

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

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

«До захисту в ЕК»
Директор інституту(декан факультету)
Грегірчак Н.М.
(підпис) (прізвище та ініціали)

«До захисту допущено»
Завідувач кафедри
Пирог Т.П.
(підпис) (прізвище та ініціали)

«__» _____ 2021 р.

«__» _____ 2021 р.

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ МАГІСТРА**

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код та назва спеціальності)

освітньо-професійної програми «Фармацевтична біотехнологія»

на тему: Біотехнологічні особливості отримання протипухлинного ферментного препарату L-аспарагінази

Виконав: здобувач 2 курсу, групи 02

Хоменко Ігор Васильович
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник: Карлаш Юрій Васильович
(прізвище, ім'я та по батькові повністю) (підпис)

Консультанти _____
(прізвище та ініціали) (підпис)

_____ (прізвище та ініціали) (підпис)

_____ (прізвище та ініціали) (підпис)

Рецензент _____
(прізвище та ініціали) (підпис)

Засвідчую, що в цій кваліфікаційній роботі немає запозичень із праць інших авторів без відповідних посилань.

Здобувач _____
(підпис)

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь магістр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

Освітньо-професійна програма «Фармацевтична біотехнологія»

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

Пирог Т.П.

“ 28 ” жовтня 2020 року

ЗАВДАННЯ

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

Хоменка Ігоря Васильовича

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Біотехнологічні особливості отримання протипухлинного ферментного препарату L-аспарагінази

керівник роботи Карлаш Юрій Васильович, к.т.н., доцент

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від “26”жовтня 2020 року №868-кв

2. Строк подання здобувачем роботи _____

3. Вихідні дані до роботи Ферментер об'ємом 5 м³; продуцент *Streptomyces brollosae*; фермент аспарагіназа; активність фермента 162,11 од/мл.

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити).
Реферат; Вступ; Розділ 1. Основні продуценти ферменту; Розділ 2. Біотехнології отримання ферменту L-аспарагінази з використанням актиноміцетів, бактерій та грибів; Розділ 3. Оптимізація та масштабування процесів одержання L-аспарагінази; Розділ 4. Техніко-економічне обґрунтування випуску продукту мікробного синтезу; Розділ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми; Розділ 6. Специфікація обладнання; Розділ 7. Опис технологічної схеми; Розділ 8. Контроль виробництва; Список використаної літератури.

5. Перелік графічного матеріалу

Апаратурна схема; Технологічна схема.

РЕФЕРАТ

Представлено проект виробництва субстанції L-аспарагінази у вигляді сухого порошку культивуванням біологічного агента *Streptomyces brollosae* з активністю фермента 162,11 од/мл продукту. L-аспарагіназа застосовується у якості препарату для лікування лейкімії. Розрахована потужність його виробництва становить 2,69 м³ культуральної рідини.

Технологія виробництва субстанції складається з допоміжних робіт (приготування мийних засобів, підготовка аераційного повітря, приготування та стерилізація поживного середовища) та основних процесів (вирощування інокуляту в колбах на качалці, інокуляторах та посівному апараті, виробничого біосинтезу), що наведені в технологічній та апаратурній схемах.

Кваліфікаційний проект викладений на 121 стор. друкованого тексту, містить 15 таблиць, 3 рисунки і складається з вступу, восьми розділів, списку використаної літератури (120 джерел) та графічної частини (3 креслення формату А1).

Ключові слова: фермент, аспарагіаза, штам-продуцент, бактерія *Streptomyces brollosae*, біосинтез, біомаса.

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ.....	4
ВСТУП.....	6
РОЗДІЛ 1. ОСНОВНІ ПРОДУЦЕНТИ ФЕРМЕНТУ.....	8
РОЗДІЛ 2. БІОТЕХНОЛОГІЇ ОТРИМАННЯ ФЕРМЕНТУ L- АСПАРАГІНАЗИ З ВИКОРИСТАННЯМ АКТИНОМІЦЕТІВ, БАКТЕРІЙ ТА ГРИБІВ.....	20
РОЗДІЛ 3. ОТИМІЗАЦІЯ ТА МАСШТАБУВАННЯ ПРОЦЕСІВ ОДЕРЖАННЯ L-АСПАРАГІНАЗИ.....	32
РОЗДІЛ 4. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ ВИПУСКУ ПРОДУКТУ МІКРОБНОГО СИНТЕЗУ.....	42
РОЗДІЛ 5 ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	50
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ.....	70
РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	74
РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА.....	89
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	105

ВСТУП

У даному кваліфікаційному **проекті** пропонується використання штаму *Streptomyces brollosae* NEAE-115 для виробництва L-аспарагінази, яка являється ферментом, що надає змогу, за рахунок метаболічних перетворень, припиняти синтез білку у мутованих клітинах [1].

L-аспарагіназа у метаболічних перетвореннях каталізує гідроліз L-аспарагіну до L-аспарагінової кислоти і аміаку. Максимум інгібуючого ефекту припадає на постмітотичну фазу G1. Знижує рівень L-аспарагіну у пухлинних клітинах. У результаті введення амінокислота L-аспарагін, незамінна для пухлинних клітин, все більшою мірою розкладається до L-аспарагінової к-ти та аміаку [1].

Актуальність

Основне застосування даного ферменту віднайшли у медицині. Він виступає як компонент комбінованої антинеопластичної терапії лімфобластної лейкемії у дітей та дорослих, неходжкінської лімфоми у дітей. Тобто, даний фермент є компонентом курсу хіміотерапії лейкозу та лейкемії. Даний фермент вводиться на 2 етапі терапії (назва етапу: індукція ремісії, мета якого є проведення поліхіміотерапії). Курс даного етапу триває в середньому 4 тижні. В залежності від ступеня тяжкості хвороби та особливостей організму та віку обирається добове дозування та режим терапії, який виражається в часі інфузії аспарагінази внутрішньовенно. Середній час інфузії триває 1,5-2 години.

При курсі терапії 2 рази на тиждень дозування складає 100 - 400 Од/кг маси тіла в залежності від вікових категорій. При курсі терапії 7 днів на тиждень (щоденному) дозування складає 200 Од/кг. В залежності від перебігу хвороби повний курс хіміотерапії, що складається з 5 етапів можуть проводити повторно, однак не більше 2 разів на рік. Аспарагіназу

					НУХТ БТЕК 02.02.12 КР ПЗ			
Зм	Арк.	№ документа	Підпис	Дата	Вступ	Лім.	Арк.	Аркушів
Розробник		<i>Хоменко І.В.</i>					6	121
Перевір.		<i>Карлаш Ю.В.</i>						
Реценз.								
Н.контр								
Затверд.		<i>Пирог Т. П.</i>			Кафедра БТМ⁶			

застосовують лише на 2 етапі [2].

Новизна

Новизна дипломного проекту полягає у створенні вітчизняного виробництва L-аспарагінази при використанні промислового штаму *Streptomyces broollosae* NEAE-115, активність якої в культуральній рідині складає 162,11 Од /мл.

ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

РОЗДІЛ 1. ОСНОВНІ ПРОДУЦЕНТИ ФЕРМЕНТУ

Перші публікації, у яких є згадки про одержання ферменту аспаргінази були датовані 1950-1960 роками. Тоді повідомлялося, що основними продуцентами виступали бактерії-актиноміцети, бактерії та гриби [3].

Продуценти актиноміцети

Akansha Saxena у своїй публікації зазначає, що у дослідженні де було взято 240 піддослідних штамі стрептоміцетів з метою пошуку продуцента аспаргінази з мінімальними побічними продуктами лише 57 проявляли досить високу активність ферменту. Три продуцента, що мали найвищу активність ферменту були ідентифіковані, а їх здатність виробляти аспаргіназу детально протестована. За результатами дослідження було встановлено, що найбільш активні були ідентифіковані як *Streptomyces cyaneus* SAP 1287, CFS 1560, *S. exfoliates* CFS 1557 та *S. phaeochromogenes* GS 1573. Синтезована аспаргіназа була майже без домішок глутамінази, що свідчить про високу активність синтезу саме аспаргінази. Найвища активність ферменту досягала значення 19,2 од/мл [4].

Rajesh Kumar Munaguanti досліджував можливість одержання аспаргінази при оптимізованих умовах культивування зі значеннями рН =7, температура 30 °С, з використанням продуцента *Arthrobacter kerguelensis* VL-RK_09, на середовищі з ксилозою та дріжджовим екстрактом. Також дослідження включало оптимізацію вмісту ксилози та дріжджового екстракту у культуральній рідині. Було визначено, що максимальна активність ферменту досягається на 72 годину культивування і становить 4,3 Од/мл. Після оптимізації вмісту ксилози та дріжджового екстракту активність зростала до 6,5 Од/мл [5].

					НУХТ БТЕК 02.02.12 КР ПЗ			
Зм	Арк.	№ документа	Підпис	Дата	<i>Розділ 1. Основні продуценти</i>	Літ.	Арк.	Аркушів
Розробник		<i>Хоменко І.В.</i>					8	121
Перевір.		<i>Карлаш Ю.В.</i>						
Реценз.								
Н.КОНТР								
Затверд.		<i>Пирог Т. П.</i>			Кафедра БТМ⁸			

Актиноміцети з наземних та морських екосистем уже давно визнані як «організми академічної цікавості» та «організми виробників антибіотиків». L-глутаміназа – фермент, що продукується різними мікроорганізмами, які в даний час використовуються для лікування лейкемії, оскільки подібний за механізмом дії та також може гідролізувати аспарагін.

R. Balagurunathan з співавторами досліджував можливість біосинтезу глутамінази штамми актиноміцетів, використовуючи середовище з глутаміном. Всі досліджувані 20 штамів актиноміцетів були морфологічно ідентифіковані як стрептоміцети. Фермент L-глутамінази отримували з всіх 20 штамів актиноміцетів методом зануреної ферментації та випробувані за допомогою кількісного аналізу. Умови культивування для біосинтезу глутамінази були наступними: рН 7, температурі 30 °С, вміст хлориду натрію 3,5%. За результатами досліджень були зроблені наступні висновки: штам з найвищою активністю - *Streptomyces olivochromogenes* P2. Активність перевіряли методом дифузії в агар, що показала найвищий результат у 45 мм зміни кольору тест-середовища [6].

Palaniappan Sivasankar зі співавторами досліджували 10 актинобактеріальних ізолятів, які виявляли значну антибактеріальну активність. Ці штамми були ідентифіковані на основі фенотипових та хемотаксономічних характеристик та перевірені на наявність l-аспарагінази. Під час процесу скринінгу *Streptomyces sp.* SS7 показав велику рожеву кольорову зону (10 мм) навколо колонії. Штам було додатково вивчено для виробництва l-аспарагінази. Умовами культивування для l-аспарагінази були рН 8,5, температура 40 °С, мальтоза та соєвий шрот у якості субстратів. За результатами дослідження активності ферменту було показано, що *Streptomyces sp.* має активність ферменту у 14,5 од/мг. Ці результати вказують на те, що *Streptomyces sp.* SS7 має потенціал для виробництва l-аспарагінази з дешевого джерела вуглецю [7].

Balakrishnan Meena досліджував можливість синтезу нових позаклітинних глутаміназ, зокрема L-аспарагінази у продуцента

Nocardiosis alba NIOT-VKMA08. За результатами було з'ясовано, що найбільш ефективно аспаргіназа синтезується при комбінації аспарагіну та мальтози (1,5%), що супроводжувалося збільшенням активності - 18,47 Од/мл. Часткової активності глютамінази не виявлено, що може стверджувати про високу чистоту ферменту та відсутність побічних реакцій при терапії раку даним ферментом [8].

Метою дослідження Musha Kiranmaiї був проведений скринінг актиноміцетів з мангрових дерев, які є гарними продуцентами L-аспарагінази. Всього було виділено 31 штам актиноміцетів, з яких 6 штамів були позитивними щодо продукування L-аспарагінази. Для оптимізації біосинтезу L-аспарагінази було оптимізовано кілька фізико-хімічних параметрів культивування найбільш продуктивного штаму, ідентифікованого як *Pseudonocardia endophytica* VUK-10. Виробництво L-аспарагінази штамом продуцента здійснювалося у середовищі з глюкозою, мальтозою, аспарагіном. За результатами дослідження максимальна активність ферменту становила 3,96 Од/мл при використанні глюкози - 6,99 Од/мл, мальтози і аспарагіну - 7,42 Од/мл. Це перша публікація стосовно використання *Pseudonocardia endophytica* VUK-10 в якості продуцента L-аспарагінази [9].

М. Mohamed Mahroop Raja і колеги виділяли штами актиноміцетів та оцінювали їх перспективність по продуктивності синтезу аспаргінази на поживному середовищі з глюкозою, крохмалем або лактозою. Серед 10 виділених ізолятів шість належали до роду *Streptomyces*, три належали до *Micromonospora*, один - *Micropolyspora*. За результатами дослідження на активність аспаргінази були зроблені наступні висновки: *Streptomyces sp* та *Micromonospora sp* демонстрували велике рожеве забарвлення на тест-середовищі для визначення наявності L-аспарагінази. Максимальний синтез ферменту 1,4 мМ спостерігався у штамів *Micromonospora sp*, *Streptomyces sp* на рівні 1,4 мМ на середовищі з глюкозою, 1.12 мМ на середовищі з крохмалем та 1,17 мМ на середовищі з лактозою [10].

Синтез аспаргінази представниками інших родів бактерій

Thenmozhi C. зі співавторами проводив роботу по виділенню морських бактерій - продуцентів аспаргінази та оптимізував поживне середовище, з метою максимального ефекту синтезу L-аспарагінази бактеріального штаму за найвищою активністю аспаргінази. За результатами дослідження найбільш ефективний, стосовно активності аспаргінази, мікроорганізм з виділених був *Bacillus cereus*. Оптимізації підлягали в основному концентрації аспаргіну, соєвого шроту та деревної стружки в основі поживного середовища для культивування. Максимальна активність L-аспарагінази у 51,54 Од/мл становила на середовищі, що містить соєвий шрот у кількості 6,2828 г/л, аспаргін у кількості 5,5 г / л, деревну стружку у кількості 1,338 8 г/л [11].

Richi V. з колегами досліджували синтезований фермент *Bacillus licheniformis* - аспаргіназу на можливість зменшення утворення акриламідів при смаженні та запіканні продуктів. Виробництво ферменту аспаргінази з використанням *Bacillus licheniformis* RAM-8 було оптимізовано за допомогою використання підходу статистичного моделювання. Виробництво здійснювалося в 30-літровому біореакторі. За результатами дослідження досягнуто максимальної активності у 32,26 Од/мл. L-аспарагіназа виявляла глютаміназну активність лише у кількості 0,8 Од/мл і тому була б менш схильною викликати побічні ефекти, пов'язані з терапією аспарагіназою. При культивуванні продуцента в ферментері було отримано 29,94 Од/мл ферменту за 15 год. Фермент інгібував утворення поліакриламідів в 10% розчині акриламідів, це зменшило утворення акриламідів в смаженій картоплі на 80% [12].

У даній роботі описано виробництво та оптимізація L-аспарагінази за штамом *Bacillus sp.* Використання для штаму *Bacillus* KK2S4 мелених відходів кукурудзяної кукурудзи, як субстрату, для зменшення забруднення відходами наколишнього середовища. Скринінговано тридцять дев'ять бактеріальних ізолятів на їх продуктивність та L-аспарагіназу вміст білка. Тільки

Bacillus sp. KK2S4 був ідентифікований раніше і обраний як найбільш сильний ізолят. Модифіковане середовище з меленими кукурудзяними відходами (без глюкози) використовували в якості продуктивного середовища виробництва ферменту. За результатами дослідження найвища продукція ферменту була виявлена при рН 5,0 у присутності лактози та NaNO_3 як джерела вуглецю та азоту, активність у порівнянні з іншими джерелами збільшувалася до 566,7 % відповідно [13].

Vidhya Moorthy зі співавторами досліджувала ізоляти представників роду *Bacillus* на продуцентів L-аспарагінази за допомогою фенольного червоного індикатора. Було обрано середовище росту та мікроорганізм, що провукує найбільшу зону гідролізу. Ізолят, над яким провели біохімічні тести, дав результати, а саме мікроорганізм належить до *Bacillus sp.* Накопичення ферменту було здійснено глибинною ферментацією. Були використані два різних джерела вуглецю, глюкоза та мальтоза. За результатами дослідження було встановлено, що найбільш ефективним субстратом виступає глюкоза, фермент виявляв максимальну активність при рН 7 та температури 37 °С. Було виявлено, що фермент був залежним від іонів магнію та інгібувався ЕДТА. Молекулярну масу білка-ферменту встановлювали за допомогою SDS-PAGE, та було показано що він має масу - 45 кДа [14].

У дослідженні Sarita Devi та співавторів було описано одержання L-аспарагінази та дослідження її властивостей, зокрема її структуру, активність, тощо. Одержували аспаргіназу культивуванням *Erwinia carotovora* МТСС 1428. Культивування з метою одержання ферменту здійснювали на середовищі з глюкозою. Після ферментації фермент очищали і використовуючи ультразвукову обробку клітин та екстракцію. За результатами дослідження була встановлена специфічна активність очищеного ферменту, що становила 0,37 Од/мг, а результати електрофорезу свідчать про те, що L-аспарагіназа *E. carotovora* МТСС 1428 існує у вигляді димерів. Більше того, очищена L-аспарагіназа від *E. carotovora* МТСС 1428 не володіє активністю глютамінази. L-аспарагіназа одержана з *E.*

carotovora MTCC 1428 мала меншу токсичність *in vitro* при дослідженнях на клітинних лініях Hep-2C (виживання 84%) порівняно з комерційним препаратом L-аспарагінази (90% виживання), отриманого з *E. coli* [15].

У цій роботі Seyedeh Laleh Dashtban Kenari, розглядаються дослідження, проведені для оптимальної продукції ферменту l-аспарагінази (l-аспарагіну мідогідролаза, EC 3.5.1.1) від *Escherichia coli* ATCC 11303. Було встановлено, що щеплення віком 18 год та розміром прищепи 10% були найбільш сприятливими умовами експлуатації ферменту. Лактоза, дріжджовий екстракт і K_2HPO_4 були визнані найкращими джерелами вуглецю, азоту та іонів відповідно. Статистичний метод був використаний для обстеження, наскільки різні середні умови впливають на виробництво ферментів. За методологією поверхні відповіді значення лактози, триптон, Для отримання максимальної активності ферменту досліджували дріжджовий екстракт, концентрацію K_2HPO_4 та l-аспарагіну. Найвища активність ферменту - $1,03 \text{ мкм}^{-1}$ ферменту, визначалася за таких умов: 1,08% лактози, 1,79% триптон, 1,6% дріжджового екстракту, 2% K_2HPO_4 та 0,19% l-аспарагіну. Методика поверхневої реакції виявила потужний інструмент для оптимізації середовища за цим методом, більш ніж у 10 разів (від 0,1 до 1,03 од/мл активність l-аспарагінази була досягнута порівняно з отриманою в базальній середовищі (Luria – Bertani media, час щеплення 24 години та розмір прищепи 10%) [16].

Renuka D Joshi, Nikhilesh S Kulkarni здійснювали вибірку штамів здатних до синтезу аспаргінази. Чисті культури досліджуваних ізольованих бактеріальних штамів виділяли з ендоефітів рослин. Штами були досліджені якісно та кількісно, використовуючи точкові щеплення та культивування відповідно для їх оптимальної здатності продукувати L-аспарагіназу. Із загальної кількості 25 різних ізолятів, 3 культури виділені з ендоефітів, а саме *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pseudomycoloides* & *Paenibacillus denitriformis* показали свою ефективність, що виражалась у ферментативній активності. Оптимізаційні дослідження стосувалися одержання максимально можливої

активності ферменту при рН 8.0 та температурі 40 °С, в присутності глюкози як найбільш підходящого джерела вуглецю, після інкубації 48 год. Концентрація субстрату виявила прямий пропорційний зв'язок з ферментативною активністю активність до 1% мас. Результати дослідження говорять про те, що бактеріальні ендofіти *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pseudomycooides* & *Paenibacillus denitriformis* можливо використовувати як промислові штами для виробництва L-аспарагінази [17].

Rajeswara Reddy Erva і колеги досліджували вплив умов культивування і складу субстратів на виробництво позаклітинних ферментів, зокрема аспаргінази за новим штамом *Enterobacter aerogenes* КСТС2190 / МТСС111. Присутні такі змінні, як рН, температура, час культивування, джерела вуглецю та азоту, концентрація індуктора та розмір прищепи. У цьому дослідженні найкраща ферментативна активність досягається традиційними методами, результат становив 7,6 МО/мл, що було в 2,6 рази більше порівняно з початковим значенням. Крім того, виробництво L-аспарагінази було оптимізовано за допомогою методології поверхневої реакції. Експериментальний результат при оптимізованні змінних технологічних процесів дав 18,35 МО/мл активності L-аспарагінази, що є в 2,4 рази вище, ніж традиційні параметри культивування. У дослідженні затвердили *E. aerogenes* МТСС111 як потужне та перспективне бактеріальне джерело для високого виходу протилейкемічного препарату [18].

Arastoo Badoei-Dalfard зі співавторами, у роботі з *Pseudomonasaeruginosa*, встановлювали пидбір найкращих параметрів для одержання кращого виходу продукції L-аспарагінази. Проводили експерименти з кількістю сої, часом інкубації. Результати становили такі данні : концентрації білка 5,566 мг/мл у 12,5 мл середовища, 450 л інокуляту при 60 год культивування [19].

Продуценти гриби

Gurunathan Baskar з колегами досліджували ефект L-аспарагіну та джерела азоту (пептон та дріжджовий екстракт) на синтез L-аспарагінази у *Aspergillus terreus* MTCC 1782 з метою отримання їх оптимальної концентрації при глибинному культивуванні. Також досліджували вплив різних джерел вуглецю (глюкози, фруктози, сахарози, досліджували лактозу та мальтозу) на посилення синтезу. А також ефект початкового рН, та температури ферментації, враховуючи також розмір інокуляту. За результатами дослідження було встановлено, що концентрації таких компонентів у поживному середовищі як L-аспарагін 1 %, дріжджовий екстракт 1%, пептон 0,6% і глюкоза 0,4% оптимальні у своїй концентрації для максимальної інтенсифікації синтезу продукту. Оптимальним початковим рН становить 6, а кількість інокуляту становить 1,5 %, температура культивування 35 C° [20].

Abeer A. El-Hadi, проводили статистичний експериментальний пакет робіт, що дозволяє з'ясувати найбільш ефективні фактори, що збільшують вихід L-аспарагінази у 4 досліджуваних штамів грибів. Усі чотири грибові штами, обстежені на активність L-аспарагінази, показали позитивний характер до методу швидкого аналізу пластин. Засоби, що використовуються, містили аспарагін з фенолом червоним, а після інкубації за рожевими зонами навколо спостерігалися колонії. *F. solani* був потенційним джерелом синтезу L-аспарагінази при високій специфічності субстрату. Змінене середовище Чапека II було найбільш підходящим для L-аспарагінази, виявляючи активність 121 Од/мл. Результат активності L-аспарагінази, відповідно, вимірювали після її одержання на середовищі наступного складу: (г/л): сахароза (1); L-аспарагін (0,5); K_2HPO_4 (0,75), MgSO_4 (0,7); H_2O (0,72); KCl (0,72); $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (11.7) при тривалості інкубації 8 днів. Концентрації ключових компонентів змінювали та фіксували найбільш ефективні значення концентарцій. Результати показали, що при використанні K_2HPO_4 (2,5 г/л), сахарози (4 г / л) і часу (8 днів) надавали найвищу активність ферменту[21].

Dani Benchamin у своєму дослідженні описав виробництво та характеристику L-аспарагінази від *Aspergillus fumigatus*, який був виділений з лікарської рослини *Annona muricata*. Цей грибний ізолят показав потенціал для отримання L-аспарагінази на модифікованому середовищі Чапека-Докса в оптимальних умовах. Було виявлено найвигідніші умови для найвищої продукції. Помічено, що максимум отримання L-аспарагінази при рН 8, 40 °С температури, 20 хвилин інкубаційного періоду. Наявність іонів Fe^{2+} підвищує продуктивність. Оптимальна концентрація субстрату 20мМ [22].

Lynette Lincoln зі співавторами досліджував властивості продукування L-аспарагінази мікроорганізмом *Trichoderma viridae*. Продукент був виділений з морського ґрунту з метою вивчення властивості ферменту. Максимальне вироблення ферменту відбулося на третій день при параметрах рН 6,5 і 37 °С, з додаванням 0,5% L-аспарагіну, 0,5% пептону і 0,6% мальтози. Фермент очищали до гомогенності зі специфічною активністю 78,2 Umg^{-1} . Молекулярна маса становить 99 ± 1 кДа. Мікроорганізм проявляв максимальну активність при рН 7,0 і 37 °С. Його інгібували такими іонами, як Fe^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} і Mn^{2+} , але індукований Mg^{2+} і Na^{+} N-етилемалеймід і фенілметилсульфонілфторид не змінили активність ферменту, однак відбулось сильне інгібування етилендіамінтетраацетатом. L-аспарагіназа виявила високу спорідненість до L-аспарагіну з K_m 2,56 мкМ. Тонкошарова хроматографія підтвердила гідроліз L-аспарагіну [23].

