії при мляво протікають рецидивах і хронічних формах захворювання, у чоловіків з ускладненою та у жінок з висхідною гонореєю (після стихання гострих запальних явищ), а також для діагностики гонореї[10,11].

3.1.2. Потреба в цільовому продукті вакцини гонококової

Вихідні дані для розрахунку річної потреби у гонококовій вакцині для населення України:

Кількість дорослих з встановленим діагнозом гонококової інфекції (гонореї):
4012

Кількість дітей з встановленим діагнозом гонококової інфекції (гонореї) за регіонами: 68

Усього хворих: 4080

[Вихідні дані взяті у МінЗдрав України за 2020 рік]

Гонококова вакцина є важливою складовою комплексної терапії, яка застосовується для лікування гонореї у дорослих та дітей віком від трьох років. Вона використовується у випадках, коли антибіотикотерапія не дає бажаного результату у легких рецидивах або хронічних формах захворювання. Також вакцина застосовується для полегшення ускладненої гонореї у чоловіків та висхідної гонореї у жінок, після зменшення запальних проявів.

Цей медичний препарат має важливе значення у забезпеченні діагностики гонореї. Однак важливо зазначити, що вакцина використовується лише як допоміжний засіб разом з антибіотиками та призначається у разі важких форм захворювання або недостатньої ефективності антибіотикотерапії.

З урахуванням цих фактів, попит на гонококову вакцину може сягати приблизно 40% серед пацієнтів з гонореєю. Враховуючи важливість цього препарату для пацієнтів із важкими формами захворювання, важливо продовжувати дослідження та вдосконалювати його застосування в медичній практиці.

$68 * 0,4 = 27,2 = 27$ хворих дітей потребуючих вакцинації

$$4012 * 0,4 = 1604,8 = 1604 \text{ хворих дорослих потребуючих вакцинації}$$

Початкова доза вакцини для дорослих становить між 0,3 і 0,4 мл, а для ускладненої гонореї вона може починатися з 0,2 до 0,3 мл. Максимальна одноразова доза не повинна перевищувати 2,0 мл, а максимальна добова доза складає 2,0 мл, що означає, що для доби може використовуватися вміст двох ампул. Кількість ін'єкцій може становити від 6 до 8.

Для дітей старше 3 років ін'єкції можна проводити з інтервалом 1-2 днів в залежності від реакції. Початкова доза вакцини для дітей становить від 0,05 до 0,1 мл, максимальна одноразова доза - 0,5 мл, а максимальна добова доза також складає 0,5 мл.

Отже, для лікування одного дорослого хворого необхідно 16 мл вакцини на курс лікування (2 мл * 8 ін'єкцій). З огляду на статистичні дані, згідно яких 27 хворих є дітьми віком від 14 до 17 років, для лікування одного такого пацієнта необхідно 4 мл вакцини на весь курс лікування (0,5 мл * 8 ін'єкцій).

На один курс лікування для дорослого необхідно 16 мл препарату, тобто для всіх дорослих пацієнтів буде необхідно - 16 мл на курс лікування * 1604 дорослих хворих = 25664мл

На один курс лікування для дитини необхідно 4 мл вакцини, отже нижче наведено розрахунок необхідної кількості препарату для хворих дітей:

$$4 \text{ мл на курс лікування} * 27 \text{ хворих} = 108 \text{ мл}$$

Всього для населення України необхідно:

$$25664 + 108 \text{ мл} = 25772 \text{ мл вакцини на рік.}$$

Кількісна потреба у вакцині для населення України

Категорії пацієнтів	Дозування препарату	Курс вакцинації (кількість доз)	Кількість хворих	Кількість препарату для річного курсу вакцинації
Діти (до 18 років)	0,5 мл	6 – 8	27	108 мл
Дорослі	2 мл	6 – 8	1604	25664 мл
Всього	25772 мл			

3.2. Розрахунок потужностей виробництва

Наразі в Україні відсутня готова до використання гонококова вакцина, але раніше її виробляла компанія ПАТ "Фармстандарт – Біолек" у Харкові. Проте термін реєстрації препарату вже минув, тому вакцина не доступна. За даними "Державного реєстру лікарських засобів України" на 2023–2024 роки, у країні немає зареєстрованих вакцин проти гонореї. Таким чином, Україні необхідно розробити власне виробництво вакцини.

Склад вакцини включає 1 мл розчину в ампулі, де активна речовина - суспензія інактивованої культури гонококів, що містить 10 одиниць стандартного зразка каламутності. Допоміжні речовини включають натрію хлорид (9 мг), фенол як консервант (2,5 мг) і воду для ін'єкцій.

Для отримання 25.5 л вакцини потрібно:

інактивованої культури гонококів (у вигляді суспензії)

$$25.5 \times 8 = 204 \text{ г}$$

фенолу $25,5 \times 2,5 = 63.75 \text{ г}$

натрію хлориду $25,5 \times 9 = 229.5 \text{ г}$

води для ін'єкцій $25.5 - (204 + 63.75 + 229.5) / 1000 = 25.002 \text{ л}$

3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів

Для розрахунку приймемо наступні вихідні дані:

- кількість робочих днів на рік $T_{рд} = 7$ днів;
- час циклу роботи ферментера $T_{цк} = 28$ год, де $T_{цк} = T_{к} + T_{пф}$

$T_k = 24$, тривалість виробничого біосинтезу, $T_p = 4$ год, час підготовки ферментера до роботи);

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

- $E_{св} = 9\%$ (0,09) сумарні втрати вакцини при виділенні, що включають втрати:

- втрати при центрифугуванні - 5% (0,05)
- втрати при термоінактивації – 5% (0,03)
- втрати при розливі – 1% (0,01) Розраховуємо кількість циклів

$N = 24 \times T_{рд} / T_{цк} = 24 \cdot 7 / 28 = 6$ циклів Кількість вакцини за цикл

$V_{цк} = 25,5 / 6 = 4,25$

Для приготування 5 л вакцини необхідно:

- суспензії інактивованої культури гонококів в перерахунку на абсолютно суху біомасу, $4,25 \times 8 = 34$ г АСБ;

- фенолу $4,25 \times 2,5 = 10,625$ г;

- натрію хлориду $4,25 \times 9 = 38,25$ г

- води для ін'єкцій $4,25 - (34 + 10,625 + 38,25) / 1000 = 4,1$ л = 4100 мл Кількість культуральної рідини за цикл

$V_{кр} = K_1 \cdot V_{цк} / (1 - E_{св}) = 1,1 \cdot 4,25 / (1 - 0,09) = 5,1$ л

3.3.1. Обґрунтування типу ферментера

Кожен процес у біотехнології потребує специфічного типу ферментера або біореактора, який вибирається залежно від властивостей мікроорганізмів, умов навколишнього середовища і економічних факторів. Ферментери можна розділити на три основні типи: ті, що забезпечують перемішування за допомогою механічних засобів; барботажні, що використовують подачу повітря для перемішування; та ерліфтні, які забезпечують циркуляцію рідини через подачу повітря внизу і виведення його зверху. Кожен з цих типів має свої переваги і обмеження.

Найчастіше застосовується механічне перемішування, оскільки воно дозволяє легко регулювати умови процесу і ефективно насичувати середовище киснем. Барботажні системи, хоча вони забезпечують хороше перемішування, можуть стикатися з проблемами нерівномірного розподілу повітря і утворення піни. Ерліфтні реактори працюють на подібному принципі, однак забезпечують циркуляцію рідини завдяки подачі повітря знизу і відводу його зверху.

Важливим аспектом є система аерації, оскільки вона впливає на масопередачу кисню та видалення вуглекислого газу. Для оптимального культивування продуцента *Neisseria gonorrhoeae* рекомендується використання ферментера з турбінною мішалкою та барботажною аерацією.

Ферментери з комбінованим введенням енергії мають ряд спільних характеристик, таких як введення газової фази через барботери, можливість проведення асептичного біосинтезу та регулювання зрізових зусиль. Вони також можуть бути доповнені різноманітними пристроями для забезпечення необхідних умов культури.

Загальною рекомендацією є використання ферментера від фірми BaiLun Biotechnology Co., Ltd, зокрема моделі BLBIO-100SQ об'ємом 10 літрів, який має оптимальні характеристики для біосинтезу даного продуцента. Його конструкція спрощує процес експлуатації та забезпечує відповідність стандартам якості.

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

За виробничий цикл отримують $V_{цк} = 5,1$ л культуральної рідини. При одержанні культуральної рідини потрібно врахувати її втрати які становлять від 10 до 15%. Отже, кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом становитиме:

$$V_{роб.1} = V_{кр}/(1-E_{ф}) = 5,1/(1-0,10) = 5,6 \text{ л ,}$$

де $E_{ф}$ – втрати культуральної рідини під час біосинтезу. Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері з робочим об'ємом $V_{роб.1} = 5,6$. При вибраному коефіцієнті заповнення $K_{зап} = 0,5-0,65$ розраховують можливий геометричний об'єм ферментера ($V_{ф}$), що становить

$$V_f = V_{\text{роб.1}}/K_{\text{зап}} = 5.6/0.65 = 8.6 \text{ л}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{сф}} = 10 \text{ л}$, уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{\text{зап1}} = V_{\text{роб.1}}/V_{\text{сф}} = 5.6/8.6 = 0.65.$$

що не набагато змінює задане значення коефіцієнті заповнення $K_{\text{зап}}$.

Виробничий біосинтез:

- Проводиться у ферментері об'ємом 10 літрів.
- Коефіцієнт заповнення ферментера - 0.5 (заповнений наполовину).

Розрахунок робочого об'єму ферментера:

- $V_{\text{роб.}} = V_{\text{г.ф.}} * K_{\text{зап}}$
- $V_{\text{роб.}} = 100 \text{ л} * 0.5 = 50 \text{ л}$

Кількість посівного матеріалу:

- Складає 10% від об'єму поживного середовища.
- $V_{\text{пос.}} = V_{\text{роб.}} * 0.1$
- $V_{\text{пос.}} = 50 \text{ л} * 0.1 = 5 \text{ л}$

Отримання посівного матеріалу:

- **Етап 1:** Вирощування в лабораторії
 - На скошеному агарі в пробірках
 - 500 мл інокуляту в колбах на качалках (4 колби по 750 мл, заповнені на 125 мл)
- **Етап 2:** Вирощування 5 л інокуляту в інокуляторі об'ємом 10 л
- **Етап 3:** Виробниче культивування в ферментері об'ємом 10 л

Загалом:

- Процес одержання посівного матеріалу для виробничого біосинтезу складається з 3 етапів.
- Перші два етапи проводяться в лабораторних умовах.
- Третій етап - це власне виробничий біосинтез.

РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента

Джерелом вуглецю та енергії при вирощуванні *Neisseria gonorrhoeae* є манітол.

Базуючись на таких припущення та використовуючи як основу для створення катаболічного шляху манітолу катаболізм спиртів – гліколіз (шлях Ембдена-Меєргофа-Парнаса), що представлений у KEGG для штаму FA 109, наводимо схему перетворення манітолу [12].

Манітол-фосфатрансферна система:

Ця система є основним механізмом транспортування манітолу через клітинну мембрану.

Вона каталізує одночасне фосфорилування та транспортування манітолу.

Манітол перетворюється на манітол-1-фосфат.

Манітол-1-фосфат-5-дегідрогеназа:

Цей фермент перетворює манітол-1-фосфат на β -D-фруктозо-6-фосфат.

Фосфофруктокіназа (глюкокіназа):

Цей фермент перетворює β -D-фруктозо-6-фосфат на β -D-фруктозо-1,6-фосфат.

					НУХТ БТЕК 04.03.39 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив		Науменко Д.В.			РОЗДІЛ 4	Лім.	Арк.	Аркуші
Перевір.		Ключка Л.В.					30	72
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр								
Затвер		Стабніков В.П.						

Тріозофосфатізомераза:

- Цей фермент перетворює діоксиацетонфосфат на гліцеральдегід 3-фосфат.[13]

4.2 Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт

Синтез препаратів з біомаси включає в себе формування основних органічних сполук, що складають мікробну клітину (білки, нуклеїнові кислоти, полісахариди та ліпіди). Всі 20 амінокислот, необхідних для синтезу білків, утворюються з метаболічних попередників. Серед них піруват, оксалоацетат, 2-оксоглутарат, 3-фосфогліцерат, фосфоенолпіруват, еритрозо-4-фосфат та 5-фосфорибозилпірофосфат.

Біосинтез нуклеїнових кислот включає у себе синтез пуринових та піримідинових нуклеотидів. Для синтезу пуринових нуклеотидів використовуються різні сполуки, такі як аспартат, гліцин, глютамін, ТГФК та CO₂.

Основними попередниками для синтезу ліпідів є 3-фосфогліцерин, що утворюється з діоксиацетонфосфату, та жирні кислоти, які утворюються з ацетил-КоА.[13]

У грамнегативних бактерій муреїнова сітка складається з одного шару і становить менше 10% сухої маси клітинної стінки. Зверху цього одношарового муреїнового мішка розміщується зовнішня мембрана, складена з білків, фосфоліпідів та ліпополісахаридів.[14]

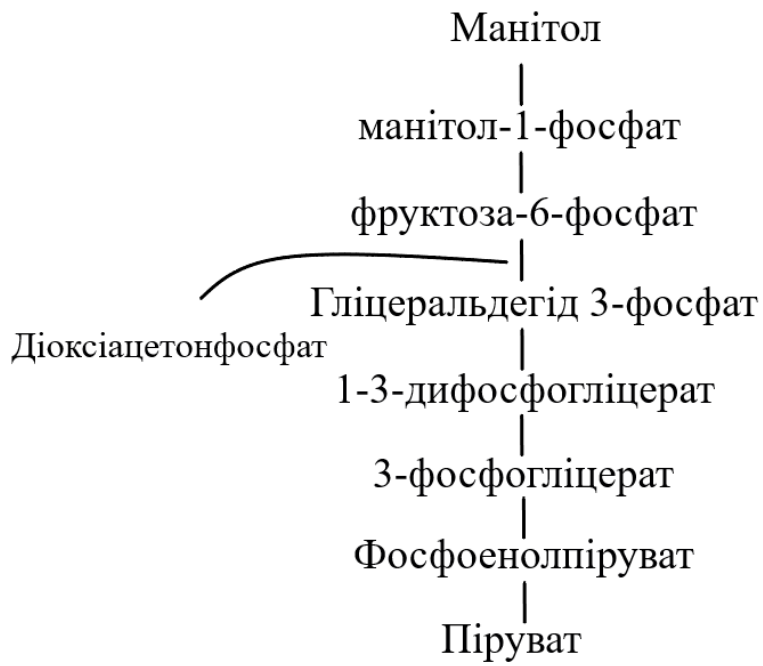


Рис 4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агенту

РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

5.1 Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Культивування мікроорганізмів можна виконувати різними методами: поверхневим, глибинним, періодичним або безперервним, в аеробних або анаеробних умовах. Вибір методу залежить від цілей культивування: накопичення біомаси або отримання конкретного продукту мікроорганізму.

Поверхневий метод полягає в вирощуванні аеробних мікроорганізмів на поверхні рідких або твердих середовищ. Однак цей спосіб не є придатним для виробництва вакцин через високий ризик забруднення культури сторонньою мікрофлорою [15]

Глибинний метод дозволяє використовувати рідкі середовища, в яких мікроорганізми ростуть у всій їх товщі. Через це необхідно постійно аерувати середовище для забезпечення росту аеробних мікроорганізмів. Використання глибинного методу дозволяє підвищити ступінь стерильності та мінімізувати ризик забруднення сторонньою мікрофлорою, що особливо важливо для виробництва фармацевтичних продуктів.

Найбільш доцільним для культивування *Neisseria gonorrhoeae* є періодичний глибинний метод. Оптимальна температура культивування становить 35-37°C, а оптимальне значення рН — від 6.7 до 7.3. Ці умови сприяють нормальному росту культури та формуванню продукту.

НУХТ БТЕК 04.03.39 КР ПЗ

РОЗДІЛ 5

Кафедра БТМ

Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	Літ.	Арк.	Листів
						33	72
Розробив		Науменко Д.В.			Кафедра БТМ		
Перевір.		Ключка Л.В.					
Реценз.							
Н.Контр.							
Затверд		Стабніков В.П.					

5.1.1. Обґрунтування типу ферментера

Вибір типу ферментера для кожного біотехнологічного процесу базується на характеристиках продуцента, середовища та економічних факторів. Ферментери можна класифікувати на три основні категорії: реактори з механічним перемішуванням, барботажні колони для повітряного перемішування, та ерліфтні реактори з циркуляцією. У даному випадку, для ефективного культивування продуцента *Neisseria gonorrhoeae*, рекомендується використання ферментера з одновальною турбінною мішалкою та барботажною аерацією.[16]

Ферментери від 10 л мають спільні характеристики конструкції. Враховуючи особливості культивування та вимоги до продукту, обладнання ферментера вибирається з урахуванням потреб процесу, забезпечуючи необхідні умови, такі як аерація, перемішування, температурний режим, контроль рН, піногасіння та моніторинг рівня кисню.

Ферментер від EPENDORF, розміром 10 л, має відкриту конструкцію для зручності обслуговування, централізовані входи та виходи для різних речовин, та магнітний привід для мішалок, що дозволяє регулювати їх оберти. Стандартні роз'єми дозволяють легко встановлювати та замінювати додаткове обладнання. Таким чином, ферментер від EPENDORF об'ємом 10 л є найбільш підходящим варіантом для проведення виробничого біосинтезу.

5.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря

Для культивування продуцента цієї вакцини, штаму *Neisseria gonorrhoeae* CDC-F62, виробництво встановило високі стандарти стерильності та якості аераційного повітря.

Значення високої якості аераційного повітря

В процесі культивування мікроорганізмів важливо забезпечити їхнє оптимальне середовище для росту та розвитку. Один із ключових факторів, який впливає на цей процес, - це доступ до достатньої кількості кисню, який забезпечується за допомогою аерації. Для гонококової вакцини, виробництво використовує аераційне

повітря високої якості, що є ключовим чинником для ефективного культивування мікроорганізмів та отримання високоякісного продукту.

Забезпечення стерильності аераційного повітря

Для забезпечення високого рівня стерильності аераційного повітря у виробничому середовищі використовуються спеціальні технології та обладнання. Один із ключових компонентів цього процесу - це система компресорів, які забезпечують подачу повітря безпосередньо до ферментерів. Повітря для аерації забирається безпосередньо з очищеного та стерильного приміщення, де вже здійснено попередню обробку повітря до відповідного класу чистоти.

1. Вимоги до стерильного аераційного повітря:

- **Чистота:** Повітря повинне відповідати класу чистоти В або вище, згідно з стандартами ISO 14644-1. Це означає, що в 1 кубічному метрі повітря не повинно бути більше 35 частинок розміром 0,5 мікрметра і більше 1000 частинок розміром 5 мікрметрів.
- **Стерильність:** Повітря повинне бути повністю вільним від мікроорганізмів, включаючи бактерії, гриби та віруси.
- **Вологість:** Оптимальна вологість повітря для культивування *Neisseria gonorrhoeae* становить 70-80%.
- **Температура:** Оптимальна температура повітря для культивування *Neisseria gonorrhoeae* становить 37°C.

2. Методи стерилізації повітря:

- **Фільтрація:** Найпоширенішим методом стерилізації повітря є фільтрація через High Efficiency Particulate Air фільтри. Ці фільтри здатні затримувати 99,97% частинок розміром 0,3 мікрметра і більше.