Kiran Babu зі співавторами досліджували ізольований штам *Aspergillus niger* C4, який при культивуванні на кунжутному (чорному) маслі у твердофазній основі в колонці біореактора. Головною завданням цього дослідження була оптимізація середовища культивування та умов отримання L-аспарагінази в біореакторі. Для того, щоб визначити вплив змінних процесів на вихід L-аспарагінази за способом реакції поверхні методології, експериментальний план складав проект Вох-Вейнкен за участю дизайнерської матриці з 15 стежок. Випробування до продукування L-аспарагінази йшли з трьома обраними змінними (аерація, товщина шару та

температура). Статистичні аналіз виявив максимум виходу L-аспарагінази при 310 Од/г на точці, де аерація, товщина шару та температура становили 0,44 об., 17,35 см і 29 - 31°C відповідно [24].

Завданням дослідної роботи проведеної Muhammad Anjum Ziaa та співавторами, було вивчення кінетичних параметрів продуктивності синтезу L-аспарагінази у *Aspergillus niger*. Оптимізація максимальної активності ферменту (2,83 Од/мл \pm 0,065) була досягнута з використанням кукурудзяної рідини як субстрату з 4% інокуляту, рН 6,5, 1% концентрації субстрату, 96 годинами часу бродіння 1% глюкози, яку використовували як додаткову добавку до ростової середовищі для отримання кращого виходу L-аспарагінази. Це дослідження показало, що концентрація глюкози понад 1% пригнічує ферментативну активність. З результатів можна зробити висновок, що виробництво L-аспарагінази можна оптимізувати при використанні дешевих агровідходів, як субстрат у низьких концентраціях та при кислих умовах. Стабільність в кислих умовах рН робить його ідеальним для застосування в системах охорони здоров'я та фармацевчній промисловості [25].

У дослідженні Luhana K. K. та співавторів робиться акцент на спробі з'ясувати оптимальні параметри культивування *Aspergillus niger* для одержання ферменту L-аспарагінази. Даний продуцент виробляє фермент майже одразу після четвертої доби культивування.. Оптимальна температура для синтезу ферменту - 37 °C та оптимальний рН 6. Всі ці дані говорять про те, що *Aspergillus niger* є гарним продуцентом ферменту, а також фермент має велику активність для використання в якості терапевтичного засобу [26].

Monica Thakur зі співавторами вивчали властивості специфічного виду грибка, що виробляє L-аспарагіназу. Грибок був виділений з місцевого ґрунту та ідентифікований як *Mucorhiemalis* на основі морфологічних та мікроскопічних характеристик. Вибраний модифікований склад середовища на основі середовища Чапека, містило 1% (мас.об.) L-аспарагіну в якості

джерела азоту та індуктора. Найкращі умови культури, відзначені після оптимізації були наступні: рН 7.0, 30 °С, 96 год, 1,25% L-аспарагінази та 0,4% глюкози. За результатами оптимізації було збільшено активність ферменту у 4,2 рази, спостерігалось збільшення позаклітинної секреції L-аспарагінази після оптимізації. Активність становила 69,43 Од/мг[27].

Порівняльна таблиця продуцентів ферменту L-аспарагінази

Таблиця 1.1

Продуцент	Джерело виділення	Назва продуцентів	Активність ферменту, Од/мл	Літературне джерело
<i>Актиноміценти</i>	Грунт	<i>Streptomyces cyaneus</i>	19,2	[4]
	Грунт	<i>Streptomyces sp.</i> SS7	14,5	[10]
	Ендофіт	<i>Pseudonocardia endophytica</i> VUK-10	3,96	[9]

<i>Бактерії</i>	-	<i>Escherichia coli</i> ATCC 11303	1,03	[16]
	-	<i>Enterobacter</i> <i>aerogenes</i> KCTC2190	18,35	[18]
	Ґрунту	<i>Bacillus</i> <i>licheniformis</i> RAM-8	29,4	[12]
<i>Гриби</i>	Ґрунт	<i>Aspergillus niger</i>	2,83	[25]
	Ґрунт	<i>Mucorhiemalis</i>	69,8	[27]

Отже, підсумовуючи розглянуті дослідження підводимо підсумки дослідницької роботи даного розділу. Дослідження про можливість продукування L-аспарагінази проводяться з 60 років минулого століття і до сьогодення. За цей час, було встановлено, що до промислового виробництва необхідного нам ферменту підходять найрізноманітніші мікроорганізми з багатьох осередків свого існування у навколишньому середовищі. Крім того, можливе їх генетичне модифікування задля оптимізації параметру кількості необхідного ферменту.

РОЗДІЛ 2. БІОТЕХНОЛОГІЇ ОТРИМАННЯ ФЕРМЕНТУ L-АСПАРАГІНАЗИ З ВИКОРИСТАННЯМ АКТИНОМІЦЕТІВ, БАКТЕРІЙ ТА ГРИБІВ

На сьогоднішній день, з часів появи L-аспарагінази на науковому поприщі, з'явилося доволі багато наукових та технологічних напрацювань щодо розвитку промислового виробництва даного фермента. За допомогою багатьох експериментів, вчені та технологи йдуть до мети створення оптимального методу виробництва L-аспарагінази. У цьому розділі представлені дослідницькі та випробувальні напрацювання вчених з багатьох наукових осередків всього світу.

Р. Балагурунган і колеги відібрали з ризосфери мангрових дерев прибережної зони Парангіпеттей зразки морського осаду. В якості поживного середовища для виділення мікроорганізмів було використано глютамінний агар із субстратом 1% L-глютамінази, 0,012% фенолу червоного та 3% NaCl. Було виділено 20 штамів актиноміцетів. Усі ідентифіковані як стрептоміцети і здатні виробляти L-глютаміназу. Найбільшу активність показав штам *Streptomyces olivochromogenes* P2, утворивши на поживному середовищі зони рожевого кольору розміром 38 мм. Також вчені визначили оптимальні умови для біосинтазу L-глютамінази: рН 7, температурі 30 °С і солоності 3,5% [28].

Р. В. Махаджан і колеги оптимізували виробництво L-аспарагінази штамом *Bacillus licheniformis* (RAM-8) шляхом статистичного моделювання. У ферментері об'ємом 30 л на середовищі Чапека-Докса за 24 год при 37 °С, швидкості переміщування 250 об/хв. За 15 год було досягнуто концентрації 29.94 IU/ml. Одержаний фермент інгібував утворення поліакриламід у 10% розчині акриламід і зменшило утворення акриламід у смаженій картоплі на 80% [29].

					НУХТ БТЕК 02.02.12 КР ПЗ			
Зм	Арк.	№ документа	Підпис	Дата	Розділ 2. Біотехнології отримання ферменту l-аспарагінази з використанням актиноміцетів, бактерій та грибів	Літ.	Арк.	Аркушів
Розробник		Хоменко І.В.					20	121
Перевір.		Карлаш Ю.В.				Кафедра БТМ²⁰		
Реценз.								
Н.контр								
Затверд.		Пирог Т. П.						

Раджесвара Редді Эрва і колеги оптимізували виробництво L-аспарагінази штамом *Enterobacter aerogenes* КСТС2190. Вчені здійснювали оптимізацію за такими параметрами: час, рівень рН, джерела азоту і вуглецю, кількість інокуляту. Найбільша концентрація фермента була досягнута на середовищі Лурія-Бертрані при 30°C, 200 об/хв за 54 год. На 30 годині культивування була отримана активність 18,35 IU/мл [30].

Сейед Лалех Даштбан Кенари, Іран Алемзаде и Вида Магсодіоптимізували біосинтез ферменту L-аспарагінази штамом *Escherichia coli* (АТСС 11303). Статистичним методом було встановлено, що оптимальний вік і розмір інокуляту - 18 і 10%. Найкращими джерелами вуглецю і азоту було визнано Лактозу і дріжджовий екстракт відповідно. За методологією поверхні відповіді значення лактози, триптон, Для отримання максимальної активності ферменту досліджували дріжджовий екстракт, концентрацію K_2HPO_4 та L-аспарагіну. Найвища ферментна активність, спостерігалась за таких умов: 1,08% лактози, 1,79% триптон, 1,6% дріжджового екстракту, 2% K_2HPO_4 та 0,19% L-аспарагіну[31].

Ясір Мостафа виділив з морського осаду штам *Bacillus velezensis* і визначив оптимальні умови біосинтезу L-аспарагінази. Найбільшу продуктивність показали іммобілізовані клітини іммобілізованими клітинами (вище 61,04%) за таких умов: 72 год, рН 6,5, 37 ° C, 100 об/хв. Джерелами вуглецю та азоту - глюкоза та NH_4Cl , відповідно [32].

А. Д. Шах, Р.В. Каради і П.П. Парех використовуючи середовище ISP-5 виділили коліформнібактерії із зразків води, які були зібрані з різних місць Бельгії. Серед 12 ізолятів штаму AS-2 один виявив здатність синтезувати L-аспарагіназу. Дослідники визначили найефективніші джерела вуглецю та азоту і їх оптимальну концентрацію: глюкоза (1,0%) і дріжджовий екстракт (1,5%) демонстрували максимальну продукцію L-аспарагінази. Також було оптимізовано параметри культивування: рН 8; 37 °C та 26 год [33].

М. Хімаваті та колеги дослідили оптимальні для біосинтезу L-аспарагінази штаммом *Bacillus scirculans* джерела вуглецю і азоту: лактоза,

галактоза, крохмаль, сахароза, мальтоза, арабіноза та серед джерел азоту; пролін, триптон, глутамат натрію, крутий кукурудзяний лікер, екстракт яловичини, хлорид амонію, екстракт дріжджів дають від 105 до 164 Од/мл. Найбільшу продуктивність *B. circulans* показав при використанні глюкози, маннози, хлориду амонію та сульфату амонію [34].

Арасту Бадоей-Далфард, Захра Карамі і Наржес Рамезані використали статистичні методи для оптимізації параметрів біосинтезу L-аспарагінази штамом *Pseudomonas aeruginosa*. Максимальної активності L-аспарагінази (785 Од/мл) синтезованої штамом *P. aeruginosa* вчені досягли на поживному середовищі, що містить L-аспарагін (0,5%), глюкозу (0,2%), NaCl (0,045%) та K_2HPO_4 (0,045%)[35].

Гурунатан Баскар і Сахадеван Ренганатан дослідили ефект L-аспарагіну, різних джерел вуглецю та азоту на біосинтез L-аспарагінази *Aspergillus terreus* MTCC 1782 при глибинному культивуванні. Оптимальним визначили поживне середовище такого складу: L-аспарагін 1%, дріжджовий екстракт 1%, пептон 0,6% і глюкоза 0,4% були рН 6, розміром інокуляту 1,5%. Оптимальна температура - 35 °С, оптимальна швидкість перемішування - 160 об/хв. За даних умов активність L-аспарагінази становить 24,10 Од/мл [36].

Абір А. Эль-Хаді та колеги тестували синтез L-аспарагінази штамми *Aspergillus rubber*, *Aspergillus terreus*, *Epico niger*, *Penicillium cyclopium* та *F. solani*. Тестування проводилось шляхом додавання у середовище Чапека-Докса фенолового червоного. Найбільшу ефективність показав штам *F. solani*. Для підвищення біосинтезу L-аспарагінази даним штамом дослідниками було оптимізовано склад поживного середовища. Вчені визначили, що основними факторами культивування є концентрація KH_2PO_4 , сахарози та час. (г/л): сахароза (1); L-аспарагін (0,5); Сахароза (4) KH_2PO_4 (2,5), $MgSO_4$ (0,7); H_2O (0,72); KCl (0,72); $(NH_4)_2SO_4$ (11.7). Час культивування – 8 днів [37].

Тенмоші Ц. і колеги дослідили вплив складу поживного середовища на біосинтез L-аспарагінази штамом *Bacillus cereus* MAB5. Застосувавши метод Плакетта-Бармена (метод планування експерименту) вчені визначили

оптимальні концентрації таких складових як дріжджовий екстракт, соєвий шрот, глюкоза, сульфат магнію, K_2HPO_4 , деревна стружка, аспаргін і хлорид натрію. Найбільшу ефективність біосинтезу L-аспарагінази (51,54 Од/мл) *Bacillus cereus* MAV5 виявив на поживному середовищі такого складу: соєвий шрот (6,2828 г/л), аспаргіну (5,5 г/л), деревної стружки (1,338 8 г/л) та NaCl (4,535 4 г/л) [38].

Кавіта А. та Віджаялакшмі М. виділили з латеритових ґрунтів регіону Гунтур штамм *Nocardia levis* МК-VL 113, здатний до біосинтезу L-аспарагінази та оптимізували умови культивування. Максимальна продуктивність L-аспарагінази були зафіксована за 72 год культивування на модифікованому середовищі ISP-5 з гліцеролом (2%) з дріжджовим екстрактом (1,5%) при рН 7,0 і температурі 30°C. Також дослідники визначили, що засоби, які руйнують клітини (наприклад, ЕДТА) підвищують кінцевий вихід L-аспарагінази [39].

Ноура Е., л-Ахмаді, Эль-Наггар виділили із зразків ґрунту, зібраних з Єгипту штам *Streptomyces olivaceus* NEAE-119, здатний продукувати L-аспарагіназу. Також вчені методом Плакетта-Бармена (метод планування експерименту) оптимізували такі параметри біосинтезу: температура, рН, інкубація час, розмір прищепи, вік прищепки, швидкість перемішування, декстроза, крохмаль, L-аспарагін, KNO_3 , екстракт дріжджів, K_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, NaCl і $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ [40].

Ноура Е., л-Ахмаді, Эль-Наггар і колеги використали метод Плакетта-Бармена (метод планування експерименту) для оптимізації виробництва L-аспарагінази штаммом *Streptomyces broliosae* NEAE-115. Оптимальний склад поживного середовища: декстроза - 2 г/л, крохмаль - 20 г/л, L-аспарагін 10 г/л, KNO_3 -1 г/л, K_2HPO_4 -1 г/л, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,5 г/л, NaCl - 0,1 г/л. Оптимальні умови культивування: рН 7, час - 7 днів, температура 30 ° С, розмір інокуляту 4%, об/об, швидкість перемішування 150 об/хв і час культивування інокуляту 48 год. При подальшому культивуванні у 7-літровому біореакторі вчені визначили, що продуктивність зростає при збільшенні швидкості

перемішування до 400 об/хв. За даних умов вдалось досягнути концентрації L-аспарагінази 162,11 Од/мл [41].

Б. Чінна Нарасая, В. Ліаватхі і колеги з університету Ачарья Нагарджуна, регіон Гунтур виділили з проби ґрунту десять штамів актиноміцетів. Виділені штами були культивовані на дріжджовому екстракті, солодному екстракті та агастрі декстрази, з подальшим визначення кількості ферментів. Також дослідники оптимізували умови для збільшення біосинтезу L-аспарагінази. Оптимізацію проводили за такими параметрами: рН, температура, концентрація джерел вуглецю і азоту шляхом культивування штаму CN-4 в модифікованому бульйоні ISP-5 протягом 96 год. Серед семи випробуваних джерел вуглецю лактоза виявилася найкращим джерелом вуглецю Екстракт дріжджів виявив посилення як росту, так і біосинтезу L-аспарагінази. Після того, як переважні джерела вуглецю та азоту були визначені як лактоза та дріжджовий екстракт, були зроблені зусилля для визначення їх відповідних концентрацій. При культивуванні в оптимізованих умовах, а саме лактозі концентрією 0,5% та дріжджовому екстракті концентрією 0,5% з 1% L-аспарагіні рН 7,0, температурі 30 °С протягом 96 год штаму *Streptomyces albus* CN-4 синтезував 11,5 Од/мг L-аспарагінази [42].

Ганешан Шакамбарі, Бабу М Суміта колеги ідентифікували взятий з морської води ізолят як *Pseudomonas plecoglossicida* RS1. Вчені оптимізували умови культивування даного штаму методом статистичного моделювання. Використовуючи в якості субстрату цукрову тростину. Активність L-аспарагінази збільшилась при використанні середовища M-9 що містить 0,8% стічних вод ($3,25 \pm 0,12$ МО/мл), ніж середовище M-9, що містить 0,3% L-аспарагіну 15 ($0,73 \pm 0,08$ МО/мл). Максимальна активність одержаної L-аспарагінази становить $8,9 \pm 0,81$ МО/мл при рН 8,5 і температурі 55 °С. [43].

Крутхі Дорія, Деварай Сантош Кумар оптимізували біосинтез L-аспарагінази мікроорганізмом *Aspergillus sp.* використовуючи агропромислові залишки як твердий субстрат. На першому етапі оптимізації, максимальної активності L-аспарагінази досягли за допомогою суміші насіння бавовни (2/3),

пшеничних висівок (1/6) та лушпиння червоного граму (1/6). На наступному етапі оптимізації були визначені оптимальні рН, температура та вміст вологи. Після з використанням оптимізованої потрійної суміші, максимальна активність 12,57 Од/мл була отримана при температурі 35 ° С, рН-8 і вмісті вологи 70% (мас.об) за 6 днів ферментації. При культивуванні у біореакторі, активність L-аспарагінази становила 5,41 і 6,67 Од/мл у біореакторі з 500 г і 1000 г суміші субстрату відповідно [44].

Мохан Кумар, Раві Рамасамі, Х.К. Манонмані провели добування L-аспарагінази від *Cladosporium sp.* у твердофазному культивуванні (ССФ) з використанням агропромислових залишків. При використанні пшеничних висівок, рисових висівок та оладок, максимальний біосинтез L-аспарагінази спостерігався на пшеничних висівках. При часі культивування у 120 год за аеробних умов при вологості 58%, рН 5,8, температурі 30 °С вихід L-аспарагінази становив 3,74 Од/мл. Наявність ферменту Tween 20 посилювало вироблення ферментів у 1,3 рази [45].

Чанакья Паллем досліджував аспарагінази при твердофазному культивуванні *Fusarium oxysporum* на поживному середовищі, яке містить кукурудзяне лушпиння. Дослідники оптимізували почаковий вмісту вологи, час ферментації, початкового рН та температуру ферментації, вплив додаткових джерел вуглецю та азоту на виробництво ферменту. За результатами, оптимальне середовище має таку характеристику : вміст вологи 65% (об.мас.), початковий рН 6,0, доповнений ксилозою 0,5% (мас. / мас.), сечовиною 1% (мас. / мас.), інкубується при 28 °С протягом 72 год. За даних умов максимальна активність ферменту становила 27,10 Од/ГД [46].

Рума, К. і Джордж, Тіхіт і Шанавас, Джіша з рослини *Withania somnifera* виділили різні види грибів для ефективного біосинтезу позаклітинної L-аспарагінази з використанням середовища Чапека-Докса. Штам *Fusarium solani* показав максимальний діаметр зони активності (2,7 см). Одночасно, максимальної активності 3,58 МО було досягнуто, використовуючи апельсинову шкірку як субстрат і при таких умовах: температура інкубації

35°C при рН 5 з калій-ді-фосфатом водню (0,25%), іонами магнію (0,002 %) і сахароза (1%) [47].

Г.С. Ісаак і М.А. Абу-Тахон дослідили двадцять чотири грибкові ізоляти на їх здатність виробляти L-аспарагіназу на модифікованому середовищі Докса-Чапека. Найпродуктивнішим штамом був обраний *Fusarium solani* AUMC 8615. Даний штам культивували методом твердофазної ферментації (SSF) з використанням агропромислових залишків. Найбільша продуктивність була досягнута на пшеничних висівках. Оптимальні умови для максимальної продукції L-аспарагінази при таких умовах: 30 °C, рН 8,0, 60% початкової вологості та добавки з 0,2% (мас./об.) глюкози та 0,5% (мас. v) сульфату амонію. Після інкубації протягом 2 годин при 37 ° C відносна активність вільного ферменту зменшується до 35%, тоді як для іммобілізованого ферменту знижується лише до 57% при 45 °C [48].

Хосамані Р. і Калівал Б.Б. дослідили ізоляти грибів з ризосферних ґрунтів обстежували на виробництво L-аспарагінази, використовуючи модифіковане середовище Докса-Чапека, що містить L-аспарагін та фенол червоний як індикатор. Штам *Fusarium equiseti* виділений з ґрунту ризосфери *Ipromoea muricata*, показав максимальний діаметр зони 1,05 см. Дослідники оптимізували параметри культивування при твердофазній ферментації. Максимальна активність (3,26 МО) була досягнута при використанні соєвого шроту з додаванням фосфату та марганцю з часом інкубації 48 годин та температурою інкубації при 45 °C та кислотності рН 7 з найкращим джерелом іону як найкращого джерела іонів фосфату та металів відповідно [49].

Нура Ель-Ахмади, Ель-Наггар і Хассан Моавад та колеги оптимізували умови твердофазного культивування *Streptomyces brollosae* NEAE-115 для біосинтезу L-аспарагінази. Методом Плакетта – Бірмана (метод планування експерименту) були оптимізовані такі змінні: час інкубації, вміст вологи, температура, рН, концентрація соєвого шроту, пшеничних висівків, декстрази, фруктози, L-аспарагіну, дріжджового екстракту, KNO_3 , K_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NaCl , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 . Максимальний вихід фермента було одержано

за таких умов: температура 30 °С, рН 7, склад середовища (г/л): соєвий шрот + пшеничні висівки, - 16; декстроза - 2; фруктоза - 2; L-аспарагін - 12; дріжджовий екстракт - 2; KNO₃ - 1; K₂HPO₄ - 2; MgSO₄·7H₂O - 0,1; NaCl - 0,1; FeSO₄ ·7H₂O - 0,02; CaCl₂ - 0,01). За оптимізованих умов кількість синтезованої L-аспарагінази *S. brollosae* NEAE-115 становила 47,665; 129,928 та 149,972 Од/г [50].

Порівняння продуцентів L-аспарагінази

Таблиця 2.1

Назва штаму	Середовище культивування	Умови культивування	Активність ферменту, Од/мл	Джерело
<i>Streptomyces olivochromogenes</i> P2	Глутамінний агар; субстрат 1% L-глутамінази; фенол червоний - 0,012%; 3% NaCl	30 °С; рН 7; солоність 3,5%	-	3
<i>Bacillus licheniformis</i> RAM-8	Середовище Чапека-Докса	24 год; 37 °С; 250 об/хв	29,94	4
<i>Enterobacter aerogenes</i> KCTC2190	Середовище Лурія-Бертрані	54 год; 30°С; 200 об/хв	18,35	5
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11303	Лактоза; дріжджовий екстракт	-	-	6
<i>Bacillus velezensis</i>	-	72 год; 37 °С; рН 6,5; 100 об/хв	-	7
Коліформні-бактерії AS-2	Середовище ISP-5	26 год; 37 °С; рН 8;	-	8
<i>Bacillus circulans</i>	Лактоза; галактоза; крохмаль; сахароза; мальтоза; арабіноза; пролін; триптон; глутамат натрію; кукурудзяний лікер; екстракт яловичини; хлорид амонію; екстракт дріжджів	-	105 - 164	9
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	L-аспарагін -0,5%; глюкоза - 0,2%; NaCl - 0,045%; K ₂ HPO ₄ - 0,045%	-	785	10
<i>Aspergillus terreus</i> MTCC 1782	Аспарагін - 1%; дріжджовий екстракт - 1%; пептон - 0,6%; глюкоза - 0,4%	35 °С; рН 6; 160 об/хв	24,10	11

Продовження таблиці 2.1

<i>Fusarium solani</i>	Сахароза - 4 г/л; (NH ₄) ₂ SO ₄ -11.7 г/л; KH ₂ PO ₄ - 2,5 г/л; MgSO ₄ -0,7 г/л; KCl - 0,72 г/л; L-аспарагін - 0,5 г/л	192 год	-	12
<i>Bacillus cereus</i> MAB5	Соевий шрот - 6,2828 г/л; аспарагін - 5,5 г/л; NaCl - 4,535 4 г/л; деревна стружка - 1,3388 г/л	-	51,54	13
<i>Nocardia levis</i> МК-VL 113	Середовище ISP-5; гліцерол - 2%; дріжджевий екстракт - 1.5%	72 год; 30 °С; рН 7.0	-	14
<i>Streptomyces olivaceus</i> NEAE-119	Декстроза; крохмаль; L-аспарагін; екстракт дріжджів; KNO ₃ ; K ₂ HPO ₄ ; MgSO ₄ · 7H ₂ O; NaCl; FeSO ₄ · 7H ₂ O	-	-	15
<i>Streptomyces brollosae</i> NEAE-115	Крохмаль - 20 г; L-аспарагін - 10 г; декстроза - 2 г; KNO ₃ - 1 г; K ₂ HPO ₄ - 1 г; MgSO ₄ · 7H ₂ O - 0,5 г; NaCl - 0,1 г	168 год; 30 °С; 150 - 400 об/хв	162,11	16
<i>Streptomyces albus</i> CN-4	L-аспарагін - 1%; лактоза - 0,5%; дріжджовий екстракт - 0,5%	96 год; 30 °С; рН 7.0	11.5 од/мл	17
<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> RS1	Середовище М-9	55 °С; рН 8.5	3,25	18
<i>Aspergillus sp.</i>	Суміші насіння бавовни (2/3); пшеничних висівок (1/6); лушпиння червоного граму (1/6)	144 год; 35 °С; рН 8; вміст вологи 70%	12,57	19
<i>Cladosporium sp.</i>	Пшеничні висівки	120 год; 30 °С; рН 5.8; вміст вологи 58%	3,74	20

<i>Fusarium oxysporum</i>	Кукурудзяне лушпиння	72 год; 28 °С; рН 6.0; вміст вологи 65%	27,10	21
<i>Fusarium solani</i>	Апельсинова шкірка; сахароза - 1%; HPO ₄ ²⁻ - 0,25%; Mg ²⁺ - 0.002%;	35 °С; рН 5.0	3,58	22
<i>Fusarium solani</i> AUMC 8615	Пшеничні висівки; (NH ₄) ₂ SO ₄ - 0.5%; глюкоза – 0.2%	30 °С; рН 8.0; вміст вологи 60%	-	23
<i>Fusarium equiseti</i>	Соевий шрот	48 год; 45 °С; рН 7.0	3,62	24
<i>Streptomyces brolllosae</i> NEAE-115	Суміш соєвого шроту і пшеничних висівок – 16 г/л; L-аспарагін – 12 г/л; декстроза – 2 г/л; фруктоза - 2 г/л; дріжджовий екстракт – 2 г/л; K ₂ HPO ₄ – 2 г/л; KNO ₃ – 1 г/л; MgSO ₄ 7H ₂ O - 0,1 г/л; NaCl - 0,1 г/л; FeSO ₄ 7H ₂ O - 0,02 г/л; CaCl ₂ - 0,01 г/л	30 °С; рН 7.0	149,972	25

Висновок: за допомогою данної таблиці, ми можемо підвести підсумок у тому, що продуцент *Streptomyces brolllosae* NEAE-115 має більш вагомий потенціал для продування L-аспарагінази у промислових масштабах, адже загальна активність ферменту складає 149,972 од/мл, що являє собою найкращий показник серед представлених продуцентів вцілому.

Отже, підсумовуючи розглянуті дослідження підводимо підсумки дослідницької роботи даного розділу. Безумовно, одним з вагомих факторів є те, що виробництво L-аспарагінази можна здійснювати не тільки на спеціалізованих багатоконпонентних середовищах, а і на відходах інших промислових представництв різних харчових галузей. Однак, фіксується доволі малий показник активності ферменту, що говорить про необхідність

надалі вивчати та покращувати технологію. Також, важливо зазначити, що виробництво L-аспарагінази можливо на різноманітних компонентах, що робить його універсальним у дослідницькій роботі, а параметри культивування можуть суттєво підвищити активність ферменту в цілому.

РОЗДІЛ 3. ОПТИМІЗАЦІЯ ТА МАСШТАБУВАННЯ ПРОЦЕСІВ

ОДЕРЖАННЯ L-АСПАРАГІНАЗИ

Абхінав Шривастава досліджував вплив різних параметрів на *Penicillium digitatum*. Було досліджено отримання позаклітинної L-аспарагінази з використання модифікованого середовища Чапека-Докса. Фермент очищали приблизно в 60,95 раз, а згодом кінетичним методом. Дослідження показало, що значення K_m ферменту становило 1 105 М. За результатами дослідження було встановлено оптимальний рН та температуру для одержання ферменту - 7,0 і 30 ° С відповідно. Подальші дослідження можуть бути використані для розробки виготовлення аспарагінази у промисловому масштабі [51].

У дослідженні Абрахама Аша, Баліги Паллаві йдеться мова про виробництво, очищення позаклітинної L-аспарагінази, виробленої *Fusarium sp.* та його вплив на клітинні лінії ЕАС, лімфоцити людини *in vitro*. Оцінка різних середовищ для оптимальної продукції ферменту надала позитивні результати. Було виявлено, що занурене бродіння в середовищі Чапека з L-аспарагіном як джерелом азоту дає кращий вихід продукту. Фермент очищали майже до однорідності шляхом осадження сульфату амонію, діалізу, фільтрації з гелем на колонці Sephadex G-100, целюлози DEAE стовпчик та SDS-PAGE. Фермент очищали 242,65 рази і виявили остаточну питому активність 2,9118 од/мл·мг білка з 1,5%. SDS PAGE очищеного ферменту показав, що фермент складається з 3 субодиниць молекулярної маси 79,4 КДа, 70,8 КДа, 44,7 КДа відповідно. Аналіз Lineweaver Burk показав значення $K_m = 443,98$ мМ і $V_{max} = 40$ МО. Фермент виявляв максимальну активність при рН 9 та інкубації при 37 ° С.

					НУХТ БТЕК 02.02.12 КР ПЗ			
Зм	Арк.	№ документа	Підпис	Дата	<i>Розділ 3. Оптимізація та масштабування процесів одержання l-авспарагінази</i>	Літ.	Арк.	Аркушів
Розробник		<i>Хоменко І.В.</i>					32	121
Перевір.		<i>Карлаш Ю.В.</i>						
Реценз.								
Н.контр								
Затверд.		<i>Пирог Т. П.</i>			Кафедра БТМ ³²			

Також L-аспарагіназа продемонструвала значну цитотоксичну дію на клітини карциноми *in vitro*. Ензим не викликав імуностимулюючої відповіді в лімфоцитах людини *in vitro* на відміну від більшості прокаріотичних аспарагіназ. Ці властивості аспарагінази *Fusarium* ідеально підходять для терапії раку [52].

У роботі Ноурі Ель-Ахмаді були досліджені актиноміцети, що продукують глюмінаміназу L-аспарагінази, який був виділений із зразків ґрунту, зібраних у Єгипті. Серед них була відібрана та ідентифікована потенційна культура, штам NEAE-119 на основі морфологічних, культурних, фізіологічних та біохімічних властивостей. Оптимізація різних параметрів було проведено з процесу отримання L-аспарагінази *Streptomyces olivaceus* NEAE-119. Було проведено експериментальну методологію проектування та поверхневої реакції Бурмана. П'ятнадцять змінних (температура, рН, інкубація час, розмір прищепи, вік прищепки, швидкість перемішування, декстроза, крохмаль, L-аспарагін, KNO_3 , дріжджовий екстракт, K_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NaCl і $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) проводили спостереження за допомогою експериментально оптимізованого середовища методом Плакетта-Бурмана (метод планування експеримента). Найбільш позитивні значущі незалежні змінні, що впливають на вироблення ферментів (температура, вік прищеплення та швидкість збудження), були додатково оптимізовані [53].

Мунаганті, Раджеш і колеги дослідили здатність штаму *A. kerguelensis* до біосинтезу L-аспарагінази на модифікованому агарі з вмістом аспарагіну та солей декстрази. Безклітинний бульйон (0,2 мл) поміщали з 0,8 мл 0,05 М трис- HCl і 1 мл 0,04 М L-аспарагіну і інкубували протягом 15 хв при 37°C. Максимальний вихід L-аспарагінази був зафіксований після 3 днів інкубації в бульйоні солей аспарагіну декстрази з рН 7,0 і температурою 30°C. За оптимізованих умов, біосинтез L-аспарагінази становив 6,5 МО за умов культивування на бульйоні солей аспарагіну і декстрази (початковий рН 7,0), доповненому 1,5% екстрактом дріжджів та 2% ксилозою, при температурі

30°C протягом 72 год. Це перший звіт про виробництво та оптимізацію L-аспарагінази за *A. kerguelensis* [54].

Виділи з морського ґрунту штаб *Trichoderma viridae* Pers: SF Grey, здатний до біосинтезу L-аспарагінази. Максимальної концентрації ферменту 78,2 Од/мг було досягнуто на третій день за рН 6,5 і 37°C, при 0,5%, на середовищі Чапека-Докса, доповненому 0,5% пептону і 0,6% мальтози [55].

Проект здійснювався для отримання максимального виходу L-аспарагінази з *Aspergillus niger* з використанням побічних продуктів агровідходів, при культивуванні методом глибинного культивування. Для підвищення концентрації L-аспарагінази вчені оптимізували такі параметри: рН (5-9), час культивування (24-120 годин), температура (20-40 °C), різні кількості інокуляту (2,5-10 мл/100 мл) та різні джерела вуглецю для виробництва ферменту L-аспарагінази. Після оптимізації умов культивування було досягнуто максимальної активності ферменту (2,83 од/мл±0,065), при використанні екстракту кукурудзи як субстрату з додаванням 1% глюкози, при рН 6,5, часом культивування 96 годин. Результати продемонстрували, що концентрація глюкози понад 1% пригнічує ферментативну активність [56].

Вчені дослідили вплив двох джерел азоту (L-аспарагін та натрієва селітра) при виробництві L-аспарагінази ендofітним *Fusarium* sp. R19. L-аспарагін є більш дорогим джерелом азоту, тоді як нітрат натрію є більш дешевою альтернативою. Результати виявили, що нітрат натрію, поступався L-аспарагіну в індукванні вироблення L-аспарагінази ізолятом *Fusarium* sp.R19. Додаток з 1,25% L-аспарагін давав більше L-аспарагінази (3,01 Од/мл), при цьому додавали нітрат натрію отримували значно нижчі рівні (0,65 Од / мл), виробництво L-аспарагінази з R19 було оптимальним із доповненням 1,25% L-аспарагіну, інкубують протягом 10 днів. Натрієва селітра, хоча це порівняно дешево, не була ефективнішою для індукції продукції L-аспарагінази [57].

У дослідженні Аїда М. Фараг проводила скринінг двадцяти штамів грибків які були виділені з морського середовища берегів Червоного моря

Єгипту. Скринінг проводили на можливість синтезу L-аспарагінази та інтенсифікацію синтезу. Було відібрано та визначено лише п'ять грибкових штамів родів *Аспергілл*, *Пеніцилл* і *Фузарій*. Найпотужнішим синтетиком був *Aspergillus terreus* котрий давав найвищу специфічну активність L-аспарагінази (4,81 Од/мг білка). Продукція найвищого ферменту активність спостерігалася на 5-й день, а оптимізовані параметри ферментації були рН 6,0, тем-температура 35 С. Вихід також був високим при використанні декстрази та аспарагіну (8,26 Од/мг білка) як джерела вуглецю та азоту. Умови культивування вивчалися за допомогою метода Плакетта – Бірмена (метод планування експеримента). Імобілізація штаму *A. terreus*, посилювала виробництво фермента у 1,33 рази порівняно зі звичайними вільними клітинами. Повторне використання адсорбованих клітин досягли максимальної активності щодо ферменту після трьох циклів (33,86 Од/мг білка) [58].

Ноура Ель-Ахмаді Ель-Наггар зі співавторами досліджувала *Streptomyces olivaceus* NEAE-119 та продукт для послідовності (1509 bp) був внесений у базу даних GenBank під номером приєднання KJ200342. Оптимізація різних параметрів процесу отримання продукції L-аспарагінази *Streptomyces olivaceus* NEAE-119 з використанням програмного забезпечення Plackett було проведено експериментальну методологію оптимізації.

Було взято п'ятнадцять змінних, серед яких (температура, рН, інкубація час, розмір посівного матеріалу, вік посівного матеріалу, швидкість перемішування, концентрації декстрази, крохмалю, L-аспарагіну, KNO_3 , дріжджового екстракту, K_2HPO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $NaCl$ і $FeSO_4 \cdot 7H_2O$) проводили оптимізацію за допомогою експериментального метода Плакетта-Бурмана. Найбільш позитивні значущі незалежні змінні, що впливають на вироблення ферментів (температура, вік посівного матеріалу та швидкість перемішування) [59].

Хеба А Ель-Рефай зі співавторами використовували гамма-опромінення на штамі пеніцилу для отримання мутантних клітин з високою

продуктивністю L-аспарагінази. Доза опромінення 4 кГр, клітини *P.cyclopium* давали L-аспарагіназу з активністю позаклітинного ферменту $210,8 \pm 3$ Од/мл та специфічною активністю $752,5 \pm 1,5$ Од/мг білка, що в 1,75 і 1,53 рази вище, ніж активність дикого штаму. Фермент був частково очищений осадженням ацетоном на 40–60%. L-аспарагіназу іммобілізували на Amberlite IR-120 іонним зв'язуванням. Ферменти проявляли максимальну активність при рН 8 і 40°C . Процес іммобілізації значно покращив термостабільність ферменту. Іммобілізований фермент залишався на 100% активним при температурі до 60°C , тоді як вільна аспарагіназа була менш толерантною до високих температур. Іммобілізований фермент був більш стабільним при рН 9,0 протягом 50 хв, зберігаючи 70% своєї відносної активності. Максимальна швидкість реакції (V_{\max}) та константа Міхаеліса-Ментена (K_m) вільної форми були істотно змінені після іммобілізації. Значення K_m для іммобілізованих L-аспарагіназ була приблизно в 1,3 рази вища, ніж у вільного ферменту. Іони K^+ , Ba_2^+ і Na^+ виявляли стимулюючу дію на активність ферментів з відсотками 110%, 109% та 106% відповідно [60].

Алапаті Кавіха, Мувва Віджаялакхсмі досліджували властивості та інтенсифікували біосинтез ферменту, L-аспарагіназа, продукований *Nocardia levis* МК-VL 113, виділеного з латеритових ґрунтів регіону Гунтур. Оптимізовано параметри, що впливають на виробництво штаму L-аспарагінази. Максимальну кількість L-аспарагінази реєстрували з 3-денної культури, вирощеної в модифікованому бульйоні солей аспарагіну-гліцерину з початковим рН 7,0 при температурі 30°C . Гліцерин (2%) та дріжджовий екстракт (1,5%) слугували хорошими джерелами вуглецю та азоту для виробництва L-аспарагінази відповідно. Засоби, що руйнують клітини, такі як EDTA, трохи підвищують продуктивність L-аспарагінази. Це перший патент про виробництво L-аспарагінази *N. levis* [61].

Хасамані Р. та Калівал Б.Б. у своєму дослідженні проводили аналіз грибка, що синтезує L-аспарагіназу з використанням специфічного середовища Чапека-Докса, що містить L-аспарагін і фенол червоний як

показник. Штам, виділений з ґрунту ризосфери *Ipomoea muricata*, показав максимальний діаметр зони 1,05. Аналіз послідовності рДНК 16-х років показав, що штам був найбільш тісно пов'язаний з *Fusarium equiseti*. Різні фізичні та хімічні параметри були оптимізовані при твердофазному культивуванні (SSF) для виробництва L-аспарагінази. Крім того, було помічено, що максимальна активність 3,26 МО була досягнута за рахунок використання соєвого шроту як субстрату, з періодом інкубації 48 год та температурою інкубації при 45 °С при рН 7 з ді калієвим воднем, фосфат і марганцем як найкраще джерело іонів фосфатів та металів відповідно [62].

Анджана К. Вала досліджувала L-аспарагіназу - фермент проти протипухлинної активності, що виробляється морськими штамом *Aspergillus niger*, який піддавали очищенню та характеристиці. Очищений фермент молекулярною масою ~ 90 кДа. Фермент зберігав активність у широкому діапазоні рН, тобто рН 4-10. Фермент був досить стабільним в діапазоні температур 20-40°C. Між 80 спостерігалось, що тритон X-100 підсилює активність L-аспарагінази, тоді як інгібування активності L-аспарагіназу за наявності важких металів. Значення для K_m виявилось рівним 0,8141 мМ, а V_{max} було 6,228 мкМ/мг/хв. Фермент виявляв помітну антипроліферативну активність проти різних тестованих ліній ракових клітин. Успішне виробництво (у 5-річному біореакторі) з використанням L-аспарагінази з горіхів як субстрат з низькими витратами [63].

Кіран Бабу Уппулурі зі співавторами досліджували виробництво L-аспарагінази при культивуванні *Aspergillus niger* C4 на кунжутному (чорному) маслі при твердофазному бродінні в колонці біореактора. Головним завданням цього дослідження є оптимізація умов отримання L-аспарагінази в колоні біореактора. Для того, щоб визначити вплив змінних процесів на вихід L-аспарагінази за способом створення математичної моделі, за участі матриці планування з 15 змінних. Результати були представлені поверхнями відгуку. Емпіричний та квадратичний методи підходили до відповідних експериментальних даних (BBD) до виходу L-аспарагінази з трьома обраними

змінними (аерація, товщина шару та температура). Статистичний аналізи виявив максимальний вихід L-аспарагінази при 310 Од/г білка у точці, де аерація, товщина шару та температура становили 0,44 об., 17,35 см і 29,31 ° С відповідно [64].

Крутхі Дорія зі співавторами досліджували L-аспарагіназу - це ключовий фермент, який деградує аспарагін, і цей аспект ферменту виявив домінуючу роль у хіміотерапевтичній та харчовій промисловості. Метою цього дослідження є послідовна оптимізація виробництва L-аспарагінази з щойно виділеної *Aspergillus sp.* з використанням агропромислових залишків як твердого субстрату. На першому етапі, завдяки симплексній центроїдній конструкції, максимальну активність L-аспарагінази спостерігали за допомогою потрійної суміші макухи з бавовняного насіння (2/3), пшеничних висівок (1/6) та лушпиння червоного граму (1/6). На наступному етапі вирощування такі параметри, як рН, температура та вміст вологи, були оптимізовані за допомогою програми Vox-Behnken. Після 6 днів культивування з використанням оптимізованої потрійної суміші, максимальна активність становила 12,57 Од/мл була отримана при температурі температура 35 ° С, рН-8 і вміст вологи 70% (об / мас). Оптимізовані межі далі були переведені в лабораторні масштаби. Біореактор і активність L-аспарагінази виявили 5,41 і 6,67 Од / мл у біореакторі з 500 г і 1000 г суміші субстрату відповідно. Виробництво L-аспарагінази збільшилось у 5 разів завдяки конструкції суміші і в 1,3 рази збільшення активності ферментів спостерігалось при Vox-Behnken. Присутні роботи означають важливість оптимізації в біопроекторній галузі для повного розуміння та оцінки ферменту [65].

Санджей Кумар досліджував ефект розчиненого кисню (DO) та рівня рН (контрольований/неконтрольований) та був першим, що вивчав для підвищення продуктування нової L-аспарагінази, що не містить глютамінази синтезованим *Pectobacterium carotovorum* МТСС 1428 у пакетному біореакторі. Встановлено, що показник концентрації кисню становить 20%.

Виявлено, що виробництво L-аспарагінази було максимальним коли рН середовища підтримувався на рівні 8,5 після 12 год культивування. При цих умовах *P. carotovorum* виробляється 17,97 Од/мл L-аспарагінази, що відповідає продуктивність 1497,50 Од/л/год. Виробництво L-аспарагінази вивчали в біореакторі шляхом живлення L-аспарагіну (основного субстрату для виробництва) та / або глюкоза (джерело вуглецю для зростання) наприкінці періоду реакції 12 год. Початкове середовище, що містить і L-аспарагін, і глюкозу в режимі партії, і L-аспарагін в кращим поєднанням для посиленого виробництва було визнано, що живильний потік L-аспарагінази, що не містить глютамінази. За цієї умови виробляється L-аспарагіназа до 38,8 Од/мл, що відповідало продуктивності 1615,8 Од/л/год. Виробництво та продуктивність збільшилися на 115,8% та 7,9% відповідно порівняно з тими, отриманими в експериментах з біореактором [66].

Балакрісхан Мена для оптимізації проводила дослідження виробництва нових позаклітинних глютаміназ L-аспарагінази від *Nocardiosis alba* NIOT-VKMA08. Серед випробуваних джерел вуглецю та азоту максимум виробництво L-аспарагінази спостерігалось при комбінації концентрації аспарагіну та мальтози (1,5%) та вдвічі збільшення (18,47 МО мл⁻¹) спостерігався щойно оптимізованого середовища NIOT-аспарагінази. Очищений фермент помірно інгібувався різними катіонами та реагенти, що блокують тіолову групу, з K_m і V_{max} 0,127 мМ і 5,50 U·l⁻¹. Оптимальний рН і температура очищеної L-аспарагінази для гідролізу L-аспарагіну був 8,0 і 37 °С відповідно. Фермент інгібує утворення поліакриламід у 10% розчині та вихід був дуже специфічним для природного субстрату L-аспарагіну [67].

Ця робота спрямована на вивчення впливу різних джерел вуглецю та азоту для ефективного виробництва L-аспарагінази ізольованими *Bacillus cirilans*. Серед джерел вуглецю: лактоза, галактоза, крохмаль, сахароза, мальтоза, арабіноза та серед джерел азоту: пролін, триптон, глютамат натрію, крутий кукурудзяний лікер, яловичина екстракт, хлорид амонію, екстракт дріжджів у вибраній концентрації дають максимамамальній вихіж 105 та 164 мкг

– 1 L-аспарагіназа ферменту відповідно. Початковий аналіз :дані L-аспарагінази з різними джерелами вуглецю та азоту згідно з PBD не виявили стандартизовані ефекти, а також значення "p" і "t". Коефіцієнт регресії та t-значення були підраховані, піддаючи експериментальні дані статистичному аналізу після об'єднання щонайменше два поживних компонентів. Серед вибраних 26 компонентів, зокрема ксилоза, галактоза, дріжджовий екстракт і пролін позначали найменше значення, тоді як глюкоза, маноза, хлорид амонію та сульфат амонію виявили максимальне значення для ферменту. Насичений PBD може бути ефективно використаний для аналізу даних шляхом об'єднання даних найменш значущих факторів, засновані на виробництві метаболіту / продукту / ферменту. Було виявлено, що хлорид амонію та глюкоза є найбільш вагомим джерелами вуглецю та азоту відповідно при виробництві L-аспарагінази цим штамом бактерій [68].

Порівняння продуцентів L-аспарагінази

Таблиця 3.1

Тип продуцентів	Параметри, що підлягали оптимізації	Сумарний час культивування	Активність ферменту Од/мл	Джерело
Гриби	pH, температура, концентрація субстратів та джерел необхідних елементів	48-96	100-250	[10,12,16]
Бактерії	pH, температура, концентрація субстратів та джерел необхідних елементів, оберти мішалки	24-48	5-80	[17,19]
Актиноміцети	pH, температура, концентрація субстратів та джерел необхідних елементів, оберти мішалки	48-72	10-150	[13]

Отже, процес масштабування та оптимізації параметрів, щодо одержання аспаргінази при культивуванні бактерій, грибів та актиноміцетів проходить в основному за допомогою складання математичної моделі процесу та обрання важливих параметрів та їх зміни у певному діапазоні для підбору оптимального співвідношення. За підсумком даних зібраних з літературних

джерел найбільша активність спостерігається у грибів. Однак вони досить довго її набирають в процесі культивування. У бактерій та актиноміцетів активність ферменту значно нижча, однак вона досягається досить швидко.

РОЗДІЛ 4. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ ВИПУСКУ ПРОДУКТУ МІКРОБНОГО СИНТЕЗУ

4.1 Потреба у цільовому продукті

Загальні відомості про дозування

L-аспаргіназа каталізує гідроліз L-аспарагіну до L-аспарагінової кислоти і аміаку; максимум інгібуючого ефекту припадає на постмітотичну фазу G1; знижує рівень L-аспарагіну у пухлинних клітинах; у результаті введення амінокислота L-аспарагін, незамінна для пухлинних клітин, все більшою мірою розкладається до L-аспарагінової к-ти та аміаку; за рахунок утвореного дефіциту аспарагіну синтез білка у цих клітинах опиняється у глухому куті [1].

Основне застосування даного ферменту у медицині. Він виступає як компонент комбінованої антинеопластичної терапії г. лімфобластної лейкемії у дітей та дорослих, неходжкінська лімфома у дітей. Простіше кажучи даний фермент є компонентом курсу хіміотерапії лейкозу та лейкемії. Точніше даний фермент вводиться на 2 етапі терапії(назва етапу: індукція ремісії, мета якого є проведення поліхіміотерапії). Курс даного етапу триває в середньому 4 тижні. В залежності від ступеня тяжкості хвороби та особливостей організму та віку обирається добове дозування та режим терапії, який виражається в часі інфузіїаспаргінази внутрішньовенно. Середній час інфузії триває 1,5-2 години.

При курсі терапії 2 рази на тиждень дозування складає 100 - 400 Од/кг маси тіла в залежності від вікових категорій. При курсі терапії 7 днів на тиждень(щоденному) дозування складає 200 Од/кг. В залежності від перебігу хвороби повний курс хіміотерапії, що складається з 5 етапів можуть проводити повторно, однак не більше 2 разів на рік. Аспаргіназу застосовують лише на 2 етапі [2].