3. Переваги використання індивідуальних фільтрів:

- **Високий ступінь очистки:** Індивідуальні фільтри, заповнені надтонкими мембранами або волокнами, можуть забезпечити ступінь очистки повітря до 99,7%.
- **Захист від контамінації:** Індивідуальні фільтри захищають ферментер від контамінації мікроорганізмами з навколишнього середовища.

4. Контроль якості:

- Важливо регулярно контролювати чистоту та стерильність аераційного повітря.
- Для контролю чистоти повітря можна використовувати лічильники частинок.
- Для контролю стерильності повітря можна використовувати мікробіологічні методи.

5. Безпека:

- При роботі з аераційним обладнанням важливо дотримуватися правил техніки безпеки.
- Необхідно використовувати засоби індивідуального захисту, такі як респіратори та рукавички.

5.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

Процедура санітарної обробки, яка включає у себе миття та дезінфекцію приміщень, обладнання, комунікацій, тари, інвентарю та інших об'єктів на підприємствах, що займаються виробництвом лікарських засобів, є необхідною складовою технологічного процесу. Ця процедура спрямована на забезпечення встановленого рівня мікробіологічної чистоти продукції та епідемічної безпеки.

Вибір засобів для миття та дезінфекції повинен враховувати декілька критеріїв, включаючи широкий спектр антимікробної дії, безпечність для людини та

навколишнього середовища, хорошу розчинність у воді, ефективність при взаємодії з органічними забрудненнями та відсутність запаху.

Для обробки площі виробничих приміщень приблизно 30-80 мл робочого розчину мийного чи дезінфікуючого засобу витрачається на кожний квадратний метр. При виборі таких засобів слід враховувати їхню вартість та витрати на обробку необхідної площі.

Вибір засобів миття та дезінфекції

Препарат "**Септомакс**" є дезінфекційним засобом, який доступний у формі порошкоподібної маси, від білого до світло-жовтого кольору, і має помірний запах хлору. Він призначений для дезінфекції поверхонь приміщень, обладнання, інвентарю, та спецодягу під час проведення профілактичної дезінфекції, а також для знезараження поверхонь твердих меблів, зовнішніх поверхонь апаратів і приладів на підприємствах різних галузей, зокрема хіміко-фармацевтичної, мікробіологічної і біотехнологічної промисловості, а також косметичної та хімічної промисловості.

Перед використанням робочі розчини "Септомакс" готують безпосередньо, а невикористаний розчин можна зберігати протягом 7 діб у затемненому місці у посуді з щільно закритою кришкою.

Фамідез® CIP AI 511 є потужним низькопінним засобом, спеціально розробленим для ефективного миття технологічного обладнання у процесі виробництва препаратів (в тому числі й вакцин)/харчової продукції. Цей засіб призначений для використання у різних галузях, включаючи фармацевтичну, хімічну, біотехнологічну, мікробіологічну, харчову та переробну промисловості.

Завдяки своїй універсальності, Фамідез® CIP AI 511 може бути використаний для миття різних поверхонь, таких як нержавіюча сталь, поліетилен, поліпропілен, полікарбонат, скло та кераміка, які мають контакт з харчовими продуктами. Цей

засіб ідеально підходить для миття резервуарів, фільтрів, трубопроводів, шлангів, бочок та наповнювальних машин у виробничому процесі вакцини.

Приготування робочого розчину Фамідез® СІР АІ 511 передбачає розведення засобу у воді у концентрації 15%. Після цього розчин циркулює в системі СІР протягом 10 хвилин при температурі до 90°C. Після циркуляції розчину, систему слід промити водою до досягнення нейтрального рівня рН.

Важливо враховувати, що при використанні на поверхнях з алюмінію, які нестійкі до дії лугу, слід попередньо перевірити стійкість матеріалу до впливу засобу. Фізико-хімічні властивості розчину характеризуються рН рівнем більше 10

"Септомакс" є ефективним засобом для дезінфекції поверхонь приміщень та обладнання. Його форма порошкоподібної маси робить його зручним у використанні, а помірний запах хлору не створює дискомфорту. Простий процес підготовки робочого розчину і можливість зберігання невикористаного розчину робить його економічно вигідним рішенням.

Фамідез® СІР АІ 511 є низькопінним засобом з потужною дезінфекційною дією, спеціально призначеним для миття технологічного обладнання. Його універсальність у застосуванні та можливість регулювання концентрації робочого розчину забезпечують ефективне використання засобу в різних галузях промисловості.

Обидва засоби відповідають вимогам безпеки та гігієни, що є важливим у виробництві вакцини гонококової. Їхній вибір обґрунтований їхньою ефективністю, безпекою та універсальністю застосування.

5.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Для отримання гонококової вакцини використовують поживне середовище, що містить різні компоненти у визначених концентраціях. Це середовище можна

розділити на дві композиції залежно від їхніх хімічних властивостей та режиму стерилізації.

Склад середовища:

- Манітол: 20 г/л
- Триптон: 10 г/л
- М'ясний екстракт: 10 г/л
- Дріжджовий автолізат: 5 г/л
- Хлорид літію: 5 г/л
- Хлорид натрію: 5 г/л
- Гліцин: 1.3 г/л
- Піруват натрію: 3 г/л

Композиції:

Склад середовища поділено на дві композиції:

- **Композиція А:** маннітол, дріжджовий автолізат, триптон, м'ясний екстракт, гліцин, піруват натрію (стерилізується при 112°C протягом 30 хвилин)
- **Композиція Б:** хлорид літію, хлорид натрію (стерилізується при 131°C протягом 40 хвилин)

Підготовка посівного матеріалу:

- Для першого етапу вирощування (в колбах на качалці) використовується 0,67 л середовища (композиція А + Б).
- Стерилізація компонентів:
 - Композиція А: 450 мл в колбі при 110°C протягом 40 хвилин
 - Композиція Б: 300 мл в колбі при 130°C протягом 40 хвилин
- Стерилізація здійснюється в автоклаві

Виробничий біосинтез:

- Для ферментера об'ємом 10 л використовується 6,5 л середовища (композиція А + Б).
- Стерилізація компонентів:
 - Композиція А: 5800 мл в колбах при 110°C протягом 40 хвилин
 - Композиція Б: 990 мл в колбі при 130°C протягом 40 хвилин
- Стерилізація здійснюється в автоклаві

РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНЯННЯ

Специфікація обладнання зображеного на апаратурній схемі ділянки післяферментаційних процесів та одержання вакцини гонококової, наведена в табл.6.1

Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	НУХТ БТЕК 04.03.39 КР ПЗ			
Розробив		Науменко Д.В			РОЗДІЛ 6	Літ.	Арк.	Фокуше
Перевір.		Ключка Л.В.					40	72
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд		Стабніков В.П.						

Таблиця 6.1

Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу
вакцини гонококової

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика(виробник)
P1	Реакторзмішувач	1	Реактор-змішувач з рубашкою виготовлений з нержавіючої сталі, має можливість регулювання швидкості обертання мішалки в діапазоні від 24 до 300 обертів за хвилину. Робоча температура складає 90°C, а об'єм реактора - 50 літрів.
Д(Об)2	Об'ємний дозатор	1	Дозатор рідинний для вагового дозування рідини дозами в ємності.
УММ3	Ультразвукова мийна машина	1	Ультразвукова мийна-машина, модель MOT-75 . Матеріал: стальнержавіюч. Виробництво: Китай. Розміри для ампул 1 - 2 мл ампула.
Ф-пов 4	Фільтр повітряний	1	Фільтр повітряний G4-F9 . Виробництво Україна.
Ф-то 5	Фільтр тонкої очистки	1	Компактний повітряний фільтр F9 (EU5-EU9), вироблений в Україні, забезпечує очищення повітря з ефективністю 90%. Він використовується для очищення повітря у різних приміщеннях та монтується всередині кліматичного обладнання. Має максимальну пропускну здатність 150 м3/год
Ф-NP 6	Фільтр NanoProtect	1	Бактерицидні фільтри High Efficiency Particulate Air мають повну герметичність в місцях з'єднання з алюмінієвим корпусом, що забезпечує тривалість та ефективність їх роботи. Вироблені в Україні, мають максимальну пропускну здатність 150 м3/год
Ф-ULPA 7	Фільтр ULPA	1	Фільтр ULPA для очищення повітря
ПЗ-8	Повітрозабірник	1	Металева сітка для видалення механічних забруднень
Ф-го 9	Фільтр грубої очистки	1	Клас фільтрації: F9 Площа фільтрації: 1 м² Виробник: Україна
К-10	Компресор	1	Виробник: Гарден Денвер (Японія) Тип: Винтовий Продуктивність: 450 л/хв Максимальний тиск: 10 бар Потужність: 5 кВт
ТО-11	Теплообмінник-охолоджувач	1	Виробник: Італія Модель: RA 10 Пропускна здатність: до 1000 л/хв Максимальний тиск: 16 бар Вага: 19 кг
P- 12	Ресивер	1	Виробник: Гарден Денвер (Японія) Об'єм: 500 л Максимальний тиск: 16 бар Маса: 185 кг