Зм	Арк.	№ документа	Підпис	Дата	НУХТ БТЕК 02.02.12 КР ПЗ			
Розробник		<i>Хоменко І.В.</i>			<i>Розділ 4. Техніко-економічне обґрунтування випуску продукту мікробного синтезу</i>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
Перевір.		<i>Карлаш Ю.В.</i>					42	121
Реценз.						Кафедра БТМ⁴²		
Н.контр								
Затверд.		<i>Пирог Т. П.</i>						

Розрахунок потреби в L-аспаргінази

Для розрахунку потреби у продукті необхідно встановити середню кількість щорічно хворих людей на лейкоз, лейкемію та подібні ракові захворювання крові. За статистикою 2017 р було зареєстровано наступну кількість випадків захворювань на лейкоз, лейкемію та злоякісних утворень лімфатичної та кровоносної системи - кількість хворих становила сумарно **7047** осіб від 10 до 85 років [69].

Оскільки, розрахувати точний курс терапії аспаргіназою не є можливим, через високу мінливість хвороби, буде взято усереднений курс лікування ,враховуючи наступні обмеження, які приймаємо:

Середня маса 1 людини пацієнта терапії: 75 кг.

Курс лікування буде включати 2 підкурси терапії:

1 підкурс: інфузія аспаргінази у кількості 200 Од/кг маси тіла, упродовж 4 тижнів кожного дня.

2 підкурс: інфузія аспаргінази у кількості 400 Од/кг маси тіла, упродовж 4 тижнів, два рази на тиждень.

Наводимо таблицю 4.1 для візуалізації розрахунку.

Таблиця 4.1

Узагальнена потреба у L- аспаргіназі

Група захворювань	Кількість хворих за 2017 р	Дозування, ОД/кг	Дозування, мг/особу вагою 75 кг	Частота інфузії	Тривалість курсу, дні	Загальна кількість інфузій	Загальна кількість ферменту, на 1 особу г	Загальна кількість ферменту, г
Злоякісні новоутворення кровоносної та лімфатичної системи, включаючи лейкоз та лейкемію Дерматози	7047	1. Підкурс: 200 ОД/кг	1. Підкурс: 166,7 мг	Кожного дня	4 тижні (28 днів)	28	4,668	32 893
		2.Підкурс 400 ОД/кг	2.Підкурс 333,3 мг	2 рази на 7 днів		8	2,666	18 790
Усього	7047	600	500	-	28	36	7,334	51 683

4.2. Розрахунок потужності виробництва.

4.2.1 Розрахунок потужності виробництва.

Виходячи, зданих таблиці 4.1. можна розрахувати сумарно необхідну кількість ферменту L- аспаргінази.

Загальна кількість доз (інфузій) складе:

$K_d = 2 \times 4 + 1 \times 28 = 36$ доз, включаючи 8 доз 2 підкурсу та 28 доз 1 підкурсу.

Доза (діючої речовини для інфузії) для людини вагою 75 кг(середня вага), враховуючи, що 1 мг ферменту еквівалентний 90 Од.

1 підкурс: $K_{m1} = (200 \times 75)/90 = 166,7$ мг

2 підкурс: $K_{m2} = (400 \times 75)/90 = 333,3$ мг

Загальна масова потреба ферменту необхідна для 7047 осіб у г складе:

1 підкурс: $K_{z1} = (166,7 \times 28 \times 7047)/1000 = 32892,6$ г

2 підкурс: $K_{z2} = (333,3 \times 8 \times 7047)/1000 = 18790,1$ г

Сумарна потреба складе: $K_{\Sigma} = 18790,1 + 32892,6 = 51683$ г ферменту на рік, або 51,7 кг

*Примітка 1. Кількість аспаргінази розрахована на всю Україну виходячи з статистики відповідних захворювань станом на 2017 рік.

Отже кількість ферменту аспарагінази на всю потребу України необхідно одержувати 51,7 кг на рік.

4.2.2. Розрахунок кількості готового продукту за цикл, об'єму культуральної рідини за цикл, геометричного об'єму ферментера та кількості виробничих циклів.

Для подальших розрахунків приймаємо річну потребу у ферменті аспарагінази $G_{нт} = 51,7$ кг.

Приймаємо кількість робочих трудоднів $T_{рд} = 120$. Саме за дану кількість трудоднів можливо виробити необхідну кількість ферменту, задля забезпечення хворих на гострий лейкоз та лейкемія препаратом і економічно-доцільного вибору об'єму виробничої апаратури.

Залишок вільних трудоднів можна використати для виробництва інших діючих речовин для хіміотерапії, наприклад доксорубіцину або інших [2,4].

Приймаємо наступні сталі для розрахунку: концентрація продукту в КР - $P_{кр} = 1,8 \text{ кг/м}^3$; вологість сухого продукту $W_{гп} = 7 \%$, відповідно сухих речовин у продукті буде $CP_{гп} = 0,93$ (частка) . Втрати при виробництві приймаємо $E_{св} = 35 \%$ або $0,35$ (частка). Час циклу складає $T_{цф} = 178$ годин. Коефіцієнт запасу приймаємо $K_3 = 1,1$.

1) Розраховуємо кількість циклів

$$N_{цикл} = 24 \times T_{рд} / T_{цф} = 16,2. \text{ Округляємо до цілого у більшу сторону}$$
$$N_{цикл} = 17.$$

2) Кількість сухого ферменту аспарагінази, яку можна отримати за цикл

$$G_{цк} = G_{нт} / N_{цикл} = 51,7 / 17 = 3,04 \text{ кг/цикл}$$

3) Об'єм культуральної рідини, у якій можна отримати дану кількість аспарагінази (кг) за цикл з урахуванням втрат ($E_{св} = 35\%$) буде становити:

$$V_{кр} = K_1 \times G_{цк} \times CP_{гп} / (1 - E_{св}) \times P_{кр} = 1,1 \cdot 3,04 \cdot 0,93 / (1 - 0,35) \cdot 1,8 = 2,66 \text{ м}^3$$

$T_{цф}$ – цикл роботи ферментера (178 год), що включає час біосинтезу (168 год), та час підготовки ферментера - 10 год, K_1 – коефіцієнт запасу, що враховує ймовірність нестерильних операцій. Підготовка ферментатора включає: миття та огляд - 2 год, перевірка на герметичність - 2 год, стерилізація – 2 год, охолодження – 1 год, завантаження середовища – 1,5 год, засів - 0,5 год, вивантаження культуральної рідини - 1 год.

4.2.3 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.

За виробничий цикл отримують $V_{кр} = 2,66 \text{ м}^3$ культуральної рідини.

При одержанні культуральної рідини потрібно врахувати втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять $E_{ф} = 10\% = 0,1$.

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

$$V_{роб1} = V_{кр} / (1 - E_{ф}) = 2,66 / (1 - 0,1) = 2,96 \text{ м}^3$$

При обраному коефіцієнті заповнення $K_{зап} = 0,6$
розраховують можливий геометричний об'єм ферментера (V_{ϕ}), що становить

$$V_{\phi} = V_{роб.1} / K_{зап} = 2,96 / 0,6 = 4,93 \text{ м}^3$$

Приймаємо найближчий за об'ємом ферментер 5 м³ та
уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{зап1} = 2,96 / 5 = 0,59,$$

що знаходиться в межах для ферментерів з комбінованим введенням енергії
(барботаж та механічне переміщення) $K_3 = 0,5 \dots 0,65$.

Кількість посівного матеріалу для ферментера приймаємо $X_{\phi} = 10\%$
від об'єму поживного середовища.

Тоді кількість поживного середовища в ферментері буде становити:

$$V_{пс1} = V_{роб.1} / (1 + X_{\phi}) = 2,96 / (1 + 0,1) = 2,69 \text{ м}^3$$

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить

$$V_{пм1} = V_{роб.1} - V_{пс1} = 2,96 - 2,69 = 0,27 \text{ м}^3 \text{ (270 л)}$$

Для одержання 270 л посівного матеріалу у посівному апараті
вираховуємо втрати у результаті краплевиносу через колектор
відпрацьованого повітря. Приймаємо це за $E_{па} = 10\% = 0,1$

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

$$V_{роб2} = V_{пм1} / (1 - E_{па}) = 270 / (1 - 0,1) = 300 \text{ л}$$

При обраному коефіцієнті заповнення $K_{зап} = 0,6$
розраховують можливий геометричний об'єм посівного
апарата ($V_{па}$), що становить

$$V_{па} = V_{роб.2} / K_{зап} = 300 / 0,6 = 500 \text{ л}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом посівний апарат 630 л та
уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап1}}=300/630=0,5,$$

що знаходиться в межах для ферментерів з комбінованим введенням енергії (барботажа та механічне переміщення) $K_3 = 0,5 \dots 0,65$.

Кількість поживного середовища у посівному апараті з поправкою на інокулянт $X_{\text{па}} = 10\% = 0,1$ буде становити:

$$V_{\text{пс2}} = V_{\text{роб2}} / (1 + X_{\text{па}}) = 300 / (1 + 0,1) = 273 \text{ л}$$

Звідси кількість посівного матеріалу становить:

$$V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб2}} - V_{\text{пс2}} = 300 - 273 = 27 \text{ л}$$

Для одержання 27 л посівного матеріалу вираховуємо втрати у результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря. Приймаємо це за $E_{\text{ін}} = 10\% = 0,1$

Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу в інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{роб3}} = V_{\text{пм2}} / (1 - E_{\text{ін}}) = 27 / (1 - 0,1) = 30 \text{ л}$$

Кількість поживного середовища в інокуляторі з поправкою на інокулянт у $X_{\text{ін}} = 10\%$ буде становити:

$$V_{\text{пс3}} = V_{\text{роб3}} / (1 + X_{\text{ін}}) = 30 / (1 + 0,1) = 27 \text{ л}$$

Звідси кількість посівного матеріалу становить:

$$V_{\text{пм3}} = V_{\text{роб3}} - V_{\text{пс3}} = 30 - 27 = 3 \text{ л}$$

При обраному коефіцієнті заповнення $K_{\text{зап}} = 0,6$ розраховують можливий геометричний об'єм інокулятора ($V_{\text{гін}}$), що становить

$$V_{\text{гін}} = V_{\text{роб.3}} / K_{\text{зап}} = 30 / 0,6 = 50 \text{ л}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом посівний апарат 50 л та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап1}} = 30 / 60 = 0,5,$$

що знаходиться в межах для ферментерів з комбінованим введенням енергії (барботажа та механічне переміщення) $K_3 = 0,5 \dots 0,65$.

Для одержання 3 л посівного матеріалу будемо використовувати качалочні колби геометричним об'ємом $V_{\text{колб}} = 0,75$ л та коефіцієнтом заповнення

$K_{\text{колб}} = 0,2$. Втратами при вирощуванні посівного матеріалу в колбах нехтуємо у зв'язку з малою величиною.

Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу в колбах становитиме:

$$V_{\text{роб4}} = V_{\text{пм3}} = 3,0 \text{ л}$$

Кількість поживного середовища в колбах з поправкою на інокулят у $X_{\text{колб}} = 10\% = 0,1$ буде становити:

$$V_{\text{пс4}} = V_{\text{роб4}} / (1 + X_{\text{колб}}) = 3,0 / (1 + 0,1) = 2,7 \text{ л}$$

Звідси кількість посівного матеріалу для колб становить:

$$V_{\text{пм4}} = V_{\text{роб4}} - V_{\text{пс4}} = 3 - 2,7 = 0,300 \text{ л або } 300 \text{ мл посівного матеріалу.}$$

Тоді кількість колб для отримання посівного матеріалу для інокулятора буде становити:

$$N = V_{\text{роб4}} / (V_{\text{колб}} \times K_{\text{колб}}) = 3 / (0,750 \times 0,2) = 20 \text{ штук}$$

Отже, процес одержання аспарагінази з використанням продуцента *Streptomycesbroillosae* NEAE-115 буде проводитися у 4 етапи:

- виробничий біосинтез у ферментері геометричним об'ємом 5 м^3 з коефіцієнтом заповнення $K_3 = 0,59$;
- вирощування посівного матеріалу у посівному апараті геометричним об'ємом 630 л та коефіцієнтом заповнення $K_3 = 0,5$;
- вирощування посівного матеріалу в інокуляторі геометричним об'ємом 60 л та коефіцієнтом заповнення $K_3 = 0,5$;
- вирощування посівного матеріалу у 20 качалочних колбах

геометричним

об'ємом 750 мл та коефіцієнтом заповнення $K_{\text{колб}} = 0,2$.

РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.

5.1.0 обґрунтування вибору біологічного агента, поживного середовища для його культивування та перевірочний розрахунок складу ПС.

5.1.1 Обґрунтування вибору біологічного агента, поживного середовища для його культивування.

L-аспарагіназа – фермент, який наразі отримується шляхом біотехнологічного синтезу при культивуванні штаму *Streptomyces brollosae*(NEAE-115) [70].

Відомий ряд мікроорганізмів, здатних синтезувати в процесі життєдіяльності L-аспарагіназу : *Streptomyces brollosae*(NEAE-115), *Streptomyces fradiae* (NEAE-82), *Streptomyces griseus*(NIOT – VKMA29) [70,71,72].

Щоб визначити культивування яких продуцентів буде найефективнішим з точки зору біотехнологічного промислового виробництва, необхідно проаналізувати наведені вище штамів, порівнявши їх здатність до продукування необхідного продукту.

У першу чергу необхідно дослідити здатність продуцентів до одного з найголовніших факторів ефективності виробництва – надсинтезу цільового продукту.З цією метою складаємо *таблицю 5.1.*

					НУХТ БТЕК 02.02М ДП ПЗ			
Зм	Арк.	№ документа	Підпис	Дата	<i>Розділ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми</i>	Літ.	Арк.	Аркушів
Розробник		<i>Хоменко І.В.</i>					50	121
Перевір.		<i>Карлаш Ю.В.</i>						
Реценз.								
Н.контр								
Затверд.		<i>Пирог Т. П.</i>			Кафедра БТМ⁵⁰			

Таблиця 5.1

Особливості одержання L-аспарагінази при культивуванні *Streptomycesbroollosae* NEAE-115, *Bacillus subtilis* 168/pMA5-S17G/A90S/R156S/K272A, *Streptomyces fradiae* NEAE-82, *Streptomyces griseus* NIOT – VKMA29

Біологічний агент	Склад поживного середовища, г/л	Активність ферменту, Од/мл	Тривалість процесу, год	Особливості технологічного процесу	Використана література
<i>Streptomycesbroollosae</i> NEAE-115	Крохмаль – 20,0; Аспарагін – 10,0; Декстроза – 2,0; KNO ₃ – 1,0; K ₂ HPO ₄ – 1,0; MgSO ₄ – 0,5; NaCl – 0,1	162,11	168	Продуцент культивують у стані перемішування на протязі 168 годин при температурі 30 °C, рН 7.	Noura El-Ahmady El-Naggar, Hassan Moawad, Nancy M. El-Shweihy, Sara M. El-Ewasy, Islam A. Elsehemy & Nayera A. M. Abdelwahed Process development for scale-up production of a therapeutic L-asparaginase by <i>Streptomycesbroollosae</i> NEAE-115 from shake flask to bioreactor. <i>Scientific Reports</i> 9, 13571 (2019) doi:10.1038/s41598-019-49709-6
<i>Streptomycesfradiae</i> NEAE-82	Аспарагін – 20,0; Декстроза – 4,0; K ₂ HPO ₄ – 2,0; MgSO ₄ – 1,0;	30,636	72	Продуцент культивують у стані перемішування на протязі 72 годин при температурі 30 °C, рН 6,8.	Noura El-Ahmady El-Naggar, Sahar F. Deraz, Hoda M. Soliman, Nehal M. El-Deeb & Sara M. El-Ewasy Purification, characterization, cytotoxicity and anticancer activities of L-asparaginase, anti-colon cancer protein, from the newly isolated alkaliphilic <i>Streptomycesfradiae</i> NEAE-82 <i>Scientific Reports</i> 6, 32926 (2016) doi:10.1038/srep32926

Продовження таблиці 5.1

<p><i>Streptomyces</i> <i>griseus</i> NIOT – VKMA29</p>	<p>Аспарагін – 10,0; Декстроза – 2,0; K₂HPO₄ – 1,0; MgSO₄ – 0,5; Феноловий червоний – 0,09.</p>	<p>56,78</p>	<p>240</p>	<p>Продуцент культивують у стані перемішування на протязі 240 годин при температурі 30⁰С, рН 6,8. У середовище додають феноловий червоний у якості індикатора.</p>	<p>Balakrishnan Meena, Lawrance Anburajan, Thadikamala Sathish, Rangamaran Vijaya Raghavan, Gopal Dharani, Nambali Valsalan Vinithkumar & Ramalingam Kirubagan L-Asparaginase from <i>Streptomyces griseus</i> NIOT-VKMA29: optimization of process variables using factorial designs and molecular characterization of L-asparaginase gene <i>Scientific Reports</i> 5, 12404 (2015) doi:10.1038/srep12404</p>
---	--	--------------	------------	---	---

Наступним кроком є необхідність встановлення економічної доцільності вибору поживного середовища для культивування – складність полягає у тому, що для біотехнологічного виробництва необхідно встановити баланс між кількістю витрачених коштів та виробленим продуктом, а саме – якнайменший кошт має давати виробнику якнайбільший вихід продукту.

Оскільки характеристика технічного процесу, яка була неведена вище, не відображає, наскільки економічно вигідним є культивування того чи іншого продуцента, необхідно додатково порівняти вартість поживних середовищ, що були застосовані для культивування продуцентів. З цією метою складаю таблицю 5.2.

Таблиця 5.2

Вартість компонентів поживного середовища для культивування[1-8]

Біологічний агент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело *
<i>Streptomyces brollosae</i> NEAE-115	Крохмаль – 20,0	14	0,28	1
	Декстроза – 10,0	18	0,18	2
	Аспарагін – 10,0	367	3,67	3
	KNO ₃ – 1,0	39	0,039	4
	K ₂ HPO ₄ – 1,0	187	0,187	5
	MgSO ₄ – 0,5	4,95	0,002475	6
	NaCl – 0,1	1,5	0,00015	7
	Вартість 1 л середовища – 4,36 грн			
<i>Streptomyces fradiae</i> NEAE-82	Аспарагін – 20,0	367	7,34	3
	Декстроза – 4,0	18	0,072	2
	K ₂ HPO ₄ – 2,0	187	0,374	5
	MgSO ₄ – 1,0	4,95	0,00495	6
	Вартість 1 л середовища – 7,79 грн			
<i>Streptomyces griseus</i> NIOT – VKMA29	Аспарагін – 10,0;	367	3,67	3
	Декстроза – 2,0;	18	0,036	2
	K ₂ HPO ₄ – 1,0;	187	0,187	5
	MgSO ₄ – 0,5;	4,95	0,002475	6
	K ₂ HPO ₄ – 1,0	654	0,654	5
	Феноловий червоний – 0,09.	2298	0,20682	8
Вартість 1 л середовища – 4,75 грн				

* **Примітка.** – Ціни наведено станом на грудень 2019 р.].

www.kaapri.com.ua , [2]. www.azot.com.ua , [3]. www.runainter.com.ua , [4].

www.prom.co.ua , [5]. www.harkiv-torg.com.ua , [6]. www.torgovyj-dom-energostrojinvest.prom.ua , [7]. www.xarkovtorg.prom.ua , [8].

www.udobrenia.uaprom.net.

Проаналізувавши дані, наведені в *таблицю 5.2*, можна підсумувати, що найдешевшим для культивування є середовище, на якому вирощується штам *Streptomycesbrolosae*NEAE-115, яке являється дешевшим за інші наведені середовища. Вартість становить – 4,36 грн/л.

Для остаточного встановлення найвигіднішого продуцента для ферментації у промислових масштабах, необхідно підрахувати умовну вартість 1 од активності цільового продукту. З цією метою складаю таблицю *таблицю 2.3*.

Таблиця 5.3

Умовна вартість цільового продукту (L-аспарагінази) при культивуванні *Streptomycesbrolosae*NEAE-115, *Streptomycesfradiae*NEAE-82, *Streptomycesgriseus*NIOT – VKMA29

Продуцент	Вартість 1 л середовища, грн	Активність ферменту, од/мл	Умовна вартість 1000 Од активності цільового продукту, грн/1000 од	Тривалість культивування, год	Активність ферменту за годину, од/год
<i>Streptomyces brolosae</i> NEAE-115	4,36	162,11	0,03	168	0,9649
<i>Streptomyces fradiae</i> NEAE-82	7,79	30,636	0,25	72	0,4255
<i>Streptomyces griseus</i> NIOT – VKMA29	4,75	56,78	0,08	240	0,2365

За отриманими та зазначеними вище даними, можна зробити висновок, що цільовий продукт, який синтезується штамом *Streptomycesbrolosae*NEAE-

115 являється найпродуктивнішим серед інших відібраних культур. Швидкість синтезу та активність цільового продукту показали на порядок кращі результати – активність цільового продукту за годину – 162,11 Од/год, на відміну від інших, зважаючи на те, що продуцент – *Streptomyces brollosae* NEAE-115 має набагато більшу активність продукту культивування – 162,11 Од/мл за 168 годин культивування. Також встановлено вартість поживного середовища, виходячи з вартості 1 л, використаного для отримання L-аспарагінази, який синтезований штамом *Streptomyces brollosae* NEAE-115, ціна якого складає 4,36 грн, що є найбільш дешевшим серед представлених. Після культивування, умовна вартість 1000 одиниць активності цільового продукту складає 0,03 грн, що демонструє ефективність використання саме штаму *Streptomyces brollosae* NEAE-115 як основного продуценту, на відміну від інших представлених штамів.

5.2.2 Перевірочний розрахунок складу поживного середовища.

Розрахунок по вуглецю.

Знаходимо відсотковий склад (масову частку) вуглецю у молекулі ферменту :

Враховуючи, що середній вміст карбону у білків (ферментів також) 50-55 % можна знайти відсотковий вміст карбону. Приймаємо відсотковий вміст карбону у аспарагіназі 50% [71].

Знаючи масову частку вуглецю знаходимо кількість вуглецю, необхідну для біосинтезу 1.8 г/л ферменту:

$$X_1 = \frac{50 \times 1.8}{100} = 0,9 \text{ г/л (2.2.1.1)}$$

Знаючи потребу у вуглеці для ферменту необхідно прорахувати потребу у вуглеці для біомаси.

Вміст карбону у біомасі коливається від 47 до 53 %. Приймаємо 50 %. Вміст карбону становитиме, при максимальній її концентрації у 7,7 г/л [71]:

$$X_2 = \frac{7,7 \times 50}{100} = 3.85 \text{ г/л (2.2.1.2)}$$

Враховуючи, що при накопиченні біомаси 50 % вуглецю іде на холосте окиснення кінцева потреба буде становити:

$$X_2'' = 3,85/0,5 = 7,7$$

Оскільки необхідна кількість вуглецю в середовищі для синтезу ферменту та біомаси можна прорахувати сумарну потребу у вуглеці:

$$X_3' = 7,7 + 0,9 = 8,6 \text{ г/л}$$

Знаючи потребу для біосинтезу біомаси та продукту цільового синтезу необхідно зіставити її з кількістю вуглецю в середовищі культивування.

Середовище у якості субстрату містить 3 елементи: аспаргінову кислоту, декстрозу та крохмаль. Оскільки крохмаль складається з декстрази їх кількість еквівалентна. Кількість декстрази в середовищі буде сумарною: $2+20 = 22$ г/л. Кількість аспаргіну становить 10 г/л [70].

Відсоток вуглецю у декстразі (6 атомів молекулярною масою 12 кожний):

$$G_1 = \frac{100 \times 72}{180} = 40 \% \text{ (2.2.1.3)}$$

Розраховуємо масу вуглецю у 22 г/л декстрази:

$$G_1 = \frac{40 \times 22}{100} = 8,8 \text{ г/л (2.2.1.4)}$$

Брутто формула аспаргінової кислоти наступна [73]: $C_4H_8N_2O_3$, молекулярна маса становить 132 г/моль. Виходячи з даних можна

прорахувати відсоток вуглецю у аспаргіні:

$$G_2 = \frac{100 \times (4 \times 12)}{132} = 36,3 \% \text{ (2.2.1.5)}$$

Знаючи відсотковий вміст можна прорахувати кількість вуглецю в аспаргіні:

$$G_2 = \frac{10 \times 36,3}{100} = 3,63 \text{ г/л (2.2.1.6)}$$

Сумарна кількість вуглецю в середовищі :

$$G_3 = 8,8 + 3,63 = 12,43 \text{ г/л (2.2.1.7)}$$

Висновок : після проведення розрахунку потреб у вуглеці для синтезу необхідної кількості ферменту у 1,8 г/л та біомаси у 7,7 г/л було підтверджено,

що дане середовище повністю задовольняє розрахункові потреби по вуглецю, як для синтезу ферменту так і для накопичення біомаси.