Ф-сп 13	Фільтр стисненого повітря	1	Виробник: Гарден Денвер (Японія) Модель: GDF005 Пропускна здатність: до 500 л/хв Максимальний тиск: 17 бар
Фтосп-14	Фільтр тонкої очистки стисненого повітря	1	Модель: AF 0056 Продуктивність: до 60 м ³ /год Максимальний тиск: 16 бар Діаметр пор: 0,1 мкм
ІФ-15	Індивідуальний фільтр	1	Площа мембрани: 210 см ² Застосування: <ul style="list-style-type: none"> • Стерилізаційна фільтрація повітря/газів для лабораторних ферментерів • Стерильний вихід повітря для автоклавів та інших ємностей
Фмо- 16	Фільтр механічного очищення	1	Продуктивність: 1,5 м ³ /год Функції: <ul style="list-style-type: none"> • Ефективне видалення з води механічних домішок (пісок, мул, іржа) • Захист побутової техніки та сантехніки <ul style="list-style-type: none"> • Покращення якості води
Фв-17	Фільтр вугільний	1	Продуктивність: до 80 л/хв Робоча температура: 4°C - 45°C Макс. тиск: 8 бар Типорозмір картриджа: 10"х4,5" Габарити: 180 x 180 x 310 мм
УПВ-18	Установка пом'якшення води	1	Продуктивність: 1,2 - 2 м ³ /год Безперервна робота Автоматичне керування Компактні розміри
УЗ-19	Установка знесолення води «OptionPlus»	1	Виробник: Нерекс Продуктивність: 7/15/30/60 л/год Кількість ємностей тиску: 5 шт. Кількість мембран: 25 шт.
З-20	Збірник	1	Об'єм: 1000 л Матеріал: нержавіюча сталь 316 Виробник: Китай
ТДУ-21	Трьохкорпусна дистиляційна установка	1	Матеріали: нержавіюча сталь Продуктивність: до 200 л/год (з можливістю регулювання 60-100%)
Нв-22	Насос відцентровий	1	Матеріал: нержавіюча сталь Продуктивність: 180 л/хв Максимальний тиск: 4 бар

ЗБ-23	Збірник горизонтальний	1	Матеріал: нержавіюча сталь Об'єм: 2000 л Робочий тиск: атмосферно-вакуумний Тип випуску продукту: нижній Україна Розміри: 210 x 130 мм
А-24	Автоклав	1	Тип: 3 вертикальним завантаженням Корисний об'єм камери: 160 л Виробник: Ізраїль
Нп-25	Насос перистальтичний	1	Матеріал: нержавіюча сталь Виробник: Китай Швидкість обертання: 108 об/хв Продуктивність: 0,5÷6 л/год Тиск: 1 бар
ФЛ-26	Ферментер лабораторний	1	Виробник: Eppendorf Об'єм: 10 л Частота обертання мішалки: 25-150 об/хв Вага: 36 кг
Нп-27	Насос перистальтичний	1	Швидкість обертання: 120 об/хв Продуктивність: 0,5-8 л/год
З-28	Збірник	1	Матеріал: нержавіюча сталь Модель: 90 Об'єм: 10 л
Ц-29	Цнтрифуга	1	Матеріал: нержавіюча сталь Швидкість потоку: 0,1 - 5 л/хв Виробник: Україна Призначення: Стерилізація та відділення рідин від твердих частинок.
Рз-30	Реактор змішувач	1	Об'єм: 10 л Модель: SE200 Мінімальна робоча температура: -40 °С Максимальна робоча температура: 180 °С Частота обертання мішалки: 40-400 об/хв
Нп-31	Насосперистальт ичний	1	Матеріал: нержавіюча сталь Виробник: Китай Швидкість обертання: 108 об/хв Продуктивність: 0,5-6 л/год Тиск: 1 бар Час роботи: 3,5 сек

РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

Санітарна підготовка виробництва перед початком процесу синтезу вакцини гонококової - це комплекс заходів, які мають на меті забезпечити високий стандарт гігієни та безпеки під час виробництва медичних препаратів.

На етапі підготовки персоналу проводиться навчання з правил санітарної гігієни та внутрішніх процедур виробництва. Кожен працівник повинен бути ознайомлений з правилами ведення санітарного журналу та процедурою дезінфекції особистого захисту.

Підготовка виробничих приміщень включає не лише очищення та дезінфекцію, а й перевірку робочих параметрів систем вентиляції та повітропостачання. Важливо, щоб усі приміщення були добре освітлені та вентильовалися, щоб уникнути забруднення та зберегти високий стандарт якості повітря.

Підготовка обладнання та комунікацій передбачає перевірку та підтримку робочої ефективності всіх систем, включаючи системи очищення, фільтрації та дезінфекції. Додатково проводиться калібрування та перевірка точності вимірювальних приладів та контрольно-вимірювального обладнання.

Приготування дезінфікуючих розчинів включає підбір та підготовку засобів дезінфекції з урахуванням їх ефективності та безпеки для персоналу та виробничих умов.

Ці етапи санітарної підготовки виробництва є важливими для забезпечення високої якості та безпеки продукції, що виробляється, та збереження здоров'я персоналу.[17]

Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	НУХТ БТЕК 04.03.39 КР ПЗ			
Розробив		Науменко Д.В.			РОЗДІЛ 7	Літ.	Арк.	Аркуші
Перевір..		Ключка Л.В.					44	72
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н.Конр.								
Затверд		Стабніков ВП						

ДР 1.1 Приготування миючих та дезінфікуючих засобів.

Для забезпечення стандартів гігієни та відповідності нормам безпеки на підприємстві активно використовуються мийні та дезінфікуючі засоби. Ці засоби виготовляють у спеціальних реакторах, де ретельно контролюються склад та концентрація компонентів для досягнення максимальної ефективності очищення та дезінфекції.

Приготовані мийні та дезінфікуючі розчини використовуються для різноманітних цілей на підприємстві. Вони використовуються для регулярної санітації та очищення приміщень, включаючи робочі зони, складські приміщення та офісні простори, з метою запобігання забруднення та поширення інфекційних захворювань серед персоналу.

Крім того, мийні засоби використовуються для дезінфекції технологічного обладнання та комунікацій, що забезпечує безпеку та якість виробничих процесів. Це важливо для забезпечення високої якості продукції та дотримання стандартів виробництва.[18].

ДР 1.2 Підготовка виробничих приміщень.

Підготовка виробничих приміщень до роботи - це важливий процес, який включає кілька етапів, спрямованих на забезпечення безпеки та гігієни робочого середовища.

ДР 1.2.1. Щоденне прибирання.

Персонал, що працює у виробничих приміщеннях, виконує ряд кроків для забезпечення чистоти та гігієни на робочому місці. Спочатку вони утилізують виробничі відходи (якщо такі є) та прибирають розсипані порошки та механічні забруднення.

Послідовність прибирання виробничих приміщень виглядає наступним чином: спочатку матеріали для прибирання заздалегідь знезаражуються у розчині дезінфекційного засобу. Після цього проводиться вологе прибирання, яке включає миття стін, дверей та інших поверхонь теплою водою, а потім їх висушують або

втирають досуха. Після висушування або витирання поверхні піддаються додатковій дезінфекції.

Для миття використовуються засоби "Септомакс " та " Фамідез® СІР АІ 511 ", які поєднують у собі два процеси - миття і дезінфекцію, що робить підготовку приміщень більш зручною та ефективною.

Після прибирання виробничих приміщень здійснюється запис в журналі санітарної підготовки з відміткою про проведені процедури. Прибирання виробничих приміщень рекомендується проводити щозміни, щоб забезпечити постійну чистоту та гігієну. Використаний розчин направляється на утилізацію відходів для екологічного очищення.

ДР 1.3. Підготовка обладнання та комунікацій.

Безпечність виробничого обладнання для продукції - це важлива складова виробничого процесу. Підготовка технологічного обладнання включає кілька етапів, які забезпечують його належну функціональність та безпеку:

Перед проведенням технологічного процесу: На цьому етапі проводяться попередні перевірки технічного стану обладнання, його регулювання та налаштування з метою гарантування правильної роботи та відсутності можливих недоліків або поломок, які можуть вплинути на якість продукції.

Після проведення технологічного процесу: Після завершення роботи обладнання перевіряється на наявність будь-яких відхилень від нормального режиму роботи, можливих пошкоджень або зношеності деталей. Це дозволяє вчасно виявити і виправити можливі несправності перед наступним використанням.

Забезпечення безпеки технологічного обладнання важливо для запобігання можливих аварій, збереження якості продукції та забезпечення безпеки працівників. Тому проведення попередніх та післяопераційних перевірок є необхідним етапом у виробничому процесі.

ДР 1.3.1. Миття обладнання.

Технологічне обладнання та комунікаційні системи обробляються розчином " Фамідез® СІР АІ 511 ". Збірник та центрифугу обробляються мийно-дезінфікуючим розчином " Фамідез® СІР АІ 511 " такої ж концентрації після кожного центрифугування. Цей процес проводиться при 60°C на завантажувальній лінії ферментера.

ДР 1.3.2 Ополіскування обладнання та комунікацій

Після процедури обробки, елементи або поверхні ополіскуються, використовуючи очищену воду. Цей процес відбувається при контрольованій температурі 40 °С протягом 20-30 хвилин, щоб забезпечити ефективне видалення будь-яких залишків розчинів та забруднень, які можуть залишитися після обробки.

Після завершення ополіскування відпрацьована вода, що містить залишки забруднень або розчинів, направляється на утилізацію відходів. Це забезпечує відповідність екологічним стандартам і забезпечує безпеку навколишнього середовища.

ДР.1.3.3. Перевірка на герметичність

Існують сучасні методи для перевірки герметичності обладнання, які дозволяють виявляти навіть найменші витоки. Один із таких методів базується на використанні спеціального пристрою, відомого як течешукач галогенних газів. Цей пристрій здатний виявляти мікроконцентрації витоку газу, що дозволяє оперативно виявляти недоліки у герметичності системи.

Для проведення перевірки обладнання та комунікацій використовується речовина, така як тетрахлорметан. Вона підкачується в герметично закриті обладнання та комунікації, підвищуючи тиск до значення приблизно 0,5 МПа. Після цього за допомогою течешукача галогенних газів проводиться огляд всіх з'єднань та місць з'єднання обладнання. Особлива увага приділяється фланцевим з'єднанням та ущільненню кришок місткісного обладнання, де найчастіше можуть виникати проблеми з герметичністю.

Якщо під час перевірки виявлені нещільні з'єднання, проводиться розбірка та профілактичне ущільнення обладнання та комунікацій. У цьому процесі використовуються різноманітні ущільнюючі матеріали, такі як термостійка гума, пароніт або фторопласт. Після завершення перевірки і усунення недоліків на чисте обладнання накладається маркувальна етикетка з датою і результатами перевірки.

ДР.1.4. Стерилізація обладнання

Процес стерилізації устаткування є важливим етапом в забезпеченні безпеки та гігієни у виробничих умовах. В даному випадку, стерилізація здійснюється за допомогою гострої пари, яка має високу температуру 130°C та підвищений тиск 0,3 МПа. Ці параметри обумовлені потребою знищення будь-якої мікроорганізмів, що можуть бути присутні на поверхні устаткування.

Тривалість стерилізації складає приблизно 40 хвилин. Цей час дозволяє достатньо довго піддати устаткування впливу гарячої пари, щоб забезпечити повну ефективність знищення мікроорганізмів. Крім того, важливою є ретельна регуляція температури та тиску під час процесу, щоб забезпечити стабільні умови для стерилізації.

Цей процес гарантує, що устаткування буде повністю очищеним від мікроорганізмів, що можуть впливати на якість продукції та загальний стандарт гігієни у виробничому середовищі.[20]

ДР 1.4.1 Миття допоміжного обладнання

Для готування допоміжного обладнання в першу чергу підбирають інвентар, який потрібно буде використовувати найближчим часом відповідно до робочого графіку, звертаючи особливу увагу на такі елементи, як силіконові шланги, колби, пінцети та пробки.

на 20-30 хвилин для просочення. Після цього вони ретельно миються як зсередини, так і ззовні, а потім полоскаються під проточною водою та передаються для завершальної обробки.[20]

ДР 2 Підготовка вентиляційного повітря приміщень.

ДР 2.1 Забір атмосферного повітря

Для забору атмосферного повітря використовується спеціальний повітрозабірник (ПЗ-6), який розташований на висоті 10-15 метрів через забірний повітропровід. Це вибрана висота, де концентрація мікроорганізмів є стабільною. Крім того, на цій стадії проводиться контроль за тиском у повітропроводі, щоб забезпечити оптимальні умови для подальшої обробки повітря.

ДР 2.2. Попередня очистка повітря

Для ефективного видалення механічних часток використовується фільтр, який встановлений у приточній вентиляційній установці. Цей фільтр, відзначається високою ефективністю очищення від механічних часток у діапазоні 1-10 частинок на кубометр повітря. Він володіє тривалим терміном експлуатації та високою здатністю утримувати різноманітні типи забруднень. Завдяки фільтрам попереднього очищення значно знижується рівень забруднення у вентиляційному повітрі, що забезпечує високу якість внутрішнього середовища.

ДР 2.3. Кондиціонування повітря

Комфортна температура в безпилкових приміщеннях забезпечується завдяки використанню каналного кондиціонера який регулює температуру повітря в межах від 18 до 20°C взимку та від 20 до 25°C влітку. Відносна вологість повітря утримується в оптимальному діапазоні від 35% до 50%, що створює затишну та здорову атмосферу для праці та відпочинку.

ДР 2.4. Очищення повітря для класу D

Для очищення повітря до класу чистоти D застосовують вугільні або губчасті фільтри. Ці фільтри ефективно утримують частинки розміром від 40 мікрон, маючи при цьому клас фільтрації від 5 до 10. Вони застосовуються як друга ступінь

очищення повітря в приміщеннях з підвищеними вимогами до його чистоти, забезпечуючи здорове та комфортне середовище для проживання та роботи.

ДР 2.5. Очищення повітря для класу С

Для забезпечення чистоти повітря відповідно до вимог класу чистоти С використовуються фільтри типу High Efficiency Particulate Air. У цих фільтрах використовується спеціальне скловолокно, яке розміщене у гофрованій структурі для збільшення площі фільтрації. Такі фільтри здатні ефективно утримувати частинки розміром менше 30 мікрон, і вони мають клас фільтрації від H10 до 21. Це дозволяє створювати середовище з чистим та здоровим повітрям, що відповідає високим стандартам якості.

ДР 2.6. Очищення повітря для класу В

Для досягнення високого рівня чистоти повітря, що відповідає вимогам класу В, використовуються фільтри високої ефективності H12 типу High Efficiency Particulate Air (Ф). Ці фільтри створені для максимально ефективного утримання найдрібніших частинок, що можуть бути присутні в повітрі.

Фільтри використовуються в приміщеннях з високими вимогами до чистоти повітря, таких як лабораторії, фармацевтичні виробництва або чисті промислові приміщення. Вони мають вищу ефективність захоплення частинок, ніж менш ефективні фільтри, що дозволяє досягнути вищого рівня чистоти.

Ці фільтри забезпечують ефективне утримання частинок розміром менше 10 мікрон, включаючи пил, бактерії та інші забруднювачі. Вони важливі для забезпечення безпеки та здоров'я у приміщеннях, де вимоги до чистоти повітря є критичними.

ДР 2.7. Очищення повітря для класу А

Для досягнення високого рівня чистоти повітря, який відповідає найвищим стандартам, використовуються фільтри надвисокої ефективності типу ULPA. Ці фільтри спеціально розроблені для утримання найдрібніших частинок, що можуть бути присутні в повітрі.

Фільтри ULPA використовуються в найбільш вимогливих середовищах, де важлива абсолютна чистота повітря, наприклад, у чистих кімнатах для виробництва мікроелектроніки, лабораторіях чистоти або оперувальних блоках в медичних установах.

Ці фільтри забезпечують надійне утримання навіть найдрібніших частинок розміром менше 5 мікрон, включаючи віруси, бактерії та інші мікроорганізми. Вони є ключовим елементом для забезпечення безпеки та чистоти у таких середовищах, де навіть найменші забруднення можуть мати серйозні наслідки.

ДР 3. Підготовка стисненого та аераційного повітря

Під час культивування в ферментері, де росте культура мікроорганізмів, застосовується система аерації, яка забезпечує постачання стерильного повітря під підвищеним тиском 0,1 МПа. Це необхідно для задоволення біологічних потреб мікроорганізмів у кисні, що сприяє їхньому активному зростанню та розвитку. Така система аерації допомагає оптимізувати умови культивування та забезпечує ефективність процесу біологічної продукції.

ДР 3.1. Забір атмосферного повітря

При плануванні місця для забору атмосферного повітря необхідно ретельно враховувати потенційні джерела газоподібних забруднень, такі як димові труби, автомобільний рух, промислові викиди тощо. Оскільки концентрація мікроорганізмів над землею змінюється з висотою, де найвища концентрація спостерігається близько 30 м над поверхнею землі і стабілізується, забір повітря варто проводити на висоті приблизно 15–20 м. Для цього використовується спеціальний повітрозбірник (ПЗ), що дозволяє забирати повітря з оптимальної висоти з мінімальним ризиком забруднення від наземних джерел.

ДР 3.2. Процес грубого очищення повітря

На даному етапі, фільтр відіграє ключову роль у видаленні великих фракцій механічних забруднень та пилу з повітря. Це важливий етап у процесі очищення повітря, оскільки ці частки можуть бути шкідливими для подальшого використання повітря в технологічних процесах. Фільтри попереднього очищення, які використовуються в цьому процесі, спеціально розроблені з урахуванням великих фракцій забруднень і пилу. Вони ефективно утримують ці частки, забезпечуючи, таким чином, високу якість повітря, яке потім використовується у подальших технологічних процесах.

ДР 3.3. Стиснення повітря

Через використання стискача (С) відбувається стиснення повітря до рівня 0,5 МПа за підвищеної температури 200 °С. Даний стискач забезпечує досягнення необхідного тиску у повітрі, що відповідає вимозі, що перевищується в системі підготовки повітря. Цей підхід забезпечує ефективність у стисканні та підготовці повітря для подальшого використання в технологічних процесах.

ДР 3.4. Охолодження повітря

Після проходження через компресор К-11, повітря направляється в теплообмінник, де його температура знижується до 25 градусів Цельсія. Після цього вологість повітря стабілізується на рівні $W = 50\%$ у ресивері.

ДР 3.5. Очищення повітря в головному фільтрі

Після проходження повітря через компресор (К-11) та охолодження в теплообміннику до температури 25 градусів Цельсія, воно подальше очищається у фільтрі. Цей фільтр має пори діаметром 1 мікромметр і використовує синтетичні волокна як фільтрувальний матеріал.

Ступінь очищення повітря від пилу, забруднень та інших часток у фільтрі становить 95%. Це забезпечує високу якість очищеного повітря, що використовується у подальших технологічних процесах.

Щоб забезпечити ефективну роботу фільтру, рекомендується замінювати фільтруючий матеріал двічі на рік. Однак, у випадку передчасного забруднення,

вологість або зараження фільтруючого матеріалу, необхідно провести негайну заміну фільтра, щоб уникнути втрати якості очищення повітря.

ДР 3.6. Очищення повітря в фільтрі тонкої очистки

Після проходження повітря через компресор та охолодження в теплообміннику до температури 25 градусів Цельсія, воно подальше проходить тонке очищення у фільтрі. Цей фільтр має пори діаметром 0,5 мкм і використовує синтетичні волокна як фільтрувальний матеріал.

Ступінь очищення повітря від пилу, мікроорганізмів та інших часток у фільтрі становить 99,9%. Це забезпечує високу якість очищення повітря, що використовується у подальших технологічних процесах.

Для підтримки ефективності фільтрації рекомендується регулярно замінювати фільтруючий матеріал. Таке тонке очищення гарантує високу якість повітря, що потребується для безперебійної роботи у вимогливих технологічних процесах.

ДР 3.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

Стиснене аераційне повітря направляється на касетний індивідуальний фільтр (Ф-20), який безпосередньо встановлюється на ферментері. Цей фільтр забезпечує ступінь очищення на рівні 99,9%, гарантуючи бездоганну якість повітря, що використовується у процесах біопродукції.