Розрахунок за азотом

Знаходимо відсотковий склад(масову частку) азоту у молекулі ферменту, приймаючи вміст азоту у ферменті, як і більшості білків у 10%. Знаходимо масову частку азоту у ферменті.

$$X_{n1} = (0,1 \times 1,8) = 0,18 \text{ г/л (2.2.1.8)}$$

З розрахунку необхідної кількості азоту видно, що для синтезу 1.8 г/л ферменту необхідно 0,18г/л.

Масова частка азоту у біомасі буде прийнята за 10 відсотків (з середньої значень у 10-15 % якщо точніше). Потреба в азоті для біомасі складе:

$$X_{n2} = (0,1 \times 7,7) = 0,77 \text{ г/л (2.2.1.8)}$$

Загальна потреба складе:

$$X'_{n3} = 0,77 + 0,18 = 0,95 \text{ г/л (2.2.1.8)}$$

Розраховуємо кількість азоту в середовищі культивування, враховуючи 2 джерела аспаргіну – 10 г/л та калієва селітра (KNO_3 - 1) :

Брутто формула аспаргінової кислоти наступна [73]: $\text{C}_4\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_3$, молекулярна маса становить 101 г/моль. Виходячи з даних можна прорахувати відсоток азоту у аспаргіні:

$$G_{n1} = \frac{100 \times (4 \times 12)}{101} = 21,2 \% (2.2.1.9)$$

Масова частка азоту складе:

$$G_{n2}' = \frac{10 \times 21,2}{100} = 2,12 \text{ г/л (2.2.1.10)}$$

Другий компонент з вмістом азоту- калієва селітра. Брутто формула селітри наступна KNO_3 , молекулярна маса становить 101г/моль.

Виходячи з даних можна прорахувати відсоток азоту у селітрі:

$$N_{n1} = \frac{100 \times (14)}{101} = 13,86 \% (2.2.1.11)$$

Масова частка азоту складе:

$$G_{n2}' = \frac{1 \times 13,86}{100} = 0,136 \text{ г/л (2.2.1.12)}$$

Загальна кількість азоту становить:

$$G_N = 0,136 + 2,12 = 2,256 \text{ г/л (2.2.2.13)}$$

Загальний висновок : при потребі в азоті на біосинтез ферменту і накопичення біомаси у 0,95 г/л наявна концентрація його у середовищі у 2,256 г/л повністю покриває потребу; при потребі у карбоні на синтез ферменту та біомаси необхідна потреба становить 8,6 г/л, наявні у середовищі культивування субстрати, зокрема крохмаль та декстроза , а також аспаргін створюють розрахункову концентрацію карбону у 12,43 г/л, що повністю задовольняє потребу.

Таблиця 5.4

Порівняння розрахункових і допустимих потреб у вуглеці і азоті при культивування продуцента.

Компонент	Концентрація у середовищі г/л	Вміст ключового елемента (N, C), г/л.	Сумарна кількість	Потреба	Концентрація ферменту г/л.	Концентрація ферменту г/л.	Літера т.
KNO ₃ Аспаргін	1 10	0,136 2,12	2,256	0,95	1,8	7,7	[4,7,8]
Крохмаль + Декстроза Аспаргін	20 2 10	8,8 3,63	12,43	8,6			[4,7,8]

5.3. Обґрунтування вибору способу культивування і типу ферментера

Існує велика кількість ферментерів класифікованих за типом перемішуючого пристрою, формою, та іншими характеристиками, при виборі ферментера будемо звертати увагу у першу чергу на особливість продуцента: *Streptomyces brolosae* NEAE-115. Продуцент у першу чергу аероб, тож найбільш ефективно продуцент буде культивуватися у ферментері ємнісного типу (класичним способом) з барботером та мішалкою.

Найбільш розповсюдженим типом ферментерів є класичні ферментери з перемішуючим пристроєм та барботером тобто з комбінованим перенесенням енергії перемішування. Обираємо такий тип ферментеру , оскільки він має

один з найвищих коефіцієнта масообміну, продуцент не потребує спеціальної конструкції чи наявності спец. елементів оскільки бактерії невибагливі до умов росту порівняно з грибами та культурами рослин чи тварин. Обираємо ферментер обладнаний барботером для проведення аеробного культивування *Streptomyces brollosae* NEAE-115 та перемішуючим пристроєм [75]. Тип перемішувального пристрою обираємо турбінний, оскільки даний тип дає найкращий масообмін, а також продуцент нечутливий до зусиль кутового навантаження, що спричиняє даний тип мішалки.

Біореактори місткістю до 10000 л досить розповсюдженими промисловими реакторами, які всі виробляються майже всіма компаніями які виготовляють біореактори. Обираємо біореактор фірми «Біотехно» виготовлений на замовлення місткістю 5000 л.

Максимальна температура нагріву- 150 °С

Максимальний тиск 0.3- 6 а.т.м

Діапазон обертів мішалки 50-400 об/ хв

Коефіцієнт заповнення: 0,35- 0,80

Обладнаний системою SIP/CIP, системою автоматизованого керування процесом, оглядовим ілюмінатором, та основними і додатковими датчиками для контролю процесу та портами введення компонентів[75].

Ферментер буде обладнаний турбінною мішалкою, оскільки вона забезпечує найкращий масообмін компонентів і високе розчинення барботажного кисню, до того є вона навіть на високих обертах не шкодить клітинам, оскільки бактеріальні клітини стійкі до кутового зусилля мішалки. Також ферментер буде обладнано кільцевим барботером для аерації, оскільки продуцент росте і синтезує фермент лише в аеробних умовах, також реактор буде обладнана перегородками для кращого перемішування і масообміну. Система мийки CIP передбачає встановлення головок розпилення миючих розчинів всередині ферментера для кращого миття.

Також ферментер обладнується основним набором датчиків для контролю процесу : рН-метр, вимірювач концентрації кисню та оптичної

густини, барометри, датчик температури та датчик рівнів заповнення. До того ж додатково обладнується блоком насосів для подачі та дозування титруючих агентів та ємностей для них для підтримки рН та ємності для піногасника. Для контролю внутрішнього процесу візуально реактор обладнується ілюмінатором та освітлювачем[75].

Режим культивування обираємо періодичний, оскільки фермент є первинним метаболітом і синтезується у експоненційній фазі росту[75]. До того ж безперервний процес на відміну від періодичного не може бути повністю стерильним а параметри культивування продуцента підходять для більшості мікроорганізмів тож є високий ризик контамінації, що недопустимо[74,75].

Для забезпечення стерильної аерації на входах повітря в ферментер встановлюються фільтри індивідуальної очистки для дублювання можливих ризиків контамінації[75].

Наводимо зображення ферментера (Рис 5.1)

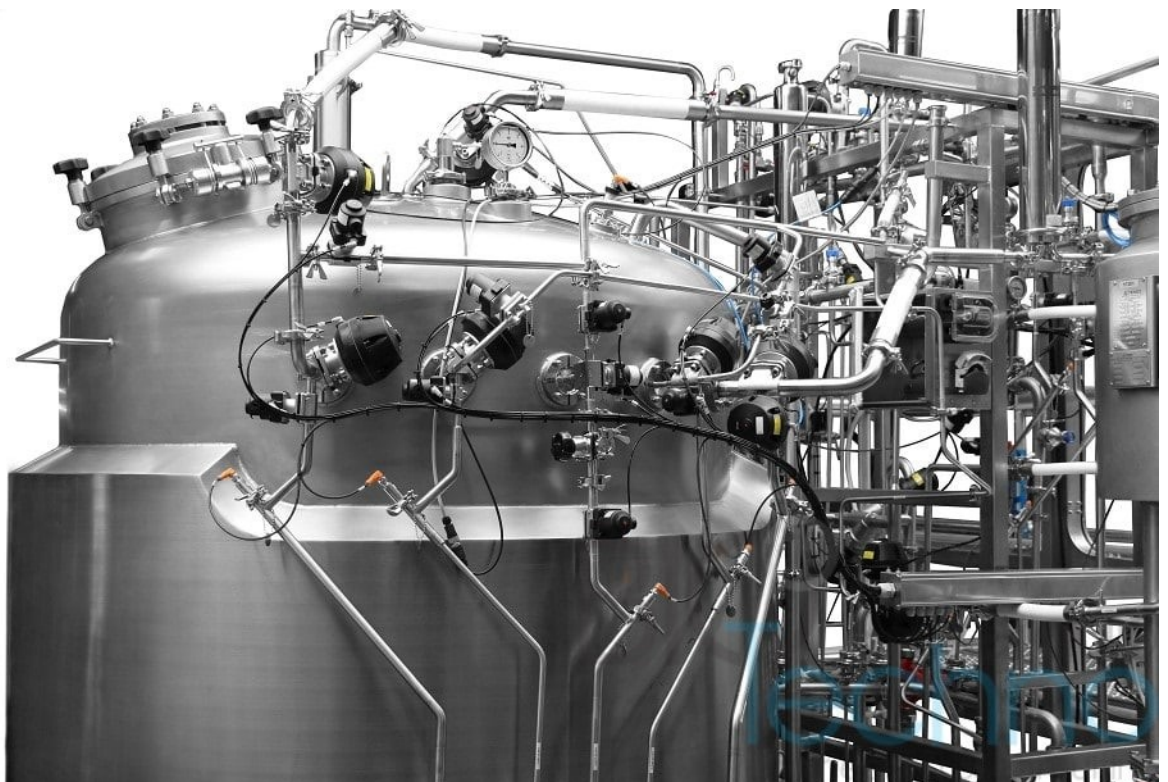


Рис. 2.1 Зображення ферментера фірми «Біотехно» об'ємом 5000 л [76].

Для точної статистики процесу і визначення точного часу завершення процесу культивування з ферментера будуть відбираються проби культуральної рідини для аналізу активності фермента, визначення концентрації біомаси та чистоти культури. Паралельно з цим з проб визначають вміст джерел азоту і вуглецю для більш точного опису процесу.

У середовищі присутні компоненти, що сприяють сильному піноутворенню тож необхідно передбачити внесення піногасника [77]. Піногасник можна не використовувати для культивування продуцента на обраному поживному середовищі, оскільки в ньому відсутні компоненти, що можуть спричинити піноутворення.

Посівний матеріал буде додаватися у вегетативній формі у зоні середини експоненційної фази росту, оскільки це зменшить час адаптації продуцента відповідно скоротить лаг-фазу[75]. Так як у складі поживного середовища є компоненти, що сприяють піноутворенню необхідно додавати розчин піногасника. Найбільш ефективний тип піногасників – це модифіковані полімерні та на основі силікатів. Обираємо піногасник на силікатній основі «DowCorning 1510 AntifoamEmulsion» фірми «InnoChem». Дозування: 0.1 кг/тонну розчину. Розведення для стерилізації приймаємо 20 %[78]. Кількість піногасника для ферментерів та інокуляторів складе: :

Для ферментера 50 л – 3 г (15 мл 20 % розчину)

Для ферментера 500 л - 30 г (150 мл 20 % розчину)

Для ферментера 5000 л –296 г (1480 мл 20 % розчину)

Загально - 329 г (1645 мл 20 % розчину)

Обґрунтування стадій виділення і очищення L-аспаргінази.

L-аспаргіназа являє собою фермент, що включає в себе більш ніж 20 видів амінокислот сумарною масою 85-86 кДа та має ізоелектричну точку в районі 5,67. Основна специфічна властивість аспаргінази це каталіз гідролізу L-аспарагіну до L-аспарагінової кислоти і аміаку; максимум інгібуючого ефекту

припадає на постмітотичну фазу G1; знижує рівень L-аспарагіну у пухлинних клітинах.

Необхідну чистоту препарату аспаргінази встановлюємо не менше ніж GX10 оскільки субстанція продукту буде застосовуватися як АФІ лікарських засобів у ін'єкцій формі [2,41].

1. Центрифугування.

Для відділення культуральної рідини від біомаси, в якому знаходиться аспаргіназа існує два основних способи: центрифугування і фільтрація.

А) Центрифугування. Даний спосіб дуже ефективний для відділення біомаси клітин бактерій та дріжджів, або інших одноклітинних організмів, оскільки для реалізації цього способу суспензійна культура піддається великому навантаженню відцентрової сили, при якому відділяються тверді часточки від рідини [74].

Б) Фільтрація. Такий спосіб затрачає менше енергії ніж центрифугування і ефективний для відділення клітин продуцент з досить великими розмірами від культуральної рідини. В залежності від типу фільтраційного обладнання його поділяють на фільтр-преси, друк та нутч-фільтри які працюють відповідно під додатковим тиском чи пониженим тиском. Їх конструкція близька до конструкції ємностей з додатковими перегородками для фільтрувальних касет та портами для подачі вакууму чи стисненого повітря.

Однак дані установки мають ряд недоліків, зокрема складність в обслуговуванні, підвищена небезпека використання та низька продуктивність відносно автоматичного фільтр-преса (ФПАКМ).

На відміну від фільтр-пресів ДРУК та НУТЧ-фільтри є більш складним обладнанням та потребують додаткових ресурсів для роботи:

Обираємо для відділення біомаси продуцента мікроміцета **центрифугування**. Даний вибір обґрунтовується тим, що через невеликий розмір клітин та об'єм одного циклу ферментації немає сенсу використовувати фільтрацію, яка потребуватиме постійного контролю заміни елементів фільтрування, що збільшить вартість виробництва [74].

2. Осадження ферменту

Оскільки цільовий продукт є ферментом його можна виділити завдяки дії на основні умови розчинення його у водному розчині. Одними з найбільш простих методів виділення ферментів з розчину є осадження різними додаванням різних заміщуючих агентів або доведення рН розчину ферменту до ізоелектричної точки ферменту, при якій він випадає в осад.

Обираємо осадження ферменту-аспаргінази сульфатом амонію.

Даний метод є більш простим з точки зору реалізації, оскільки не потребує точних розрахунків кількості рН-змінюючих агентів, зокрема кислот та додаткових ємностей. Осадження буде проходити висолюванням при додаванні сульфату амонія у кількості від 40 до 60 % від об'єму готового супернатанту. Після висолювання необхідно відділити фермент від рідини. З даною задачею впорається центрифуга проточного типу, оскільки вона має досить високий фактор розділення та високу продуктивність [79,80].

3. Відділення осаду центрифугуванням

Після процесу осаджування, білок необхідно відокремити. Для цього використовуємо процес центрифугування, через те, що він доволі сприятливо відноситься до необхідних нам компонентів, та являє собою економічно-вигідний варіант на даному етапі очищення [80].

4. Розчинення осаду у буфері

Для наступного процесу, а саме концентрування, нам необхідно розчинити осад у безпечному для компонентів буфері. Для цієї цілі використовуємо очищену воду.

5. Концентрування ультрафільтрацією

Для подальшої стадії очистки фермент, що відділили після осадження висолюванням необхідно доочистити. Для даного етапу можна використовувати наступні методи: 1) мікрофільтрація, 2) діаліз, 3) ультрафільтрація.

Обираємо ультрафільтрація через те, що одночасно ми концентруємо продукт, також очищуємо його від сульфату амонію, маючи здатність затримувати окремі молекули розчиненої високомолекулярної речовини [81].

6. Хроматографічне очищення ферменту

Концентрат ферменту містить сторонні білки та фермент схожі за молекулярною масою або більші від цільового ферменту. Їх кількість відносно цільового ферменту невелика однак для забезпечення максимальної чистоти ферменту їх необхідно прибрати. Найбільш ефективний метод доочистки є хроматографічне розділення з подальшою елюцією з селективно підібраної колонки.

Існує багато видів хроматографії як по то агрегатним станам РФ та ТФ а також по специфічності сорбентів. Оскільки цільовий продукт є високомолекулярною сполукою з великою кількістю заряджених локальних зон для його очищення буде застосована іонообмінна хроматографія з твердою фазою-сорбентом та рідкою фазою (розчинником у вигляді буферу з певним значенням рН), оскільки даний тип хроматографії найбільше підходить до такого типу речовин по специфічності сорбції та відносній простоті ведення процесу. Для ферменту аспаргінази зазвичай використовують іонообмінні смоли, що мають певний заряд, або який їм можна надати при промивці буфером. Конкретно для L-аспаргінази зазвичай використовують сорбент Sephacryl (Сефакрил) з різним номіналом пор позначених цифрою. Сам по собі цей сорбент представляє із себе смолу у вигляді гелю з порами, основу якої становить сополімералілдекстран та N, N'-метиленбісакриламід. По властивостям досить стійкий до хімічних реакцій матеріал, що також дає хорошу роздільну здатність при іонообмінній хроматографії білків та пептидів. Технологія хроматографічного очищення передбачає 2 стадії: нанесення на сорбент колонки у вигляді розчину ферменту певної концентрації у буфері з подальшою сорбцією наступного на колонці, а потім елюцію з допомогою боратного буфера з рН 7.0 у градієнті концентрації по NaCl (0.1-0.5 M) [41].

7. Концентрування ультрафільтрацією

Використовуємо той самий метод, що і при 5 стадії, а саме – ультрафільтрацію. Завдяки ультрафільтрації ми концентруємо продукт, а також видаляємо сторонні домішки, такі як NaCl [81].

8. Висушування у вакуум-сушильній шафі

Зазвичай використовують основні 2 типи сушіння: під атмосферним тиском та під вакуумом. Серед найбільш розповсюджених типів висушування зустрічається сушіння під атмосферним тиском, воно не потребує спеціальних вакуумних насосів до того ж температура сушіння продуктів у вигляді твердих кристалів 40...50 °С. Однак для висушування ферменту даного температурного діапазону буде забагато, оскільки фермент дуже чутливий до дії температури і може втратити свою активність, тому більш вірогідним способом сушки кристалів ферменту буде сушіння під вакуумом при тиску 0.08-0,1 а.т.м при 25-30 °С. для даної операції ідеально підійде малогабаритна вакуумна сушарка шафового типу [74,82].

9. Подрібнення

При застосування l-аспарагінази у якості АФІ для ін'єкційних препаратів, необхідно ретельно подрібнити отриману субстанцію задля кращої розчинності при утворенні фінальної форми препарату [83].

Обґрунтування вибору товарної форми цільового продукту.

Оскільки, L-аспарагіназа використовується як АФІ для створення протипухлинних препаратів, то і вводиться він у формі ін'єкцій. Для розробки препаратів на основі даного ферменту нам необхідна суха, порошкоподібна субстанція, яка у свою чергу має зберігатись у надійному пакетованному упакуванні [73,84].

Обґрунтування стадії підготовки обладнання і комунікацій.

Стадія миття апаратури

Вся апаратура миться як зовні так і в середині. Зовні мийка проводиться протиранням зовнішніх частин деталей апаратури спеціальними серветками чи гумками змоченими дезінфікувально-мийними засобами. Внутрішня мийка

ферментерів, збірників, інокуляторів, посівних апаратів проводиться за допомогою СІР- станції обладнаної реакторами та насосами. Що представляє собою напівавтоматичну систему безрозбірної мийки обладнання. Даний тип мийки був обраний через, те, що він є більш зручним та потребує менше часу на підготовку а також , що мийка ведеться герметично, тож менше шансів занести у ферментер сторонню мікрофлору. Тому внутрішня частина апарата не повинна контактувати із зовнішнім середовищем тож мийка має бути закрита.

Внутрішня мийка допоміжної апаратури такої як автоклав проводиться вручну і розбірно, оскільки стерильність даної апаратури не обов'язкова.

Миття апаратів проводиться з використанням 2 % розчину гідроксиду натрія (каустичної соди) оскільки даний миючий розчин є дешевим та ефективний проти майже всіх видів забруднень.

Після мийки апаратуру ополіскують 10-15 хвилин.

Стадія ТО (технічного огляду)

Технічний огляд апаратури проводять після миття та перед запуском процесу аби виявити наявність чи присутність дефектів у ній.

Перевірка на герметичність.

Дана стадія стосується в першу чергу основного ферментера, інокулятора. Для цього у апарат на якому герметично затягнута вся арматура подається аераційне повітря до набору надлишкового тиску у 0,1-0,2-МПа, Перекривають прохід повітря, та фіксують показання манометра на протязі 35-40 хв. Якщо падіння тиску не перевищує 0,01 МПа – апарат є герметичним. Якщо дане значення перепаду тиску перевищує 0,01 МПа проводять перевірку і знаходять місце розгерметизації.

Для визначення місця розгерметизації апарат і місця з'єднань деталей апарата перевіряють на герметичність за допомогою галогеношукача перед цим замкнувши запірну арматуру ти пустивши галоген-вмісний газ у середину під тиском знаходять місця розгерметизації по відхиленні стрілки галогеношукача. Даний спосіб менш затратний у порівнянні з іншими(

наприклад омиленням апарату з метою пошуку розгерметизації) при великих об'ємах апаратів (більше 200л) тож для пошуку місць розгерметизації обраємо даний спосіб [75].

Стадія стерилізації обладнання та комунікацій

У даній технології культивування для підготовки апаратури та поживного середовища буде використана термічна стерилізація. Ферментер на 15 л стерилізуватиметься зсередини парою. Стерилізація умовно поділена на 3 етапи.

Етап 1 Нагрів апарата: В сорочку подається глуха пара та апарат нагрівається до температури 80-90 °С.

Етап 2 Стерилізація(витримка) Відкривають усю запірну апаратуру, вентиль для відпрацьованого повітря і подають гостру пару в апарат через барботер чи через нижній спуск. Доводять до температури 140 °С, закривають усю запірну апаратуру та витримують відповідний час 40 - 30 хвилин

Етап 3 Охолодження. В апарат подають стерильне повітря та в рубашку подають холодну воду для охолодження. Процес проводять до температури 40 °С[75].

Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря

Оскільки продуцент ферменту L- аспаргінази *Streptomyces brollosae* NEAE-115 аероб, а накопичення ферменту потребує відповідного насичення культуральної рідини повітрям, тож необхідно забезпечити достатньо високу концентрацію кисню у культуральній рідині для синтезу вторинного метаболіту- антибіотика. Для підготовки повітря його забирають через повітрязабірну шахту висотою 30 м, аби повітря було максимально чистим, далі подається на фільтри грубої очистки де звільняється від великих часточок(ступ. очищення 80 %) такий відсоток очищення може дати фільтр з грубим базальтовим волокном чи з тканиною Камінської, тож на даному етапі обираємо тканину Камінської, далі повітря під дією компресора стискається і подається переохолодження задля видалення зайвої вологи на краплевловлювач після воно подається на ресивер, щоб урівноважити його

швидкість і звільнити від ривкової подачі, це необхідно для ефективної фільтрації повітря. Після цього воно подається на фільтри другого і третього ступенів очистки де очищається на 98 % такий ступінь очистки можуть дати фільтри типу НЕРА або фільтр Петрянова, Також можна застосовувати фторопластові фільтри патронного типу, їх перевагою є висока термостабільність при стерилізації та можливість створення над малих пор для фільтрації до 0,01 мкм. обираємо фторопластовий фільтр для останньої стадії очистки стисненого повітря хоч і дорожчий [77,85].

Обґрунтування стадії підготовки та стерилізації поживного середовища для культивування *Streptomyces brollosae* NEAE-115 для виробництва аспаргінази.

Максимальна концентрація продукту у *Streptomyces brollosae* NEAE-115 досягається на 168 годину культивування за умов росту на середовищі наступного складу, г/ л[41].

Крохмаль- 20;

Аспаргін - 10;

Декстроза - 2;

KNO₃- 1;

K₂HPO₄- 1;

MgSO₄-0,5;

NaCl- 0,1;

Для підготовки посівного матеріалу у колбах на качалках та у інокуляторі середовище має аналогічний склад (г/л) :

Крохмаль- 20;

Аспаргін- 10;

Декстроза - 2;

KNO₃- 1;

K₂HPO₄- 1;

MgSO₄- 0,5;

NaCl- 0,1;

Приготування і стерилізація поживного середовища

Композиція А: Крохмаль, декстроза, аспаргін Режим стерилізації 112 °С протягом 20 хв оскільки ці компоненти є термостабільним. Склад композиції обґрунтовується термолабільністю компонентів, та відсутністю взаємодії між ними. Перед розчиненням всіх наступних компонентів крохмаль попередньо заварюють (заварювання – режим 80°С протягом 30 хв). Стерилізація буде проходити в колбах або у ферментері.

Композиція Б : KNO₃, K₂HPO₄, MgSO₄, NaCl. Режим стерилізації 131°С протягом 40 хв, рН при стерилізації становить 4-4,5. Склад компонентів обґрунтовується відсутністю взаємодії компонентів з утворенням малорозчинних сполук при низьких значеннях рН та термостабільністю. Стерилізація буде проводитися в колбах або у реакторах-збірниках[74].

Так як постає необхідність підготовки титрувальних розчинів для зниження рН до стерилізації солей та відновлення до його після, а також для доведення встановленого рН при культивуванні продуцента. Необхідно прорахувати кількість титрувальних розчинів. Приймаємо, що для пониження рН до 4, 0 та відновлення його до 7,0 у розчинах солей та у поживному середовищі перед початком культивування необхідно 4 мл/л кожного з титрантів при концентрації у 6 %. Загальна кількість титрантів буде становити:

$$V = (27+273+277+2690)*4/1000 = 11 \text{ л кожного з титрантів}$$

РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Специфікація обладнання наведеного на технологічній схемі розписана у таблиці 6.1.

Таблиця 6.1

Специфікація обладнання для апаратурної схеми виробничого біосинтезу

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика(виробник)
1	2	3	4
ПЗ-1	Повітрязабірник	1	Повітрязабірник радіальний DunarCM 21,4[86]
Ф-2	Фільтр грубої очистки	1	Фільтр для сжатого воздуха з акрилового волокна WHFIT 030 525PP част до 3 мкм E=90% продукт 315 м ³ /год «ТОВ OMEGA Air» [87]
К-3	Компресор	1	Компресор GX 7 фірми «Уралкомпресормаш», потужн 14 л/с, робоч тиск 1 МПа[88]
Т-4	Теплообмінник охолоджувач	1	Теплообмінник-охолоджувач серії AFR 11 «Уралкомпресормаш»[88]
РЕ-5	Ресивер	1	Ресивер РВ 320/10 «Уралкомпресормаш» [88]
Т-6	Теплообмінник -нагрівач	1	Теплообмінник «Уралкомпресормаш»[88]
Ф-7	Фільтр тонкої очистки	1	Фільтр для сжатого воздуха з боросилікатного волокна WHFIT 030 525PM част до 0.1 мкм E= 99,99 % продукт 315 м ³ /год «ТОВ OMEGA Air»[87]
Р-7, Р-8	Реактор для приготування миючого розчину та збирання відпрацьованого миючого розчину та промивання апаратів (для СІР-системи)	2	Реактор –змішувач з НЖ сталі марки 316 АОбладнений рубашкою, термоізоляцією, системою для внутрішньої мийки СІР та щитом керування. Об`єм реактор 6000 л, потужність двигуна 7,5 кВт. Виробник : «Fu Chen Technology Enterprises Co., Ltd»(Китай) [89].
Н- 9, Н-32	Насос відцентровий	2	Насос відцентровий Vortex с вихровим імпульсом до 500 м ³ /год ТОВ «Ватерпасс» [90]

НУХТ БТЕК 02.02.12 КР ПЗ

Зм	Арк.	№ документа	Підпис	Дата	Розділ 6. Специфікація обладнання	Літ.	Арк.	Аркушів
Розробник		Хоменко І.В.						
Перевір.		Карлаш Ю.В.					70	121
Реценз.						Кафедра БТМ⁷⁰		
Н.контр								
Затверд.		Пирог Т. П.						

Продовження таблиці 6.1

P-10, P-11	Реактори для приготування і стерилізації розчинів титрантів	2	Реактор хімічний типу СРЕН з НХ сталі AISI 321 обладнаний якорною мішалкою та рубашкою місткістю 25 л, потужність двигуна 0,75 кВт. Виробник: ТОВ «Азовхімсервіс», Україна[91].
H- 12, H-13	Насоси перистальтичні	2	Насос перистальтичний моделі Rotho PSF3 1-183 л/год ТОВ «Ватерпасс» [92]
P-14, P-16	Реактор для приготування композиції А та Б	2	Реактор хімічний типу СРЕН з НЖ сталі AISI 321 обладнаний якорною мішалкою та рубашкою місткістю 40 л, потужність двигуна 0,75 кВт. Виробник: ТОВ «Азовхімсервіс», Україна[93].
P-18	Реактор для приготування композиції Б	1	Реактор-змішувач РС 100 фармацевтичний НЖ сталі AISI 316 обладнаний турбінною мішалкою та рубашкою місткістю 100 л, потужність двигуна 1,2 кВт. Виробник: ТОВ «ООО «КАБЕЛЬФАРМТЕХНИКА»», Росія [94].
P-20	Реактор для приготування композиції А	1	Реактор хімічний типу СРЕН з НЖ сталі AISI 321 обладнаний якорною мішалкою та рубашкою місткістю 400 л, потужність двигуна 3 кВт. Виробник: ТОВ «Азовхімсервіс», Україна[95].
P-22	Реактор для приготування композиції Б	1	Реактор хімічний типу СРЕН з НЖ сталі AISI 321 обладнаний якорною мішалкою та рубашкою місткістю 1000 л, потужність двигуна 5 кВт. Виробник: ТОВ «Азовхімсервіс», Україна[96].
P-24	Реактор для приготування композиції А	1	Реактор хімічний типу СРЕН з НЖ сталі AISI 321 обладнаний якорною мішалкою та рубашкою місткістю 4000 л, потужність двигуна 6.8 кВт. Виробник: ТОВ «Азовхімсервіс», Україна[97].

Продовження таблиці 6.1

Н-15...Н-54	Насоси перистатичні	12	Насос перистатичний Rotho PSF1 30-2700л/год фірми <u>ТОВ «Ватерпасс»</u> [98]
Н-23,Н-25,	Насоси відцентрові	2	Насос відцентровий Vortex с вихровим імплером до 500 м ³ /год <u>ТОВ «Ватерпасс»</u> [99]
Ф-26.Ф-28, Ф-30	Фільтри індивідуальної очистки	3	Фільтр для стисненого повітря повітря фторопластовий з до 0,01 мкм ,Е=99,9999 [85]
I-27	Інокулятор	1	Ферментер BIOSTAT® C-DU на 50 л обладнаний системою автоматичного ведення процесу, рубашкою мийними головками СІР та турбінною мішалкою та барботером . фірми «Sartorius», виробник Німеччина [100]
ПА-29	Посівний апарат	1	Ферментери на 500 л обладнаний системою автоматичного ведення процесу, рубашкою мийними головками СІР та турбінною мішалкою та барботером виробник« <u>БИОТЕХНО»</u> , Росія [101]
ФР-31	Ферментер виробничий	1	Ферментери місткістю 5000 л обладнаний системою автоматичного ведення процесу, рубашкою мийними головками СІР та турбінною мішалкою та барботером « <u>БИОТЕХНО»</u> [102]
Д-33,Д-34 Д-35,Д-36 Д-37,Д-38 Д-39,Д-40 Д-41	Дозатори об'ємно вагові	9	Дозатор фірми «АСВІК ЦЕНТР» ДВП-6 [103]
Р-42, Р-46	Реактор-збірник для зберігання культуральної рідини та процесу осадження.	2	Реактор змішувач фірми «НПОФастовський Завод ХимическогоМашиностроения типу «СРЕН» об'ємом 6,3 м ³ оснащений мішалкою та рубашкою [104].
Ц-44, Ц-48	Центрифуга для відділення біомаси та осаду фермента	2	Центрифуга проточна AvantiJXN-26 потужністю 20000 об/хв [105].
Р-8	Реактор для приготування розчинів.	1	Реактор фармацевтичний на 1300 л виготовлений з харчової сталі та з вмонтованою мішалкою потужністю 3,0кВ [106].
УФУ- 51, УФУ- 55	Ультрафільтраційна установка	2	Ультрафільтраційна установка моделі KF-UF [107].

Продовження таблиці 6.1

X-53	Хроматографічна система	1	Хроматографічна система АКТАprocess обладнана колонкою 45-1800 л/год, обладнаний колонкоюВРG [108].
СШ-56	Вакуумна шафова сушарка	1	Шафа сушильна вакуумна СВ-50 [109].
ДУ-57	Дробарка молоткова	1	Молоткова дробарка ДКУ-500[110].
P-58	Реактор для приготування розчину для ін'єкцій		Реактор-змішувач РС 100 фармацевтичний НЖ сталі AISI 316 обладнаний турбінною мішалкою та рубашкою місткістю 100 л, потужність двигуна 1,2 кВт. Виробник: ТОВ «ООО “КАБЕЛЬФАРМТЕХНИКА”», Росія [94].
АМ-60	Апарат для наповнення флаконів	1	Автомат для наповнення флаконів потужністю 4,8 кВт для наповнення флаконів місткістю до 100мл [111].
АКІ-61	Апарат для пакування у коробки	1	Автомат для пакування у коробки фірми «АМ/А.М.Р.Р. Handels AG» [112]
ОА-62	Обклеювальний апарат	1	Обклеювальний апарат кругового типу дії типу One Wrap (F1) – LP виробництва фірми «Manuli Ukraine»[113]

РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

ДР 1.1.1. Підготовка розчину для миття поверхонь приміщення 0.1% розчину хлорного вапна

У збірник вносять концентрат і доливають питної води, вмикають перемішуючий пристрій та одержують робочий розчин засобу.

ДР 1.1.2. Підготовка 0.3% розчину мийно-дезінфікувального розчину «Біомой» для миття обладнання.

Для миття та дезінфекції обладнання необхідно полова об'ємів цього обладнання робочого розчину даному випадку засобу Біомой. Для приготування даного розчину у збірник-змішувач СІР-станції вносять відважені на вагах 60,7 кг засобу та доливають 16 м³ води питної та одержують потрібний робочий розчин ввімкненням мішалки.

ДР 1.2 Підготовка виробничих приміщень

ДР1.2.1 Генеральне прибирання

Генеральне прибирання проводиться 1 раз на 27 днів. (для генеральної мийки витрата робочого 0,1% розчину засобу хлорного вапна становить 37 л. При генеральному прибиранні миються всі мертві зони приміщення, вікна, двері підлога інші поверхні.

ДР1.2.2 Щоденне прибирання

Щоденне прибирання. Мийка здійснюється способом миття та протирання поверхні з використанням 0,1 % розчину засобу хлорного вапна (від ДР 1.1.1). Мийка проводиться 1 раз на добу.

Перед початком роботи персонал повинен пройти санітарно-гігієнічну підготовку, а саме миття рук туалетним або господарським милом та дезінфікацію 76%-им етиловим спиртом. Також обов'язковим є наявність медичного халату та шапочки.

					НУХТ БТЕК 02.02.12 КР ПЗ			
Зм	Арк.	№ документа	Підпис	Дата				
Розробник		<i>Хоменко І.В.</i>			<i>Розділ 7. Опис технологічної схеми</i>	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		<i>Карлаш Ю.В.</i>					74	121
Реценз.						Кафедра БТМ⁷⁴		
Н.контр								
Затверд.		<i>Пирог Т. П.</i>						

ДР1.3 Підготовка обладнання

ДР1.3.1 Миття обладнання

Миття обладнання буде проводитися циркуляційною СІР-мийкою з використанням СІР-станції(СІР-10). Мийка проводиться робочим розчином мийно-дезінфекційного засобу «Біомой» Кількість 0,3% робочого розчину(від ДР2.2.1) на 1 миття становить 17.22 м³ для всього обладнання. Температура миття 70-80 °С

ДР1.3.2 Стерилізація обладнання.

Стерилізація проводиться подачею гострої пари у апарат за температури 134 °С, упродовж 1 години.

ДР1.3.3 Технічний огляд обладнання.

Обладнання проходить такі етапи: Загальний *технічний огляд, перевірка на герметичність, пробний пуск, настройка параметрів*

Технічний огляд апаратури проводять після миття та перед запуском процесу аби виявити наявність чи присутність дефектів у ній.

ДР1.3.4 Деинфекція та ополіскування

На даній стадії за допомогою засобу Біомой відбувається ополіскування, миття, дезінфекція приміщень та обладнання, розташованому в них.

ДР 2 Підготовка аераційного повітря

ДР2.1 Забір повітря з атмосфери

Для підготовки повітря його забирають через повітрязабірну шахту висотою 30 м (ПЗ-1)

ДР2.2 Очищення від пилу і механічних часток

Повітря подається на фільтри грубої очистки де звільняється від великих часточок(ступ. очищення 80 %)(Ф-2) (Фільтр для стисненого повітря з акрилового волокна. E=80 % .

ДР2.3 Стиснення повітря

Повітря під дією компресора(К-3) стискається і нагрівається до температури 120-250. °С та стикається після виходу з робочої частини.

ДР2.4 Охолодження та видалення вологи.

Далі повітря подається на переохолодження для видалення вологи на краплевловлювач Т-4 де охолоджується до температури 25-30 °С. після воно подається на ресивер(РЕ-5)

ДР2.5 Нагрівання повітря

Повітря нагрівається до температури 40-50 °С після переохолодження на теплообміннику(Т-6).

ДР2.6 Очищення на головному фільтрі

Повітря піддається високій очистці на фільтрах другого і третього ступенів очистки матеріал фторопласт, де очищається на 99%(Ф-7) .

ДР 2.7 Очищення на індивідуальному фільтрі

Перед ферментером повітря проходить через його індивідуальний фільтр(обираємо боросилікатні фільтри де повітря очищається на 99,999 % (Ф-26, 28,30) [31].

ДР 3. Підготовка і стерилізація допоміжних розчинів

Для корекції рН при стерилізації солей та перед культивуванням необхідно приготувати титрувальні розчини 6 % концентрацій НСІ та NaOH. Необхідна кількість розчинів: 11 л кожного.

ДР 3.1. Підготовка і стерилізація розчину соляної кислоти

У реактор на 25 л(Р-10) вносять 9,61 л питної води і 1,38 л 36 % соляної кислоти, перемішують. Отримують 11 л 6 % хлорної кислоти. Стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С 20 хв.

ДР 3.2. Підготовка і стерилізація розчину гідроксиду натрію

На технічних вагах зважують 660 г гідроксиду натрію, переносять у збірник на 25 л (Р- 11) та додають 10,34 л питної води. Стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С 20 хв.

ДР 3.3. Підготовка і стерилізація розчину піногасника.

На один цикл ферментації з врахуванням всіх стадій підготовки посівного матеріалу та виробничий біосинтез необхідно 1645 мл 20% розчину сухого

піногасника. Дана кількість розрахована на інокулятор на 50 л, ферментер-посівний апарат на 500 л та виробничий ферментер на 5000 л.

Через на технічних вагах зважують 325,7 г сухого піногасника, поміщають у колбу на 2500 мл та додають 1303 мл питної води. Гомогенізують суміш перемішуванням та після повного розчинення розливають по флаконам для кожного ферментера чи інокулятора: 1 флакон на 50 л інокулятор (порція 15 мл розчину), 2 флакон на 500 л посівний матеріал (порція 150 мл розчину), 3 флакон на 5000 л ферментер (порція 15 мл розчину), у флаконах закривають кришку та стерилізують у автоклаві при 121 °С протягом 20 хв.

ДР 4. Приготування і стерилізація поживних середовищ.

ДР 4.1 Підготовка і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках 300 мл

Для вирощування інокуляту необхідно приготувати 300 мл поживного середовища

Таблиця 7.1

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 300 мл середовища.

Компоненти поживного середовища	Концентрація компонентів г/л	Кількість компонентів поживного середовища на 300 мл, г	Композиція	Кількість води, мл	Об'єм композиції, мл
Крохмаль	20	6	А	200	209,6
Аспаргін	10	3			
Декстроза	2	0,6			
KNO ₃	1	0,3	Б	89,62	90,4
K ₂ HPO ₄	1	0,3			
MgSO ₄	0,5	0,15			
NaCl	0,1	0,03			
Всього	34,6	10,38		289,62	300

ДР 4.1.1 Підготовка і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 6 г крохмалю, 3 г аспаргіну, 0,6 г декстрази. Наважку крохмалю поміщають у колбу об'ємом 500 мл перед цим додавши 200 мл води, нагрівають до температури 80 °С, перемішують. Додають до приготовленого розчину крохмалю наважку 3 г аспаргіну та 0,6 г декстрази, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112 °С упродовж 20 хв.

ДР 4.1.2 Підготовка і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 0,3 г нітрату калія, 0,3 г гідрофосфату калія, 0,5 г сульфату магнія, 0,1 хлориду натрія.. Наважку поміщають у колбу об'ємом 200 мл, додають 89,62 мл питної води, перемішують. Доводять рН розчину солей 6 % розчином соляної кислоти(ДР 1.1.1) до рН 4.5 за допомогою рН-метра. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С упродовж 40 хв.

ДР 4.2 Підготовка і стерелізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках 3 л

Таблиця 7.2

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 3 л середовища.

Компоненти поживного середовища	Концентрація компонентів г/л	Кількість компонентів поживного середовища на 3000 мл, г	Композиція	Кількість води, мл	Об'єм композиції, мл
Крохмаль	20	60	А	2000	2096
Аспаргін	10	30			
Декстроза	2	6			
KNO ₃	1	3	Б	896,2	904
K ₂ HPO ₄	1	3			
MgSO ₄	0,5	1,5			
NaCl	0,1	0,3			
Всього	34,6	103,8		2896,2	3000

ДР 4.2.1 Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 60 г крохмалю, 30 г аспаргину, 6 г декстрази. Наважку крохмалю поміщають у колбу об'ємом 5000 мл перед цим додавши 2000 мл води, нагрівають до температури 80 °С, перемішують. Додають до приготовленого розчину крохмалю наважку 30 г аспаргину та 6 г декстрази, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112 °С упродовж 20 хв.

ДР 4.2.2 Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 3 г нітрату калія, 3 г гідрофосфату калія, 5 г сульфату магнія, 1 хлориду натрія.. Наважку поміщають у колбу об'ємом 2000 мл, додають 896,2 мл питної води, перемішують. Доводять рН розчину солей 6 % розчином соляної кислоти(ДР 1.1.1) до рН 4.5 за допомогою рН-метра. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С упродовж 40 хв.

ДР 4.3 Підготовка і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі на 50 л.

Таблиця 7.3

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 27 л середовища.

Компонент и поживного середовища	Концентрація компонентів г/л	Кількість компонентів в поживного середовища на 27 л, г	Композиція	Кількість води, л	Конденсат(10%)	Об'єм композиції, л
Крохмаль Аспаргін Декстроза	20 10 2	540 270 54	А	17,13	2	20
KNO ₃ K ₂ HPO ₄ MgSO ₄ NaCl	1 1 0,5 0,1	27 27 13,5 2,7	Б	6,22	0,7	7
Всього	34,6	934,2		23,35	2,7	27

ДР 4.3.1 Підготовка і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 540 г крохмалю, 270 г аспаргину, 54 г декстрази. Наважку крохмалю поміщають у реактор Р-16 з 17,13 л води питної, яку до цього нагрівають до 80 °С, вмикають мішалку та перемішують, Додають до приготовленого розчину крохмалю наважку 270 г аспаргину та 54 г декстрази, перемішують. Перекачують композицію насосом Н-17 до інокулятора на 50 л І-27 Закривають запірну арматуру і стерилізують в при температурі 112 °С упродовж 20 хв.

ДР 4.3.2 Підготовка і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 27 г нітрату калія, 27 г гідрофосфату калія, 13,5 г сульфату магнія, 2,7 хлориду натрія.. Наважку поміщають у реактор Р-14, додають 6,22 л питної води, перемішують Доводять рН розчину солей 6 % розчином соляної кислоти(ДР 1.1.1) до рН 4.5 за допомогою рН-метра. Закривають запірну арматуру і стерилізують при температурі 131 °С упродовж 40 хв.

ДР 4.4 Приготування і стерилізація поживного середовища об`ємом 273 л для вирощування інокуляту в посівному апараті на 500 л.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 273 л середовища.

Компонент и поживного середовища	Концентрація компонентів г/л	Кількість компонентів в поживного середовища на 273 л, кг	Композиція	Кількість води, л	Конденсат (10%)	Об'єм композиції, л
Крохмаль	20	5,46	А	171,2	20	200
Аспаргін	10	2,73				
Декстроза	2	0,546				
KNO ₃	1	0,273	Б	65	7,3	73
K ₂ HPO ₄	1	0,273				
MgSO ₄	0,5	0,136				
NaCl	0,1	0,0273				
Всього	34,6	9,44		236.2	27,3	273

ДР 4.4.1 Підготовка і стерилізація композиції А

Через об'ємно-ваговий дозатор відважують 5,46 кг крохмалю, 2,73 кг аспаргину, 0.546 кг декстрози. Наважку крохмалю поміщають у реактор Р-20 з 171,2 л води питної, яку до цього нагрівають до 80 °С, вмикають мішалку та перемішують, Додають до приготовленого розчину крохмалю наважку 2,73 кг аспаргину та 0,546 кг декстрози, перемішують. Перекачують композицію насосом Н-21 до посівного апарата на 500 л ПА-29 Закривають запірну арматуру і стерилізують при температурі 112 °С упродовж 20 хв.

ДР 4.4.2 Підготовка і стерилізація композиції Б

Через об'ємно-ваговий дозатор зважують 0,273кг нітрату калія, 0,273 кг гідрофосфату калія, 0,136 кг сульфату магнія, 0.0273 кг хлориду натрія.. Наважку поміщають у реактор Р-18, додають 65 л питної води, перемішують Доводять рН розчину солей 6 % розчином соляної кислоти (ДР 1.1.1) до рН 4.5за допомогою рН-метра. Закривають запірну арматуру і стерилізують при температурі 131 °С упродовж 40 хв.

ДР 4.5 Підготовка і стерилізація поживного середовища для виробничого ферментера об'ємом 5 м³.

Таблиця 7.5

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 2690 л середовища.

Компонент и поживного середовища	Концентрація компонентів г/л	Кількість компонентів в поживного середовища на 2690 л, кг	Композиція	Кількість води, л	Конденсат (10%)	Об'єм композиції, л
Крохмаль	20	53,8	А	1714	200	2000
Аспаргін	10	26,9				
Декстроза	2	5,38				
KNO ₃	1	2,69	Б	614	69	690
K ₂ HPO ₄	1	2,69				
MgSO ₄	0,5	1,345				
NaCl	0,1	0,269				
Всього	34,6	93,07		2328	269	2690

ДР 4.5.1 Підготовка і стерилізація композиції А

Через об'ємно-ваговий дозатор відважують 53.8 кг крохмалю, 26,9 кг аспаргину, 5,38 кг декстрози. Наважку крохмалю поміщають у реактор Р-24 з 1714 л води питної, яку до цього нагрівають до 80 °С, вмикають мішалку та перемішують, Додають до приготовленого розчину крохмалю наважку 26,9 кг аспаргину та 5,38 кг декстрози, перемішують. Перекачують композицію насосом Н-25 до виробничого ферментера на 5000 л ФР-31 Закривають запірну арматуру і стерилізують при температурі 112 °С упродовж 20 хв.

ДР 4.5.2 Підготовка і стерилізація композиції Б

Через об'ємно-ваговий дозатор зважують 2,69кг нітрату калія, 2,69 кг гідрофосфату калія, 1,345 кг сульфату магнія, 0,269 кг хлориду натрія.. Наважку поміщають у реактор Р-22, додають 614 л питної води, перемішують Доводять рН розчину солей 6 % розчином соляної кислоти(ДР 1.1.1) до рН 4.5

за допомогою рН-метра. Закривають запірну арматуру і стерилізують при температурі 131 °С упродовж 40 хв.

ТП 5. Підготовка посівного матеріалу

*ТП 5.1 Підтримання колекційної культури *Streptomyces brollosae* NEAE-115*

Колекційну культуру *Streptomyces brollosae* NEAE-115 зберігають у вигляді ліофільно-висушеної біомаси у ампулах, оскільки штам генетично модифікованим, і потребує зберігання, що може забезпечити відсутність реверсії властивостей продуцента.

Незадовго до початку біосинтезу культуру « відновлюють» висівом у пробірки зі скошеним агаризованим середовищем МПА склад якого використовується для одержання посівного матеріалу. Всі роботи з колекційною культурою проводяться строго в асептичних умовах.

ТП 5.2 Одержання робочої культури на агаризованих середовищах.

Колекційну культуру відновлюють, в пробірках з агаризованим середовищем МПА, потім розсівають мікробіологічною петлею до ізольованих колоній на чашки Петрі із МПА і вирощують при температурі 30 °С упродовж 48 годин[5].

ТП 5.3 Вирощування культури на агаризованих середовищах

Отримані ізольовані колонії (від ТП 5.2) пересівають в пробірки зі скошеним МПА (одна ізольована колонія використовується для засіву однієї пробірки). В пробірки пересівають ізольовані колонії, що знаходяться на відстані не менше 1 см. Тривалість вирощування – 48 год, температура 30°C[5].

ТП 5.4 Вирощування культури в колбах на качалках(300 мл ПС)

Для вирощування посівного матеріалу у стерильну засівну колбу об'ємом 500 мл додають а асептичних умовах весь об'єм композиції А(200 мл) (від ДР 4.2.1) та композицію Б (100 мл) (від ДР 4.2.2) Загалом виходить 300 мл

Перемішують і розливають по 100 мл в три стерильних качалочних колби об'ємом 750 мл. Туди вносять посівний матеріал з пробірок з МПА засіяних продуцентом раніше. Параметри культивування : температура 30⁰С, тривалість 72 години.

ТП 5.5 Вирощування культури у колбах на качалках(3 л ПС)

У стерильну засівну колбу на 3000 мл додають у асептичних умовах композиції: композиція А(ДР 4.2.1)(2096 мл), композиція Б(ДР 4.2.2)(904 мл). Потім додають 300 мл посівного матеріалу (з 3 колб по 100 мл культури), зі стадії вирощування на качалках(ТП 5.4) через засівну колбу в асептичних умовах, і розливають по 20 стерильним качалочним колбам місткістю 750 л по дозі у 100 мл. Починають процес культивування.