ДР 4. Підготовка води очищеної та ін'єкційної

У процесі виробництва вакцини гонококової використовується вода очищена та вода для ін'єкцій, що відповідає вимогам фармакопейної якості. Отримання цих видів води здійснюється за допомогою багатоетапної системи очищення, що включає в себе:

(ДР 4.1)Забір водопровідної води

Вода надходить з міського водоканалу в фільтр для видалення крупних механічних домішок.

ДР 4.2. Очищення води від механічних частинок (ДР 5.2)

Груба фільтрація (Ф) дозволяє очищати воду від частинок розміром більше 80-100 мкм.

ДР 4.3 Очищення на вугільних фільтрах

Далі вода очищена від механічних частинок подається на вугільний фільтр (Ф-22) для зниження концентрації органічних речовин і хлору. Придатність фільтрів контролюється за допомогою різниці тисків води до і після фільтра. Активоване вугілля підлягає щоквартальному контролю на вміст хлору.

ДР 4.4 Пом'якшення води за допомогою катіонообмінної смоли

Вода поступає в установку для пом'якшення води (УПВ-23), де катіони Са, Mg, Fe, Mn видаляються за допомогою катіонообмінної смоли. Установка повністю автоматизована, не потребує електричного живлення. Вона складається з двох паралельно включених фільтрів, які працюють по черзі: один в режимі очищення, другий - в режимі регенерації.

ДР 4.5 Очищення зворотнім осмосом

Для отримання води фармакопейної якості (очищеної) використовується зворотноосмотична установка "Millipore" яка дає на виході воду з електропровідністю до 40 мкСм/см.

ДР 4.6 Зберігання та розподіл води очищеної

Очищена вода подається в збірник (ЗБ) для зберігання, де підтримується стала температура. Звідти вона надходить до технологічних стадій виробництва.

ДР 4.7 Попередній підігрів

У збірнику вода підігрівається до 70°C.

ДР 4.8. Дистиляція

Наступним етапом є багатоклонний дистилятор де вода остаточно очищується у відповідності до вимог для води для ін'єкцій.

ДР 4.9 Зберігання води для ін'єкцій

Отримана вода для ін'єкцій за допомогою відцентрового насоса перекачується до баку для зберігання при температурі 80 °C та постійній циркуляції.

ДР 5. Приготування та стерилізація поживних середовищ

ДР 5.1. Приготування та стерилізація поживного середовища для культивування інокуляту в колбах на качалці

Для вирощування інокуляту в колбах на качалці використовується 0,67 л поживного середовища (10% від загального об'єму середовища стадії 1). Джерелом вуглецю в середовищі є манітол, а джерелом азоту - м'ясний екстракт та триптон.

ДР 5.1.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважити: 14 г манітолу, 7 г м'ясного екстракту, 7 г триптону, 4 г дріжджового автолізу, 1 г гліцину. Поміщують всі компоненти в колбу об'ємом 1000 мл, додають 400 мл дистильованої води та ретельно перемішують.

Закривають колбу ватно-марлевою пробкою. Стерилізують в автоклаві при температурі 112°C протягом 30 хвилин.

ДР 6.1. Приготування 0,9% розчину натрію хлориду

Для суспендування інактивованої біомаси *Neisseria gonorrhoeae* знадобиться 1442 мл 0,9% розчину натрію хлориду.

Етапи приготування:

Зважування NaCl: На технічних вагах зважити 42,38 г NaCl.

Розчинення NaCl: Помістити NaCl в колбу з боковим відводом об'ємом 1500 мл. Додати 700 мл ін'єкційної води та ретельно перемішати до повного розчинення.

Стерилізація: Закрити колбу пробкою та стерилізувати в автоклаві при температурі 131°C протягом 40 хвилин.

Перелив розчину: Після стерилізації, в асептичних умовах за допомогою силіконової трубки перелити розчин в реактор-змішувач.

ДР 6.2. Приготування 0,25% розчину фенолу

Етапи приготування:

Зважування фенолу: На технічних вагах в асептичних умовах зважити 11,77 г фенолу в колбу з боковим відводом об'ємом 1000 мл.

Додати 1000 мл ін'єкційної води та ретельно перемішати до повного розчинення. Закрити колбу пробкою. В асептичних умовах підключити до колби силіконову трубку для переливу розчину в реактор-змішувач .

ТП 7. Підготовка посівного матеріалу

ТП 7.1. Зберігання колекційної культури

Колекційну культуру *N. gonorrhoeae* CDC-F62 зберігають у пробірках з агаром GCB, заскошеним під кутом, при температурі -80°C.

ТП 7.2. Отримання робочої культури

Культуру, що зберігається в пробірках з агаром GCB, суспендують фосфатним буфером.

Розсівають петлею суспензію на чашки Петрі з середовищем GonococcalBase (GCB) для отримання ізольованих колоній.

Інкубують чашки Петрі при 37°C протягом 24 годин.

ТП 7.3. Вирощування культури на агаризованих середовищах

З ізольованих колоній на чашках Петрі петлею пересівають культуру в пробірки зі скошеним агаром GonococcalBase (GCB) (одна ізольована колонія на одну пробірку).

Пересівають ізольовані колонії, які знаходяться на відстані не менше 1 см одна від одної.

Інкубують пробірки при 37°C протягом 24 годин.

ТП 7.4. Вирощування культури в колбах на качалках

Для вирощування рідкої культури в об'ємом 1 л, що містить стерильну композицію А (від ДР 6.1), вносять стерильну композицію Б (від ДР 6.1.). Вміст колби перемішують та у стерильних умовах розливають по 100 мл у стерильні колби об'ємом 750 мл

У пробірку з робочою культурою *N. gonorrhoeae* CDC-F62 вносять 5 мл стерильного фізіологічного розчину, суспендують клітини (змивають водою).

Піпеткою відбирають суспензію та вносять її у кількості по 10 мл в колби з розлитим поживним середовищем. Вирощують мікроорганізми в колбах на качалці протягом 24 годин.

ТП 8 . Виробниче культивування

ТП 8.1. Біосинтез

Виробниче культивування здійснюється в одноразовому ферментері (ФЛ) об'ємом 10 л. За допомогою засівної колби у ферментер стерильні композиції А та Б. Через іншу засівну колбу об'ємом 1 л в стерильних умовах вносять в ферментер.вносять посівний матеріал у вигляді культуральної рідини об'ємом 0,65 л. Тривалість культивування становить 1 добу (24 години). Підтримується рН 6,8 – 7,3. Температура культивування становить $37\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Контроль культивування: через кожні 3 години відбирають проби для контролю концентрації біомаси та для мікробіологічного контролю. Процес культивування зупиняють при досягненні культурою концентрації клітин 8 г/л.

РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

Таблиця 8.1.

8.1 Карта постадійного контролю доферментаційних процесів

Номер контрольної точки та назви стадій	Показник, котрий визначається	Методика контролю	Періодичність перевірки/відбору у проби	Значення показників
К 1.1 Очистка повітря від забруднення пилом	Рівень чистоти	Перевірка ступеня очищення	Пезперервно при подачі повітря	Ступінь очистки 75-80%
К 1.2 Кондиціонування	Температура й вологість	Термометр технічний,	Пезперервно за наявності повітря	Температура = 28-4 °С, Вологість = 60-70%
К 1.3 Очищення повітря з фітром тонкої очистки	Перепад тиску	Манометр, перевірка ступеня очищення	Пезперервно при подачі повітря	Ступінь очистки = 99.9 %
К 1.3 Очищення повітря з фітром ультра-тонкої очистки	Тиск	Манометр, перевірка ступеня очищення	Пезперервно при подачі повітря післяочищення повітря у фільтрі	Ступінь очистки = 99.9%

					НУХТ БТЕК 04.03.39 КР ПЗ		
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розробив		Науменко Д.В			Літ.	Арк.	Докуше
Перевір.		Ключка Л.В				58	72
Реценз.					РОЗДІЛ 8 Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Затверд		Стабніков ВП					

К, 2.1.1 Підготовка та стерилізація живильного середовища для культивування інокуляту в колбах на качалці.	Композиція: А Температура, стерильність й тиск	термометр, годинник, манометр,	Температура визначається безперервно під час стерилізації	Тиск = 0,05МПа, температура = 110 °С, час = 30 хв
К, 2.1.2 Стерилізація	Композиція: Б Температура, тиск й стерильність	Термометр, годинник, манометр	Температура визначається під час стерилізації,	тиск = 0,05МПа, температура = 120 °С, час = 40 хв
К, 2.2.1 Приготування та стерилізація живильного середовища для виробничого біосинтезу.	Композиція: А Температура, тиск й стерильність	Годинник, термометр, манометр	Температура контролюється неперервно протягом процесу стерилізації, і проводиться мікробіологічний аналіз після завершення стерилізації.	тиск = 0,05МПа, температура = 110 °С, час = 30 хв
К, 2.2.2 Приготування та стерилізація живильного середовища для виробничого біосинтезу.	Композиція: Б Температура, тиск й стерильність	Годинник, термометр, манометр	Температура контролюється неперервно протягом процесу стерилізації, і проводиться мікробіологічний аналіз після завершення стерилізації.	Тиск = 0,05МПа, температура = 130 °С, час = 40 хв
К 3.1. Підготовка музейної культури	Температура	Термометр	Під час зберігання культури	Температурний режим = -80 °С
К 3.2. Одержання культури	Температура, тиск й стерильність	Годинник, термометр	Температура контролюється неперервно протягом процесу стерилізації, і проводиться мікробіологічний аналіз після завершення стерилізації. Мікробіологічний контроль кожні 5-6 годин.	температура = 35-37 °С, час = 24 год

К, 3.3. Вирощування культури на агаризованих середовищах	Температура, тиск й стерильність	Годинник, термометр	Температура контролюється неперервно протягом процесу стерилізації, і проводиться мікробіологічний аналіз після завершення стерилізації.	температура = 35-37 °С, час = 24 год
К, 4.1 Культив. виробниче	Температура, тиск й стерильність, рН	Годинник, термометр, лабораторний рН-метр	Температура і рН систематично моніторяться протягом процесу культивування, здійснюється мікробіологічний контроль і мікроскопічний огляд кожні 5-6 годин.	температура = 35-37 °С, час = 24 год, рівень рН = 6.8-7,3 Кіль./Обер. = 200 об/хв

8.2. Мікробіологічний контроль

Мікробіологічний контроль відіграє ключову роль у забезпеченні якості продукції. Застосовують методи світлової мікроскопії для виявлення мікроорганізмів. При проведенні мікроскопіювання можна виявити клітини *Neisseria gonorrhoeae*, які мають такі характеристики:

- Бактерії мають овальну або кулясту форму з розміром приблизно 0,6 – 1,0 мкм.
- Розташовані вони поодинокі або у парах (диплококи), з сусідньою стороною увігнутою.
- Бактерії нерухомі і лишені джгутиків, хоча можуть мати фімбрії.