Параметри культивування : температура 30⁰С, тривалість 72 год.

ТП 5.6 Вирощування культури у інокуляторі на50 л

У стерильний інокулятор (I-27), об'ємом 50 л, що містить стерильну композицію А (від ДР 4.3.1 20 л) додають стерильну композицію в асептичних умовах, за допомогою насосу перистальтичного Н-15 композицію Б(ДР 4.3.2)(7 л) (від реактора Р-14). Потім додають 3 л посівного матеріалу (з колб на качалках) (ТП 5.5) через засівну колбу в асептичних умовах, доводять рН до 7,0 титрувальним розчином гідроксиду натрія (ДР 3.1.2), додають 15 мл піногасника (від ДР 3.1.3)і починають процес культивування

Параметри культивування : рН-7,0 температура 30⁰С, тривалість 72 год, аерація, 200 об/хв.

ТП 5.7 Вирощування культури у посівному апараті на 500 л

У стерильний посівний апарат (ПА-29), об'ємом 500 л, що містить стерильну композицію А (від ДР 4.4.1 200 л) додають стерильну композицію в асептичних умовах, за допомогою насосу перистальтичного Н-19 композицію Б(ДР 4.3.2)(73 л) (від реактора Р-18). Потім додають 27 л посівного матеріалу (з інокулятора на 50 л) (ТП 5.6) за допомогою труби перетиснення, Доводять рН до 7,0 титрувальним розчином гідроксиду натрія

(ДР 3.1.2), додають 150 мл піногасника (від ДР 3.1.3)і починають процес культивування

Параметри культивування : рН-7,0 температура 30⁰С, тривалість 72 год, аерація, 200 об/хв.

ТП 6. Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 5 м³

ТП 6.1 Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 5 м³

Виробниче культивування здійснюють у ферментері з робочим об'ємом 5 м³ л(ФР-31). У стерильний ферментер, в асептичних умовах вносять, що містить стерильну композицію А (2000 л) (ДР 4.5.1) вносять стерильну композицію Б у кількості 690 л (від реактора Р-22) (ДР 4.5.2) і посівний матеріал з попередньої стадії через трубу перетиснення , з посівного апарата на 500 л в стерильних умовах. (ТП 5.7). Доводять рН до 7,0 титрувальним розчином гідроксиду натрія (ДР 3.1.2), додають 1480 мл піногасника (від ДР 3.1.3)і починають процес культивування. Під час процесу культивування підтримують концентрацію розчиненого кисню (рО₂) на рівні 40 % від насичення повітрям. Тривалість культивування становить 168 год. рН підтримується на рівні 7,0 температуру культивування 30⁰С. Кожні 8 годин відбирають проби для аналізу процесу ферментації(визначення концентрації біомаси, концентрації джерела вуглецю і азоту у культуральній рідині, активності ферменту). Біосинтез проводять орієнтовно 168 годин, остаточну зупинку процесу здійснюють при досягненні максимальної активності у 162,11 ОД/мл після значення якої збільшення активності не супроводжується.

ТП 7. Виділення продукту

ТП 7.1 Центрифугування.

З реактора Р-42 культуральну рідину подають на центрифугу Ц-44 та піддають відділенню при 15000 об/хв. протягом 40 хвилин. Відділену культуральну рідину подають на реактор Р-45.

ТП 7.2 Осадження ферменту.

У реактор Р-46 , додають 1200 кг сульфату амонію, перемішують при 120 об/хв та відстоюють при 25 °С упродовж 1 години. Після відстоювання одержану суспензію подають на центрифугу Ц-48.

ТП 7.3 Відділення осаду центрифугуванням.

З реактора Р-46 суспензію подають на центрифугу Ц-48. Центрифугують при 20000 об/хв з часом затримки у 10 хв, одержаний відфугований осад відвантажують у реактор Р-49.

ТП 7.4 Розчинення осаду у буфері.

До реактора Р-49 додають 200 л води очищеної. Перемішують при 25 °С упродовж 20 хв. Потужність перемішування становить 120 об/хв. Розчин подають у УФУ-51.

ТП 7.5 Концентрування ультрафільтрацією

Фракція проходить через УФУ-51, де відбувається процес концентрації і очищення білку від сульфату амонію. Отриманий концентрат направляється на колонку хроматографа Х-53.

ТП 7.6 Хроматографічне очищення ферменту

Одержаний концентрат після ультрафільтрації завантажують у колонку хроматографа Х-53 упродовж 12 годин при продуктивності 200-400 мл/год. Після чого елюють розчином буферу трис-НСLрН 8,0. Елюються до повного змивання ферменту.

ТП 7.7 Коцентрування ультрафільтрацією

Елюат після хроматографа Х-53 пропускають через установку ультрафільтрації УФУ-55, де відбувається процес концентрації і очищення білку від NaCl.

ТП 7.8 Висушування у вакуум-сушильній шафі

Після концентрування одержану субстанцію завантажують у вакуум сушильну шафу СШ-56. Процес сушки проходить при тиску 0.08-0.1 бар і температурі 30-35 °С упродовж 3 хв.

ТП 7.9 Подрібнення

Висушена субстанція вивантажується у ДУ-57, де подрібнюється до порошкоподібного стану.

ТП 8. Приготування готової лікарської форми.

ТП 8.1 Приготування розчину для ін'єкцій.

У реактор Р-58 вносять всю масу одержаних кристалів аспаргінази (орієнтовно 540 г) та завантажують 54 л води для ін'єкції. Перемішують упродовж 6 хвилин при 200 об/хв при температурі 35 °С.

ТП 8.2 Наповнення та стерилізація флаконів

Готовий розчин для ін'єкцій зі стадії *ТП 8.1* дозують за допомогою апарата АМ-60 у флакони, які перед даною стадією очищуються та висушуються. Дозуються по об'ємному датчику по 50 мл у флакон. Перед наповненням розчин для ін'єкцій пропускають через фільтр холодної стерилізації розміром пор 0.5-1 мкм. Після розливу флакон закупорюється.

ПМВ 9. Пакування готового продукту.

ПМВ 9.1 Пакування флаконів

За допомогою установки для пакування АКІ-61 флакони спочатку пакують у коробки з індивідуальною інструкцією а потім групують та пакують на цьому ж апараті у короба по 30 шт у кожному коробі. Після вичерпання всієї кількості флаконів процес пакування завершують.

ПМВ 9.2 Пакування у коробки

В спеціальні патронні місця завантажують гофрокартон для коробок, в окремі місце завантажують стрічку з сертифікаційним документом.

Починають пакування вручну завантажуючи пакети на стіл автомата, а автомат сам їх пакує у коробки.

ПМВ 9.3 Обклеювання коробів та формування серії.

Певну кількість коробів з попередньої стадії завантажують на платформу обклеювального апарата ОА-62. На матрицю даного апарата завантажують рулон з клейкою стрічною та документами які формують серію продукту. За допомогою робочої частини апарата обклеюють кількість коробів взятих на серію клейкою стрічкою і відвантажують на склад.

ЗВ 10. Знешкодження відходів

ЗВ 10.1. Знешкодження рідких відходів

Розчини миючих та дезінфікуючих засобів від ДР 1.2.1, ДР 1.2.2, ДР 1.3.1, ДР 1.3.3, ТП 7.3 знешкоджують в аеротенках очисних споруд.

ЗВ 10.2. Знешкодження твердих відходів

Тверді відходи від ДР 1.3.3, ТП 7.1, ТП 7.2, ТП 7.7 – осад і біомаса, висушуються та використовуються у якості сухої кормової маси.

ЗВ 10.3. Знешкодження газоподібних відходів

Відпрацьоване повітря, що надходить від ТП 5.4, ТП 5.5 ТП 6.1, відправляють у системи знешкодження повітряних відходів.

РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

Упродовж виробничого культивування періодично (кожні 8 год) відбирають проби культуральної рідини для мікробіологічного контролю, визначення концентрації біомаси, вмісту джерела вуглецю і азоту (амінний азот). З ферментера відбирається проба об'ємом 500 мл, що потім розподіляється по всім методам контролю.

Таблиця 8.1

Карта постадійного контролю виробництва аспаргінази

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю та показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
1	2	3	4	5
Кх, 1.1.1 Підготовка розчину для миття поверхонь приміщення 0.1% розчином хлорного вапна	Концентрація	Хімічний метод	Після приготування розчину	C=0,2%
Кх 1.1.2 Підготовка 0.3% розчину дезинфікувального розчину «Біомой» для миття обладнання	Концентрація	Хімічний метод	Після приготування розчину	C=0,3%
Кт 1.2.1 Генеральне прибирання	Підлога, стіни, обладнання, чистота	Візуальний огляд	Після прибирання	Чисте приміщення, відсутність пилу та бруду
Кт 1.2.2 Щоденне прибирання	Підлога, стіни, обладнання, чистота	Візуальний огляд	Після прибирання	Чисте приміщення, відсутність пилу та бруду

					НУХТ БТЕК 02.02.12 КР ПЗ			
Зм	Арк.	№ документа	Підпис	Дата				
Розробник	Хоменко І.В.				Розділ 8. Контроль виробництва	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.	Карлаш Ю.В.						89	121
Реценз.						Кафедра БТМ ⁸⁹		
Н.контр								
Затверд.	Пирог Т. П.							

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю та показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
1	2	3	4	5
Кт 1.3.1 Миття	Мийний розчин для обладнання, температура мийного розчину, чистота	Термометр технічний, годинник	Під час проведення операції	$T = 70-80^{\circ}\text{C}$
Кт 1.3.2 Стерилізація обладнання	Обладнання, температура стерилізації, час	Термометр, годинник	Температура визначається безперервно під час виконання операції	$t = 1 \text{ год}$ $T = 134^{\circ}\text{C}$
Кт 1.3.4 Дезінфекція та ополіскування	Мийний розчин для обладнання, температура мийного розчину, чистота	Термометр технічний,	Під час проведення операції	$T = 20^{\circ}\text{C}$

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю та показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
1	2	3	4	5
Кт 2.2 Очищення від пилу і механічних часток	Повітря на виході з фільтрів грубої очистки, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорта фільтра	Після очистки повітря на фільтрі грубої очистки	E= 80
Кт 2.3 Стиснення повітря	Стиснене повітря, температура, тиск	Манометр технічний, термометр технічний	Після компресування повітря	P= 0,35-0,5 МПа, t= 120-250 °C
Кт 2.4 Охолодження та видалення вологи	Охолоджене повітря, температура	термометр технічний	Після охолодження повітря	t= 20°C
Кт 2.5 Нагрівання повітря	Нагріте повітря, температура	термометр технічний	Після нагрівання повітря	t= 40-50°C
Кт 2.6 Очищення на головному фільтрі	Очищене повітря, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення	Після очищення повітря у фільтрі тонкої очистки	E= 99%
Кт 2.7 Очищення на індивідуальному фільтрі	Очищене повітря, ступінь очищення	Перевірка ступеня очищення згідно паспорта фільтра	Під час очищення повітря у фільтрі	E= 99,99%

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю та показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
1	2	3	4	5
Кт, Кх 3.1 Підготовка і стерилізація розчину соляної кислоти	Концентрат соляної кислоти, температура, час, стерильність, концентрація	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після	C= 6 % Діаметр пор 0,1 мкм Відсутність мікробіоти
Кт, Кх 3.2 Підготовка і стерилізація розчину гідроксиду натрію	Сухий гідроксид натрію, температура, час, стерильність, концентрація	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після	C= 6 % T=131°C t=20 хв відсутність мікробіоти
Кт, Кх 3.3 Підготовка і стерилізація розчину піногасника	Сухий піногасник, температура, час, стерильність, концентрація	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після	C= 20 % T=131°C t=20 хв відсутність мікробіоти

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю та показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Норматив на характерис тека показника, що визначається
1	2	3	4	5
Кт, Км 4.1.1 Підготовка і стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, стерильність.	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після	T=112 ⁰ C t=20 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1.2 Підготовка і стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, стерильність.	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після	T=131 ⁰ C t=40 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.2.1 Підготовка і стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, стерильність.	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після	T=112 ⁰ C t=30 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.2.2 Підготовка і стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, стерильність.	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після	T=131 ⁰ C t=40 хв Відсутність мікробіоти

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю та показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Норматив на характерис тека показника, що визначається
1	2	3	4	5
Кт, Км 4.3.1 Підготовка і стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, стерильність.	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після	$T=112^{\circ}\text{C}$ $t=20$ хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.3.2 Підготовка і стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, стерильність.	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після	$T=131^{\circ}\text{C}$ $t=40$ хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.4.1 Підготовка і стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, стерильність.	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після	$T=112^{\circ}\text{C}$ $t=20$ хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.4.2 Підготовка і стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, стерильність.	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після	$T=131^{\circ}\text{C}$ $t=40$ хв Відсутність мікробіоти

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю та показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Норматив на характеристика показника, що визначається
1	2	3	4	5
Кт, Км 4.5.1 Підготовка і стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, стерильність.	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після	T=112 ⁰ C t=20 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.5.2 Підготовка і стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, стерильність.	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після	T=141 ⁰ C t=40 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 5.4 Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці 300 л	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, чистота культури	Термометр технічний, годинник, тахометр, мікробіологічний контроль	Після вирощування культури в колбах на качалках	T=30 ⁰ C t=72 год Відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км, Кх 5.5 Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці 3000 л	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, чистота культури	Термометр технічний, годинник, тахометр, рН-метр мікробіологічний контроль	Під час вирощування посівного матеріалу в інокуляторі	T=30 ⁰ C t=72 год Відсутність сторонньої мікробіоти

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю та показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Норматив на характеристика показника, що визначається
1	2	3	4	5
Кт, Км, Кх 5.6 Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі на 50 л	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, чистота культури	Термометр технічний, годинник, тахометр, рН-метр мікробіологічний контроль	Під час вирощування посівного матеріалу в інокуляторі	pH=7 T=30 °C t=72 год n=200 об/хв Відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км, Кх 5.7 Вирощування посівного матеріалу у посівному апараті на 500 л.	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, чистота культури	Термометр технічний, годинник, тахометр, рН-метр мікробіологічний контроль	Під час вирощування посівного матеріалу в інокуляторі	pH=7 T=30°C t=72 год Відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км, Кх 6.1 Виробничий біосинтез	Культуральна рідина, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, чистота культури, концентрація біомаси виражена	Термометр технічний, годинник, тахометр, рН-метр мікробіологічний контроль, визначення активності ферменту	Під час вирощування культури в ферментері, відбір проб: кожні 8 годин	pH=7 T=30 °C t=168 год n=200 об/хв Відсутність сторонньої мікробіоти,

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю та показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Норматив на характерис тека показника, що визначається
1	2	3	4	5
Кт 7.1 Центрифугування	Частота обертів, тривалість процесу, температура	Тахометр, годинник, термометр	Показники перевіряються безпосередньо перед під час процесу	t = 40 хв, n = 15000 об/хв T = 25 °C
Кт 7.2 Осадження ферменту	Частота обертів мішалки, тривалість процесу, температура	Тахометр, годинник, термометр	Показники перевіряються безпосередньо перед під час процесу	t = 40 хв, n = 120 об/хв T = 25 °C
Кт 7.3 Відділення осаду центрифугуванням	Частота обертів, тривалість процесу	Тахометр, годинник	Показники перевіряються безпосередньо перед під час процесу	t = 10 хв, n = 20000 об/хв
Кт 7.4 Розчинення осаду у буфері	Частота обертів мішалки, тривалість процесу, температура	Тахометр, годинник, термометр	Показники перевіряються безпосередньо перед під час процесу	t = 40 хв, n = 20 об/хв T = 25 °C
Кт 7.6 Хроматографічне очищення ферменту	Кількість виходу, рівень рН	Датчики обладнання	Показники перевіряються безпосередньо перед під час процесу	V = 200-400 мл/год рН = 8.0
Кт 7.8 Висушування у вакуум-сушильній шафі	Температура, час, тиск	Термометр, годинник, манометр	Температура контролюється безпосередньо під час проходження процесу	T = 30-35 °C t = 3 хв p = 0.08 – 0.1 бар

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю та показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Норматив на характеристика показника, що визначається
1	2	3	4	5
Кт 8.1 Приготування розчину для ін'єкцій	Температура, оберти мішалки	Термометр, тахометр	Показники перевіряються безпосередньо перед під час процесу	T=35 °C n=20 об/хв
Кт 8.2 Наповнення та стерилізація	Кількість продукту	Дозатор	Показники перевіряються безпосередньо перед під час процесу	Кількісне
Кт, Км 9.1 Пакування флаконів	Цілісність пакету	Візуально	Перевірка пакету на герметичність	Кількісне
Кт, Км 9.2 Пакування у коробки	Цілісність пакету	Візуально	Перевірка пакету на герметичність	Кількісне
Кт, Км 9.3 Обклеювання коробів та формування серії	Цілісність пакету	Візуально	Перевірка пакету на герметичність	Кількісне

Мікробіологічний контроль. Здійснюється розсівом на чашки Петрі з агаризованими середовищами та мікроскопуванням. Культуральну рідину розсівають до ізольованих колоній на чашки Петрі з середовищем МПА для виявлення сторонніх бактерій, та з середовищем Сабуро) – для виявлення дріжджів і грибів[74].

Для оцінки морфологічних ознак продуцента його клітини фарбують за грамом:

Готують мазковий препарат та фіксують його на полум'ї пальника. На фіксований мазок кладуть просочений фарбою генціанвіолету фільтрований папір і наносять 2-3 краплі дистильованої води і через 2 хвилини його

знімають, а залишки фарби зливають. На мазок наносять розчин Люголя і через 2 хвилини його зливають.

Мазок знебарвлюють 96% етиловим спиртом, наносячи його на 20-30 сек.. Мазок ретельно промивають водою. На 1-2хв наносять фуксин Пфейфера. Фарбу змивають, а препарат висушують, і мікроскопують. Грампозитивні мікроби фарбуються у фіолетовий колір, і грамнегативні у червоний[114].

Для мікроскопування використовують препарати «роздавлена крапля». Препарат «роздавлена крапля» готують на знежиреному предметному склі, на яке наносять маленьку краплю культуральної рідини або міцелію, накривають накривним скельцем і розглядають з об'єктивом 40х, а також мікроскопують препарат з імерсійною системою на $\times 90$. При оцінці морфолого-культуральних ознак продуцента перш за все звертають увагу, на характерні особливості колоній продуцента(*рис 8.1*) та примікроскопії (*рис 8.2*) [74].



Рисунок 8.1 Streptomyces broollosae[71].

Опис колонії має наступний вигляд: колонії круглясті дещо зморщені, кремово- рожевого або злегка червоного забарвленнябілувате забарвлення біля кінців колонії [71].

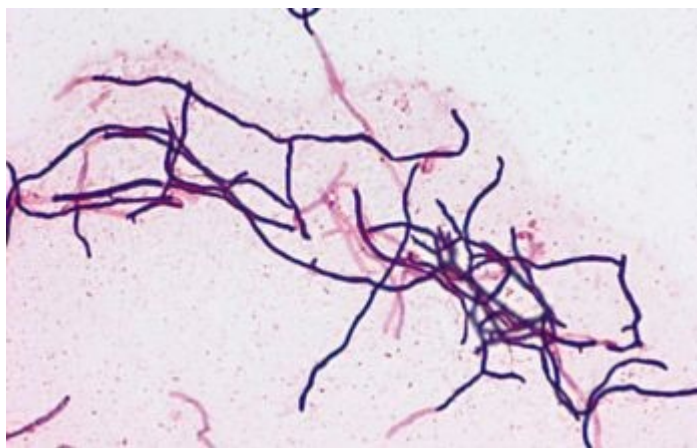


Рис 8.2 Мікроскопія + фарбування за грамом *Streptomyces brodiaei*[115].

Концентрація джерела вуглецю в середовищі.

Крохмаль - полісахарид , що складається з глюкози, а оскільки перед споживанням мікроорганізми гідролізують полісахариди позаклітинно до мономерів(даному випадку глюкози) тож кількість глюкози буде еквівалентною кількості крохмалю. Отже метод визначення крохмалю як джерела вуглецю буде модифікованим методом визначення глюкози.

Техніка визначення

Відбирають пробу культуральної рідини у кількості 20 мл, пробу розводять у 5 разів додаючи 80 мл дистильованої води. Далі розведену пробу центрифугують протягом 40-50 хвилин при 7000-8000 обертів на хвилину. Після цього надосадову рідину з центрифужних пробірок зливають та фільтрують на паперовому фільтрі. Фільтрат у кількості 45,5 мл переносять у колбу та додають 4,5 мл буферного розчину. Відбирають 20 мл фільтрату та переносять у пробірку великого об'єму . До пробірки вносять 10 мл 1-2% розчину комплексного амілолітичного ферментного препарату. Пробірки ставлять у термостат при параметрах 30 °C на 50-60 хвилин. За цей час весь декстрин має гідролізувати до глюкози та низької кількості мальтози. Після завершення часу у пробірку вносять 5-10 мл 0,3 М розчину трихлороцтової кислоти[116].

Після цього розчин фільтрують та переносять певний об'єм проби, у мірну колбу, таким чином, щоб розвести пробу у 250-1000 разів, далі від розведеного розчину відбирають 5-10 мл і переносять у 20 мл 20 мМ буферного розчину системи: KH_2PO_4 — Na_2HPO_4 з рН 7.2. До даної системи додають глюкозооксидазу іммобілізовану на полімері ЕДТ (20 мМ фосфатному буфері, рН 6,2, яка складалася з 10–2 М 3,4-етилендіокситіофену, 10–3 М поліетиленгліколю та 30 мг/мл розчину ГОД) у вигляді суспензії.

Вимірювання концентрації глюкози здійснюється за допомогою амперометричного перетворювального приладу, що складається з триелектродної системи з друкованим електродом SensLab (SensLab GmbH, Leipzig, Німеччина) Вимірювання проводять опусканням датчика амперометричного приладу у розчин-систему з глюкозооксидазою та підготовленою культуральною рідиною.

Величина, що вимірюється- це сила струму, що визначається у нА. Концентрацію глюкози визначають за градуовальним графіком залежності сили струму (нА) і концентрації глюкози (мМ). Одержане значення концентрації спочатку перемножують на ступінь розведення а потім переводять концентрацію з мМ у г у певному об'ємі чи г/л[117].

Визначення джерела азоту.

Визначення концентрації нітрат іонів.

Концентрація нітратів, основне джерело яких є натрієва селітра-одне з основних джерел азоту буде визначатися за допомогою приладу-іонометра «Нитратанализатор рХ-150.1МИ»(діапазон вимірів: 10^{-4} -100 г/кг(л) нітрат-іонів). Пробу готують наступним чином: відбирають 20 мл проби з ферментера, фільтрують пропусканням через паперовий фільтр 2-3 рази, далі відбирають 10 мл фільтрату, розводять 50 мл дистильованої води. Розведення проводять хімічній склянці місткістю 100 мл. Далі місткість ставлять на піддон іонометра і окунають у розчин електроди, після ввімкнення приладу. Зняті

показання перемножують на розведення створене при додаванні 50 мл дистильованої води і перераховують на 1 л середовища[118].

Визначення концентрації біомаси.

Непрямий метод:

Концентрацію біомаси у г/л культуральної рідини визначають за допомогою фотоелектроколориметра(ФЕК), а саме за різницею оптичної густини D клітинної суспензії та еталонного зразка і переводять відповідне значення оптичної густини за допомогою калібрувального графіка у грами.

Концентрацію біомаси визначають за оптичною густиною клітинної суспензії з наступним перерахунком на кількість грамів на літр за допомогою калібрувального графіка відносно еталонного зразка.

Для цього у пробірки вносимо 9 мл дистильованої води і 1мл культуральної рідини. Кількість розведень становить 5-6 разів. Суміш перемішують при кожному розведенні. Після останнього розведення вимірюють оптичну густина на фотоелектроколориметрі (при довжині хвилі 540 нм) у кюветі товщиною 10 мм. Для більш точного визначення вимір проводять три рази поспіль і знаходять середнє значення. Те саме роблять з контрольним зразком який представляє собою розведене в стільки ж разів свіже поживне середовище для культивування. Після цього одержані значення оптичної густини віднімають і отримують різницю. За допомогою калібрувального графіка переводять це число у концентрацію біомаси в одиниці г/л[119].

Визначення активності L-аспаргінази.

Активність аспаргінази.

Пробу культуральної рідини у кількості 20 мл відбирають у стерильних умовах і вносять у стерильну пробірку. Вміст пробірки центрифугують в режимі 8000 об/хв на 15 хвилин. Фугат відділяють від біомаси в окрему пробірку. Фільтрують через паперовий фільтр 2 рази до майже прозорої або прозорої рідини.