Для підготовки препарату на чистому знежиреному предметному склі використовують стерильну петлю для нанесення краплі культуральної рідини. Потім мазок висушують і на нього наносять імерсійне масло.

Після закінчення роботи залишки масла знімають за допомогою етилового спирту, щоб підготувати препарат для мікроскопії. Капсули, що оточують кожну

пару коків, можна визначити на підфарбованому препараті. Контроль чистоти культури проводять шляхом мікроскопії фіксованих та забарвлених клітин.

Для забезпечення якості продукції відбирають проби культуральної рідини з культури продуцента у стерильних умовах, використовуючи стерильні піпетки та пробовідбірники.[21]

8.3. Показники росту і синтезу цільового продукту

8.3.1. Концентрація біомаси

Концентрація біомаси продуцента є однією з ключових характеристик, яку важливо контролювати під час виробництва гонококової вакцини. Метод вимірювання оптичної густини (OD) широко використовується у мікробіології для оцінки цього параметра.

Принцип цього методу полягає у вимірюванні оптичної щільності при довжині хвилі 600 нм, припускаючи, що отримане значення OD пропорційне кількості клітин в зразку, тобто його концентрації. Для калібрування приладу будується калібрувальний графік, що відображає залежність OD від кількості колонієутворюючих одиниць на мл (КУО/мл).

Для вимірювання необхідно підготувати культуральну рідину, розведену у відповідному співвідношенні. До безпосереднього вимірювання потрібно підготувати зразки, переконатися у їх розчиненні та правильному розведенні, а також уникати введення бульбашок. Після вимірювання отримані дані порівнюють з калібрувальним графіком для визначення концентрації біомаси.[22]

Для аналізу зразків можна використовувати сучасне обладнання, наприклад, спектрофотометр OD600 DiluPhotometer.

Цей метод дозволяє ефективно контролювати концентрацію біомаси продуцента та забезпечувати високу якість виробництва гонококової вакцини.

Рис.5.1 Спектрофотометр OD600 DiluPhotometer та мікрокувети DiluCell

8.3.2. Концентрація джерела вуглецю і азоту

8.3.2.1 Визначення загального азоту методом Несслера.

Визначення азоту колориметричним методом з реактивом Несслера

Принцип методу:

Цей метод ґрунтується на здатності аміаку, що утворюється при мінералізації зразка, утворювати жовто-оранжевий комплекс з реактивом Несслера. Інтенсивність забарвлення комплексу пропорційна концентрації азоту і може бути виміряна колориметрично.

Переваги методу:

- Висока чутливість
- Швидкість та простота виконання
- Можливість визначення азоту в різних типах проб
- Не потребує дорогого обладнання

Необхідні матеріали:

- Фотоелектроколориметр
- Піпетки
- Натрію гідроксид, 10% розчин
- Реактив Несслера
- Вода дистильована

Етапи виконання:

1. Підготовка калібрувальної кривої:

- Готують стандартний розчин сульфату амонію, 1 мл якого містить 0,1 мкг азоту.
- З стандартного розчину готують серію розчинів з різними концентраціями азоту (0,1-0,6 мг/%).
- До кожного розчину додають реактив Несслера і вимірюють оптичну густину при 440 нм.
- Будують калібрувальну криву, залежність оптичної густини від концентрації азоту.

2. Проведення аналізу:

- Відбирають пробу досліджуваного матеріалу.
- Проводять мінералізацію проби за допомогою сірчаної кислоти.
- Отриманий мінералізація розбавляють дистильованою водою.
- Відбирають розчин і додають до нього реактив Несслера.
- Вимірюють оптичну густину при 400 нм.
- За калібрувальною кривою визначають концентрацію азоту в пробі.

3. Розрахунок:

Масу загального азоту (X) у відсотках обчислюють за формулою:

$$X = (m \times 100 \times 10) / (V \times V_1 \times 1000)$$

де:

- m - маса азоту, визначена за стандартною кривою, мг /%
- 100 - коефіцієнт перерахунку для першого розведення;
- 10 - коефіцієнт перерахунку для другого розведення;
- V - обсяг гідролізату, який використовується для визначення, см³
- V₁ - обсяг 1-го розведення, який використовується для реакції, см³
- 1000 - коефіцієнт перерахунку в грам-відсотки

РОЗДІЛ 9. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ

9.1 Аналіз технологічної схеми виробництва цільового продукту на місцяемісії твердих, рідких та газоподібних відходів

Технологія отримання вакцини проти гонококової інфекції включає кілька етапів, починаючи з доперментаційних процесів, таких як санітарна підготовка виробництва, підготовка поживного середовища та ферментаційні процеси, і закінчуючи післяферментаційними операціями, такими як інактивація клітин та центрифугування.

Санітарна підготовка виробництва є критичним етапом, включаючи щоденне миття та генеральне прибирання. Для цього використовуються мийні та дезінфікуючі засоби, такі як "Септомакс" та " Фамідез® СІР АІ 511 ". Відпрацьовані розчини цих засобів піддаються переробці та утилізації.

Приготування та стерилізація поживного середовища може вимагати уваги до якості сировини та правильної обробки. Несправність у цих процесах може призвести до неякісного поживного середовища, яке слід відбракувати та утилізувати.

На цьому етапі також утворюються тверді та рідкі відходи, які переважно складаються з упаковочних матеріалів та відбракованого поживного середовища. Це може стати джерелом емісії твердих та невеликих об'ємів рідких відходів.

Процес отримання вакцини проти гонококової інфекції включає кілька важливих етапів, починаючи з підготовки посівного матеріалу та закінчуючи розливом в ампули.

Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	НУХТ БТЕК 04.03.39 КР ПЗ			
Розробив		Науменко Д.В			РОЗДІЛ 9	Літ.	Арк.	Фркуше
Перевір.		Ключка Л.В					64	72
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд		Стабніков ВП						

Підготовка посівного матеріалу включає масштабування штаму продуцента та вирощування його в колбах на качалці. Після отримання посівного матеріалу він готується для засіву виробничого ферментера. Відходи на цьому етапі не розглядаються.

Виробничий біосинтез полягає у вирощуванні культуральної рідини з цільовим продуктом - біомасою клітин штаму продуцента *Neisseria gonorrhoeae* CDC-F62. Культуральна рідина подається на наступний етап інактивації бактеріальних клітин. Рідкі відходи з цього етапу також не враховуються.

Після ферментації, при якій потрібна аерація, відпрацьоване повітря фільтрується перед виходом з ферментера, щоб уникнути потрапляння патогенних мікроорганізмів у приміщення лабораторії.

Етап центрифугування передбачає відділення інактивованих клітин від культуральної рідини. Осаджені клітини передаються на наступний етап, а супернатант культуральної рідини розглядається як відходи, що потребують утилізації.

Інактивація клітин проводиться термічно з використанням ін'єкційної води. Відходи цього етапу також відносяться до класу небезпеки і потребують утилізації.

На етапі стандартизації інактивованих клітин додаються розчини натрію хлориду та фенолу. Залишки вакцини утворені на цьому етапі відносяться до медичних відходів та потребують спеціальної утилізації.

Готова вакцина розливається в ампули об'ємом 1 мл, а залишки також відносяться до медичних відходів та потребують утилізації.

9.2 Перспективи впровадження системи екологізації виробництва

9.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів

Зважаючи на невеликі об'єми рідких відходів на цьому виробництві, необхідності зменшення їх об'ємів немає. Відпрацьовані робочі розчини мийно-дезінфікуючих засобів після нейтралізації активного хлору тіосульфатом натрію зливаються до каналізаційної системи.

Партії засобів з вичерпаним терміном придатності або не кондиційні після порушення умов зберігання повертаються на підприємство-виробник для переробки.

Супернатант культуральної рідини та залишки суспензії після інактивації становлять основні рідкі відходи виробництва гонококової вакцини. Вони можуть містити живі клітини продуцента *Neisseria gonorrhoeae*, оскільки цей продуцент відноситься до патоген

них мікроорганізмів. Рідкі відходи цього етапу виробництва відносяться до медичних відходів класу Б і повинні бути утилізовані відповідно до встановлених норм.

Збір рідких відходів класу Б вимагає використання одноразових вологостійких контейнерів з герметичною кришкою для уникнення самовільного розливу. Після заповнення контейнера його кришку закриває відповідальний співробітник. Переміщення відходів класу Б у відкритих ємностях заборонено.

Рідкі відходи класу Б обов'язково підлягають дезінфекції. Метод знезараження вибирається залежно від можливостей організації, яка здійснює медичну або фармацевтичну діяльність. У разі відсутності централізованої системи знезараження відходів, персонал організації забезпечує знезараження хімічними або фізичними методами.

Рідкі відходи виробництва знезаражуються за допомогою спеціального обладнання, такого як автоклави. Після знезараження вони підлягають подальшій утилізації та зливаються до каналізаційної системи.

9.2.2. Система знешкодження та утилізації рідких відходів

На етапі санітарної підготовки виробництва та етапі приготування поживного середовища виникають тверді відходи, які складаються з двох основних складових:

1. Пакувальна тара мийно-дезінфікуючих засобів: Це включає в себе контейнери, пляшки, каністри або інші упаковки, які використовуються для зберігання та транспортування мийно-дезінфікуючих засобів, таких як мийні розчини та дезінфікуючі розчини.

2. Компоненти поживного середовища: Це складові речовини, які використовуються для приготування поживного середовища, необхідного для розвитку мікроорганізмів у виробництві. Це може включати в себе різні хімічні речовини, поживні речовини, солі та інші компоненти.

Отримані тверді відходи піддаються подальшій обробці, яка включає в себе сортування за видами матеріалів та переробку для подальшого використання або утилізації. Наприклад, пластикові контейнери можуть бути перероблені на вторинну сировину, а хімічні компоненти можуть підлягати спеціальній обробці або утилізації згідно з відповідними екологічними стандартами

9.2.1. Система знешкодження та утилізації готової продукції

У процесі виробництва, зберігання та застосування вакцин та імунобіологічних препаратів часто виникає необхідність у знищенні частини препарату, яка втратила свою придатність до використання. Це може статися з таких причин:

- Закінчення терміну придатності.
- Порухення "холодового ланцюга".
- Пошкодження ампул (флаконів).
- Невідоме або змазане маркування на ампулах (флаконах).
- Зміни у зовнішньому вигляді, не вказані у інструкції (наприклад, зміна кольору, текстури, або наявність чужорідних предметів).
- Відхилення в якості партій.

Згідно з правилами, вакцини, їх залишки та ампули класифікуються як медичні відходи класу Г. Для збору цих відходів використовуються одноразові вологостійкі контейнери. Після збору вони піддаються утилізації шляхом спалювання в спеціальних високотемпературних печах, що здійснюється спеціалізованими компаніями.

Перед тим як вивозити вакцини на утилізацію, необхідно скласти наряд-допуск, в якому зазначаються:

- Назва вакцини.
- Причина утилізації.

- Кількість доз препарату, номери серії, контрольний номер та термін придатності.

- Особи, відповідальні за утилізацію вакцин.

Транспортування вакцин до місця утилізації здійснюється в твердій тарі та на спеціально обладнаних автомобілях. Утилізація вакцин проводиться централізовано спеціалізованими організаціями, які мають сертифікат на утилізацію відходів класів Б і Г.

Основним методом утилізації вакцин є їх спалювання в високотемпературних печах. Для цього використовуються спеціальні установки блокового типу з повним циклом утилізації, що виключають процеси сортування та подрібнення для запобігання розповсюдженню патогенів.

Усі етапи утилізації вакцин документуються. Після спалювання вакцин складається акт, в який заносяться дані з наряд-допуску та визначається відповідальна за утилізацію комісія. Цей документ є важливим для обліку обороту вакцин і підтверджує, що препарат був утилізований.

Дезінфекція ампул

Тара для зберігання вакцин, яка включає ампули і флакони, піддається процедурі дезінфекції та стерилізації перед відправленням на переробку.

Першим етапом у процесі утилізації є подрібнення. Потім виконується процедура знезараження. Ампули, що містять вакцини, спочатку дезінфікуються за допомогою тривідсоткового розчину хлораміну або п'ятивідсоткового перекису водню. Після цього їх додатково знезаражують гарячим повітрям або парою.

Наприклад, можна використовувати різні методи стерилізації, такі як кип'ятіння при температурі 99°C протягом 30 хвилин, пар при 110°C протягом 20 хвилин, або гаряче повітря при температурі 120°C протягом 45 хвилин. Після знезараження скляна тара направляється на переробку.

9.2.3. Система знешкодження газоповітряних викидів

Фізичне видалення токсичних домішок з повітря шляхом простого фільтрування або осадження частинок не завжди є ефективним, особливо коли мова йде про важкі або розчинні речовини. У таких випадках застосовуються хімічні процеси, які дозволяють змінювати фізичні властивості токсичних речовин, щоб полегшити їх подальше уловлювання.

Одним із таких методів є абсорбція, коли токсичні гази або пари поглинаються поверхнею абсорбента, зазвичай рідиною або твердим матеріалом, що знаходиться у рідинній фазі. Інший метод - адсорбція, при якій токсичні речовини поглинаються поверхнею адсорбента, який може бути твердим матеріалом або пористою структурою.

Каталітична очистка використовує каталізатори для прискорення хімічних реакцій, що перетворюють токсичні речовини на менш небезпечні сполуки. Цей процес може відбуватися при високих температурах або без нагрівання, залежно від типу каталізатора та реакції.

Термічні процеси, такі як термічна деструкція або термічне окислення, використовуються для руйнування токсичних речовин шляхом підвищення їх температури до дуже високого рівня, що призводить до їх розкладання на менш небезпечні сполуки.

Всі ці методи дозволяють ефективно очищати повітря від небезпечних речовин, перетворюючи їх на менш токсичні або нешкідливі сполуки, що робить їх безпечними для довкілля та здоров'я людини.

9.2.4. Заходи щодо зменшення об'ємів відходів

Для зменшення обсягу використаних мийних розчинів пропонується їх дезінфекція та відновлення після миття обладнання для повторного використання. Ця мета досягається шляхом впровадження у технологічну схему обладнання кількох ступенів очищення, які проводять операції окремо та разом, підвищуючи ступінь

очищення стічних вод за допомогою вертикальних апаратів із використанням електрохімічних компонентів, які містяться у використаних мийних розчинах.

Щодо зменшення обсягів твердих відходів, застосування піролізу полімерних матеріалів дозволяє отримувати пористе активоване вугілля, яке має широке застосування у очищенні газових викидів, стічних вод, водопідготовці, а також у ролі носіїв каталізаторів та інших процесах.

Використанні джерела:

1. The history of vaccines. [Електронне подання]
<https://www.historyofvaccines.org>
2. Planning for a Gonococcal Vaccine: A Narrative Review of Vaccine Development and Public Health Implications
[Електронне подання] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10170965/>
3. Magnus Unemo, William M. Shafer. Antimicrobial Resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the 21st Century: Past, Evolution, and Future. *Clinical Microbiology Reviews*. 2014, p. 587–613.
4. Вакцина гонококкова. [Електронне подання] – Режим доступу:
<https://med.com.ua/articles/36/635.html>
5. Вакцина гонококкова іноктивована. [Електронне подання]
<https://tabletki.ua/Вакцина-гонококковая/24715/>
6. Вакцина гонококкова іноктивована. [Електронне подання]
<https://www.ckimm.com.ua/shop/vakciny/vakcina-gonokokkovaja-1ml-10/>
7. Т.П. Пирог, Ю.М. Пенчук. Технології мікробного синтезу лікарських засобів: метод. рекомендації до викон. курс. роботи для 114 студ. напрямку підготовки 6.051401 «Біотехнологія» ден. форми навч. – К.: НУХТ, 2014. – 60 с
8. O'Donnell JA, Gelone SP (2009). "Bacterial Cause of PID: *Gonorrhoeae*". *Pelvic Inflammatory Disease*. Infobase Publishing.
9. Characteristics of *N. gonorrhoeae* and Related Species of Human Origin. Електронний ресурс – Режим доступу: <https://www.cdc.gov/std/gonorrhea/lab/ngon.htm>
10. «Центр громадського здоров'я Міністерства охорони здоров'я України». Інфекції, що передаються статевим шляхом (ІПСШ). 2017
11. Дерматологія, венерологія: Посібник для студентів, магістрів вищих навчальних закладів / За загальною редакцією О. О. Сизон. — Львів: Каменяр, 2017. — 548 с. :іл. — ISBN 978-966-607-433-0
12. <https://www.genome.jp/kegg/>
13. <https://www.genome.jp/entry/gn:T00237>

14. Пирог Т.П. Біохімічні основи мікробного синтезу [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобувачів освітнього ступеня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» освітньо-професійної програми «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна»/ Т.П. Пирог, Л.В.Ключка. – К.: НУХТ, 2019.

15. Чебан Л.М. Загальна біотехнологія: навчально-методичний посібник. Модуль1. – Чернівці: Чернівецький нац.ун-т, 2017. – 116 с.

16. <https://bioengineering.kpi.ua/attachments/article/277/Глава%204.pdf>

17. Конспект лекцій з дисципліни «Асептика біотехнологічних виробництв» освітньо-професійної програми другого (магістерського) рівня вищої освіти зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» усіх форм навчання / Укл.: Головей О.П. , Гуляєв В.М. – Кам'янське, ДДТУ, 2017 р., 140 с.

18. Правила дій персоналу при приготуванні розчину дезінфекційного засобу: <https://interdez.com.ua/press/dezinficirujushhie-sredstva-pravila-prigotovleniya-rastvora.html>

19. Інструкція під час роботи з дезінфекційними хімічними засобами: <https://pro-op.com.ua/article/767-nstruktsya-pd-chas-roboti-z-deznfektsynimi-hmchnimi-zasobami>

20. ДЕЗІНФЕКЦІЯ ВИРОБІВ МЕДИЧНОГО ПРИЗНАЧЕННЯ: <https://interdez.com.ua/press/dezinfektsiya-izdelij-meditsinskogo-naznacheniya-sovety-po-vy-boru-preparatov.html>

21. Красінько В.О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв конспект лекцій для здобув. освіт. ступ. «бакалавр» спец. 162

22. Чебан Л.М. Загальна біотехнологія: навчально-методичний посібник. Модуль1. – Чернівці: Чернівецький нац.ун-т, 2017. – 116 с.