Визначення активності фермента відбувається шляхом вимірювання кількості аміаку, що виділяється при неслеризації. Реакційну суміш, що містить 1,5 мл 0,04 М L-аспарагіну, готують у 0,05 М трис-НСІ-буфері, рН 8,6 та 0,5 мл ферменту, щоб довести загальний об'єм до 2 мл. Пробірки інкубують при 37 ° С протягом 30 хвилин. Реакцію припиняють додаванням 0,5 мл 1,5 М трихлороцтової кислоти (ТСА). Білок видаляють центрифугуванням при 10000 × g протягом 5 хв і виділений аміак у надосадовій рідині визначають колориметрично шляхом прямої неслеризації, додаючи 1 мл реагенту Несслера в пробірки, що містять 0,5 мл прозорого супернатанту та 7 мл дистильованої води, інкубують при кімнатній температурі протягом 20 хв. Жовте забарвлення вказує на наявність аміаку: при більших концентраціях може утворитися коричневий осад. Жовтий колір визначають за допомогою УФ спектрофотометра (спектрофотометр Optizen Pop –UV / Vis) при 480 нм. Кількість виділеного аміаку розраховують за стандартною кривою амонію (хлориду амонію). Одна одиниця (U) L-аспарагінази визначається як кількість ферменту, який каталізує утворення 1 ммоль аміаку з L-аспарагіну за хвилину при 37 ° С і рН 8,6. Активність ферменту виражають в одиницях на грам сухого ферментованого субстрату (Од / г) [79].

Прозорість.

Розчин 1 г препарату в 10 мл води для ін'єкцій повинен бути прозорим або по ступені мутності не повинен перевищувати еталонний розчин 1 (ДФУ 2.2.1).

Кольоровість.

Кольоровість розчину 1 г препарату в 10 мл води для ін'єкцій повинна бути не інтенсивніше еталона №6г (ДФУ 2.2.2, метод II).

Визначення рН. Від 7,0 до 9,0 (10% водний розчин препарату (потенціометрично; ДФУ 2.2.3.).

Стерильність. Препарат повинен бути стерильним. Випробування проводять відповідно до вимог, зазначених в ДФУ, 2.6.1. Препарат в умовах

випробування має антимікробну дію. Посів на поживні середовища здійснюється методом мембранної фільтрації. Вміст кожного з 10 флаконів з дозуванням 0,5 г ампіоксу розчиняють у 5 мл розчину 9 г/л натрію хлориду, переносять у колбу, яка містить 100 мл того самого розчинника і негайно фільтрують крізь один мембранний фільтр. Після закінчення фільтрації мембрану промивають п'ятьма порціями по 100 мл розчину 9 г/л натрію хлориду або рідини №1, розрізають навпіл і вміщують у поживні середовища [120].

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Лейкоз та лейкемія Електронний ресурс: [режим доступу]
<https://empendium.com/ua/chapter/B27.II.15.3>
2. Аспаргіназа Електронний ресурс: [режим доступу]
<https://compendium.com.ua/uk/akt/65/3307/asparaginasum/>
3. R. E. Peterson and A. Ciegler. L-Asparaginase Production by Various Bacteria. *Applied Microbiology*, -1969- 17(6): 929-930.
4. Akansha Saxena*, Ramraj Upadhyay & Naveen Kango. Isolation and identification of actinomycetes for production of novel extracellular glutaminase free L-asparaginase. *Indian Journal of Experimental Biology*-2015- 53(1): 786-793
5. Rajesh Kumar Munaganti, Vijayalakshmi Muvva*, Mani Deepa Indupalli. studies on optimization of l-asparaginase production by arthrobacter kerguelensis vl-rk_09 isolated from mango orchards. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*-2015- 7(9): 112-115
6. R. Balagurunathan, M. Radhakrishnan, S.T. Somasundaram. L-glutaminase Producing Actinomycetes from Marine Sediments –Selective Isolation, Semi Quantitative Assay and Characterization of Potential Strain. *Australian Journal of -Basic and Applied Sciences*, -2010- 4(5): 698-705,
7. Palaniappan Sivasankar*, Shanmugam Sugesh, Packiyaraj Vijayanand, Kannan Sivakumar, Shanmugam Vijayalakshmi, Thangavel Balasubramanian and Packium Mayavu, Efficient production of l-asparaginase by marine Streptomyces sp. isolated from Bay of Bengal, India, India. *Indian Journal of Experimental Biology*-2013- 7(3): 4015-4021. DOI: 10.5897/AJMR12.2184

8. Balakrishnan Meena, Lawrance Anburajan, Palaiya Sukumaran, Dheenan, Mehmuna Begum, Nambali Valsalan Vinithkumar, Gopal Dharani, Ramalingam Kirubakaran. Novel glutaminase free L-asparaginase from *Nocardioopsis alba* NIOT-VKMA08: production, optimization, functional and molecular characterization. *Bioprocess Biosyst Eng*-2014- 25(7): 157-159. DOI 10.1007/s00449-014-1277-3

9. M. Usha Kiranmayi Sudhakar Poda. Production and optimization of L-asparaginase by an actinobacterium isolated from Nizampatnam mangrove ecosystem. *Journal of Environmental Biology*-2015- 35(1): 799-805.

10. M. Mohamed Mahroop Raja1*, A. Raja1, S. Mohamed Salique, and P. Gajalakshmi. COMPARATIVE STUDIES ON EFFECT OF CARBON AND NITROGEN SOURCES ON L-ASPARAGINASE PRODUCTION. *Int J Appl Sci Biotechnol*, -2016- 4(4): 452-457. DOI: 10.3126/ijasbt.v4i4.16241

11. Thenmozhi C, Sankar R, Karuppiyah V, Sampathkumar P*. L-asparaginase production by mangrove derived *Bacillus cereus* MAB5: optimization by response surface methodology. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*-2011- 45(4): 486-491

12. Richi V. Mahajan, Saurabh Saran, Karthikeya Kameswaran, Vinod Kumar, R.K. Saxena. Efficient production of L-asparaginase from *Bacillus licheniformis* with low-glutaminase activity: Optimization, scale up and acrylamide degradation studies. *Bioresource Technology*-2012- 125(1): 11-16.

13. Makky E. A, Jee Jian Ong, Md. Rezaul Karim and Lee C. M.. Production and optimization of L-asparaginase by *Bacillus* sp. KK2S4 from corn cob. *African Journal of Biotechnology* -2013- 12(13): 2654-2658, DOI: 10.5897/AJB2013.12231

14. Vidhya Moorthy, Aishwarya Ramalingam, Alagarsamy Sumanth and Rajesh Tippapur Shankaranaya, purification and characterisation of extracellular L-

asparaginase from a soil isolate of *Bacillus* sp..Afr. J. Microbiol. Res. -2010- 4(18): 1862-1867.

15. Sarita Devi and Wamik Azmi. One step purification of glutaminase free l-asparaginase from *erwinia carotovora* with anticancerous activity. Pharmaceutical Science -2012- 2(3): 36-41.

16. Seyedeh Laleh Dashtban Kenari, Iran Alemzadeh, Vida Maghsodi. Production of l-asparaginase from *Escherichia coli* ATCC11303: Optimization by response surface methodology. Food and Bioproducts Processing-2011- 8(9): 315–321

17. Renuka D Joshi, Nikhilesh S Kulkarni. Optimization studies on L-asparaginase production from endophytic Bacteria. International Journal of Applied Research-2016- 2(3): 624-629

18. Rajeswara Reddy Erva, Ajgebi Nath Goswami, Priyanka Suman, Ravali Vedanabhatla, and Satish Babu Rajulapati. Optimization of L-asparaginase production from novel *Enterobacter* sp. by submerged fermentation using response surface methodology. Preparative biochemistry and biotechnology -2017- 47 (3): 219–228

19. Arastoo Badoei-Dalfard, Zahra Karami, Narjes Ramezani-pour. Purification and characterization of l-asparaginase from *Pseudomonas aeruginosa* strain SN004: Production optimization by statistical methods. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology-2017- 47 (3): 219–228 DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2015.06.007>

20. Gurunathan Baskar, Sahadevan Renganathan. Optimization of Media Components and Operating Conditions for Exogenous Production of Fungal L-asparaginase. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology-2011- 38 (2): 270-279 DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2015.06.007>

21. Abeer A. El-Hadi, Heba A. El-Refai, Mona S. Shafei, Rania Zaki, Hanan Mostafa. Statistical optimization of L-asparaginase production by using *Fusarium solani*. *Egyptian Pharmaceutical Journal*-2016- 16 (1): 16–23.

22. Dani Benchamin, Sreejai R, Athira L, Jency Roshan F, Sujitha S and Beena S Kurup. Production and characterization of L-Asparaginase isolated from *Aspergillus fumigatus*. *The Pharma Innovation Journal*-2019- 8 (3): 220-223

23. Lynette Lincoln, Francois N. Niyonzima, Sunil S. More¹. Purification and properties of a fungal l-asparaginase from *trichoderma viride* pers: Sf Grey. *J Microbiol Biotech Food Sci* -2015- 4 (4): 310-316

24. Kiran Babu Uppuluri*, Ravi Kumar V. R. Dasari, Vinod Sajja, Annie Shanan Jacob, and D. Sri Rami Reddy Optimization of L-Asparaginase Production by Isolated *Aspergillus niger* C4 from Sesame (black) Oil Cake under SSF using Box–Behnken Design in Column Bioreactor. *International Journal of Chemical Reactor Engineering*-2013- 11 (1): 103–109 DOI: doi 10.1515/ijcre-2012-0064

25. Muhammad Anjum Ziaa, Rabia Bashira, Ishtiaq Ahmedb, Tehreema Iftikharb. Production, Purification & Characterization of Extracellular L-Asparaginase (AntiCancerous Enzyme) From *Aspergillus niger*. *Jurnal Teknologi* - 2013- 6 (2): 47-51
24. Muhammad Anjum Ziaa, Rabia Bashira, Ishtiaq Ahmedb, Tehreema Iftikharb. Production of L-Asparaginase from *Aspergillus Niger* using Agro Wastes By-Products in Submerged Fermentation Process. *Jurnal Teknologi* - 2013- 6 (2): 47-51

26. Luhana K. K., Dave A. A., Patel K. U.. Production of L-Asparaginase from *Aspergillus Niger* using Agro Wastes By-Products in Submerged Fermentation Process. *International Journal of Chemtech Applications*-2013- 2 (3): 14-25

27. Monica Thakur, Lynette Lincoln, Francois N., Niyonzima and Sunil S. Isolation, Purification and Characterization of Fungal Extracellular L-Asparaginase from *Mucor hiemalis* Biocatal Biotransformation 2014, 2:2
<http://dx.doi.org/10.4172/2324-9099.1000108>

28. R. Balagurunathan, M. Radhakrishnan, S. Thirugnanasambandan. L-glutaminase Producing Actinomycetes from Marine Sediments –Selective Isolation, Semi Quantitative Assay and Characterization of Potential Strain. Aust. J. Basic & Appl. Sci., 4(5): 698-705, 2010

29. Richi V. Mahajan, Saurabh Saran, Karthikeya Kameswaran, Vinod Kumar, R.K. Saxena. Efficient production of l-asparaginase from *Bacillus licheniformis* with low-glutaminase activity: Optimization, scale up and acrylamide degradation studies. Bioresource Technology, Volume 125, 2012
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.08.086>.

30. Rajeswara Reddy Erva, Ajgebi Nath Goswami, Priyanka Suman, Ravali Vedanabhatla & Satish Babu Rajulapati(2017)Optimization of L-asparaginase production from novel *Enterobacter* sp., by submerged fermentation using response surface methodology,Preparative Biochemistry & Biotechnology,47:3,219-228,DOI: [10.1080/10826068.2016.1201683](https://doi.org/10.1080/10826068.2016.1201683)

31. Seyedeh Laleh Dashtban Kenari, Iran Alemzadeh, Vida Maghsodi, Production of l-asparaginase from *Escherichia coli* ATCC 11303: Optimization by response surface methodology, Food and Bioproducts Processing, Volume 89, Issue 4, 2011, Pages 315-321,

<https://doi.org/10.1016/j.fbp.2010.11.002>.

32. Yasser Mostafa, Suliman Alrumman, Saad Alamri, Mohamed Hashem, Kholood Al-izran, Mohammad Alfaifi, Serag Eldin Elbehairi, Tarek Taha, Enhanced production of glutaminase-free l-asparaginase by marine *Bacillus velezensis* and cytotoxic activity against breast cancer cell lines,Electronic Journal of Biotechnology, 2019; 42; 6-15,
<https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2019.10.001>.

33. A.J. Shah, R.V. Karadi and P.P. Parekh. Isolation, Optimization and Production of L-asparaginase from Coliform Bacteria. [Asian Journal of Biotechnology](#) 2010 2(3):169-177 DOI: 10.3923/ajbkr.2010.169.177

34. M. Hymavathi, T. Sathish, P. Brahmaiah, and R. S. Prakasham. Impact of Carbon and Nitrogen Sources on L-Asparaginase Production by Isolated *Bacillus circulans*. [Chemical and Biochemical Engineering Quarterly](#) 2010; 24(4):473-480

35. Arastoo Badoei-Dalfard. Purification and characterization of l-asparaginase from *Pseudomonas aeruginosa* strain SN004: Production optimization by statistical methods. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2015; 4(3), Pages 388-397
<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2015.06.007>.

36. Gurunathan Baskar [a], and Sahadevan Renganathan. Optimization of Media Components and Operating Conditions for Exogenous Production of Fungal L-asparaginase. *Chiang Mai J. Sci.* 2011; 38(2) : 270-279

37 El-Hadi AA, El-Refai HA, Shafei MS, Zaki R, Mostafa H. Statistical optimization of L-asparaginase production by using *Fusarium solani*. *Egypt Pharmaceut J* 2017;16:16-23 DOI: 10.4103/1687-4315.205825

38. Thenmozhi C, Sankar R, Karupiah V, Sampathkumar P. L-asparaginase production by mangrove derived *Bacillus cereus* MAB5: Optimization by response surface methodology. *Asian Pac J Trop Med.* 2011;4(6):486-491. doi:10.1016/S1995-7645(11)60132-6

39. Kavitha A, Vijayalakshmi M. A study on L-asparaginase of *Nocardia levis* MK-VL_113. *ScientificWorldJournal.* 2012;2012:160434. doi:10.1100/2012/160434

40. El-Naggar Nel-A, Moawad H, El-Shweihy NM, El-Ewasy SM. Optimization of Culture Conditions for Production of the Anti-Leukemic Glutaminase Free L-Asparaginase by Newly Isolated *Streptomyces olivaceus* NEAE-119 Using Response Surface Methodology. *Biomed Res Int.* 2015;2015:627031. doi:10.1155/2015/627031
41. El-Naggar, N.E., Moawad, H., El-Shweihy, N.M. et al. Process development for scale-up production of a therapeutic L-asparaginase by *Streptomyces brolosae* NEAE-115 from shake flasks to bioreactor. *Sci Rep* 9, 13571 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49709-6>
42. B.Chinna Narasaiah, V.Leelavathi, Anil Kumar.Manne, G.Swapna, Moparthy John Paul, P.Mariya Dasu. Screening of *Streptomyces Albus* CN-4 For Enzyme Production and Optimization of L-Asparaginase .*International Journal of Scientific and Research Publications*, Volume 5, Issue 3, March 2015 ISSN 2250-3153
43. Ganeshan Shakambari a, Babu M Sumia, Balasubramaniam Ashokkumar b, Peramachi Palanivelu a and Perumal Varalakshmi. Industrial effluent as a substrate for glutaminase free L-asparaginase production from *Pseudomonas plecoglossicida* strain RS1; media optimization, enzyme purification and its characterization. *RSC Adv.*, 2015,5, 48729-48738
44. Kruthi Doriya, Devarai Santhosh Kumar, Optimization of solid substrate mixture and process parameters for the production of L-asparaginase and scale-up using tray bioreactor. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, Volume 13, 2018, Pages 244-250, ISSN 1878-8181, <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.01.004>.
45. N.S. Mohan Kumar, Ravi Ramasamy, H.K. Manonmani. Production and optimization of l-asparaginase from *Cladosporium* sp. using agricultural residues in solid state fermentation. *Industrial Crops and Products*, 43, 2013, Pages 150-158, ISSN 0926-6690, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.07.023>.

46. Chanakya Pallem. Solid-state fermentation of corn husk for the synthesis of Asparaginase by *Fusarium oxysporum*. Asian Journal of Pharmacy and Pharmacology 2019; 5(4):678-681
DOI: <https://doi.org/10.31024/ajpp.2019.5.4.5>

47. Ruma, K. & George, Tijith & Shanavas, Jisha. (2017). Production and Optimization of Extra Cellular L-asparaginase by *Fusarium solani* Isolated from *Withania somnifera*. Journal of Biologically Active Products from Nature. 7. 81-88. DOI:10.1080/22311866.2017.1325007.

48. G.S. Isaac and M.A. Abu-Tahon. Production of Extracellular Anti-leukemic Enzyme L-asparaginase from *Fusarium solani* AUMC 8615 Grown under Solid-State Fermentation conditions: Purification and Characterization of The Free and Immobilized Enzyme. Egypt. J. Bot., Vol. 2016; 56; No.3, pp. 799-816 DOI: [10.21608/ejbo.2016.3776](https://doi.org/10.21608/ejbo.2016.3776)

49. Hosamani R. and Kaliwal B.B. isolation, molecular identification and optimization of fermentation parameters for the production of l-asparaginase, an anticancer agent by *fusarium equiseti*. International Journal of Microbiology Research. Vol. 3, Issue 2, 2011, pp-108-119.

50. El-Naggar, Noura & Moawad, Hassan & A.M.Abdelwahed, Naira. Optimization of fermentation conditions for enhancing extracellular production of L-asparaginase, an anti-leukemic agent, by newly isolated *Streptomyces brolosae* NEAE-115 using solid state fermentation. Annals of Microbiology 2017, Volume 67, pp 1–15. DOI 10.1007/s13213-016-1231-5

51. Abhinav Shrivastava, Abdul Arif Khan, Archana Shrivastav, Sudhir K. Jain, 3 and Pradeep K. Singhal. KINETIC STUDIES OF L-ASPARAGINASE FROM *Penicillium digitatum*. Jurnal Teknologi -2012- 45 (1): 574–581

52. Abraham Asha , Baliga Pallavi. Production? Purification and characterization of extra cellular L-asparaginase having antoneoplastic activity from *Fusarium sp.* Journal of Advance Researches in Biological Sciences, -2012- 4 (4): 293-301

53. Noura El-Ahmady E-Naggar, Hassan Moawad, Nancy M. El-Shweihy, and Sara M. El-Ewasy. Optimization of Culture Conditions for Production of the Anti-Leukemic Glutaminase Free L-Asparaginase by Newly Isolated *Streptomyces olivaceus* NEAE-119 Using Response Surface Methodology .BioMed Research International, -2015- 70 (2): 1-5

54. Munaganti, Dr Rajesh & Muvva, Vijayalakshmi & Indupalli, Mani. Studies on optimization of L-asparaginase production by *Arthrobacter kerguelensis* VL-RK_09 isolated from mango orchards. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 2015; 7;

55. Lincoln, Lynette & Niyonzima, Francois & More, Sunil. Purification and properties of a fungal L-asparaginase from *Trichoderma viride* Pers:SF Grey. Journal of microbiology, biotechnology and food sciences. 2015; 4 (4) 310-316 10.15414/jmbfs.2014.4.4.310-316.

56. Zia, Muhammad & Bashir, Rabia & Ahmed, Ishtiaq & Iftikhar, Tehreema. Production of L-Asparaginase from *Aspergillus Niger* using Agro Wastes By-Products in Submerged Fermentation Process. Jurnal Teknologi. 2013 62:2 47–51 62. 10.11113/jt.v62.1879.

57. Alex Hermanto, Adeline Su Yien Ting. Comparative effect of L-asparagine and sodium nitrate in inducing L-asparaginase production by endophytic *Fusarium sp.* Acta Biologica Szegediensis 2016 60(2):145-150,

58. Aida M. Farag, Sahar W. Hassan, Ehab A. Beltagy Mohamed A. El-Shenawy. Optimization of production of anti-tumor L-asparaginase by free and immobilized marine *Aspergillus terreus*. Egyptian Journal of Aquatic Research 2015 17(3): 1-4.

59. Noura El-Ahmady El-Naggar, Hassan Moawad, Nancy M. El-Shweihy, and Sara M. El-Ewasy. Optimization of Culture Conditions for Production of the Anti-Leukemic Glutaminase Free L-Asparaginase by Newly Isolated *Streptomyces olivaceus* NEAE-119 Using Response Surface Methodology. BioMed Research International . 2015 4(3):1-3, Doi: <https://doi.org/10.1155/2015/627031>

60. Aheba A. el-Refail, Mona S. Shafei, Hanan Mosfata, Abdel-Monem H. el-Refail, Eman M. Araby, Fawkia M. el-Beih, Saaida M. Eesa, Sanaa K. Gomaa. Comparison of Free and Immobilized L-asparaginase Synthesized by Gamma-Irradiated *Penicillium cyclopium*. Polish Journal of Microbiology. 2016, 65(1): 43–50.

61. Alapati Kavitha and Muvva Vijayalakshmi. A Study on L-Asparaginase of *Nocardia levis* MK-VL 113. The Scientific World Journal, -2012- 12 (2): 1-5

62. Noura El-Ahmady E-Naggar, Hassan Moawad, Nancy M. El-Shweihy, and Sara M. El-Ewasy. Isolation, molecular identification and optimization of fermentation parameters for the production of L-asparaginase, an anticancer agent by *Fusarium equiseti* -2011- 3 (2): 108-119.

63. Anjana K. Vala, Bhumi Sachaniya, Dushyant Dudhagara, Haresh Z. Panseriya, Haren Gosai, Rakesh Rawal, Bharti P. Dave. *Aspergillus niger* AKV-MKBU, its antiproliferative activity and bench scale production using industrial waste. International Journal of Biological Macromolecules-2017- 15 (1):1-6 1-5 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.114>

64. Kiran Babu Uppuluri*, Ravi Kumar V. R. Dasari, Vinod Sajja, Annie Shanan Jacob, D. Sri Rami Reddy. Optimization of L-Asparaginase Production by Isolated *Aspergillus niger* C4 from Sesame (black) Oil Cake under SSF using Box–Behnken Design in Column Bioreactor. *BioMed Research International*, -2013- 11 (1): 103–109

65. Kruthi Doriya, Devarai Santhosh Kumar. Optimization of solid substrate mixture and process parameters for the production of L-asparaginase and scale-up using tray bioreactor. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, -2013- 18 (1): 244-250.

66. Sanjay Kumar, Ashish A. Prabhu, V. Venkata Dasu & Kannan Pakshirajan. E-Ewasy. Batch and fed batch bioreactor studies for the enhanced production of glutaminase-free L- asparaginase from *Pectobacterium carotovorum* MTCC 1428. *BioMed Research International*, -2016- 21 (3):1 -7 1-5DOI:

67. Balakrishnan Meena Lawrance Anburajan Palaiya Sukumaran Dheenan Mehmuna Begum Nambali Valsalan Vinithkumar Gopal Dharani. Ramalingam Kirubagaran. Novel glutaminase free L-asparaginase from *Nocardiopsis alba* NIOT-VKMA08: production, optimization, functional and molecular characterization. *Bioprocess Biosyst Eng* -2014. 7 (3): 1-3 DOI 10.1007/s00449-014-1277-3

68. M. Hymavathi, T. Sathish, P. Brahmaiah, and R. S. Prakasham*. Impact of Carbon and Nitrogen Sources on L-Asparaginase Production by Isolated *Bacillus circulans* (MTCC 8574): Application of Saturated Plackett-Burman Design: *Chem. Biochem. Eng.* , -2010- 24 (4): 473–480

69. Статистичний Збірник: Заклади охорони здоров'я та захворюваність населення України у 2018 р, ст 86. Електронний ресурс: [режим доступу] http://www.ukrstat.gov.ua/druk/publicat/kat_u/2018/zb/06/zb_zoz_17.pdf

70. Noura El-Ahmady El-Naggar, Hassan Moawad, Nancy M. El-Shweihy, Sara M. El-Ewasy, Islam A. Elsehemy&Nayera A. M. Abdelwahed. Process development for scale-upproduction of a therapeutic L-asparaginase by *Streptomyces brolosae* NEAE-115 from shake flasks to bioreactor. *Scientific Reports*, 2019; 9; 13571. doi:10.1038/s41598-019-49709-6 <https://www.nature.com/articles/s41598-019-49709-6>

71. Noura El-Ahmady El-Naggar, Sahar F. Deraz, Hoda M. Soliman, Nehal M. El-Deeb&Sara M. El-Ewasy. Purification, characterization, cytotoxicity and anticancer activities of L-asparaginase, anti-colon cancer protein, from the newly isolated alkaliphilic *Streptomyces fradiae* NEAE-82. *Scientific Reports*, 2016; 6; 32926 doi:10.1038/srep32926

72. Balakrishnan Meena, LawranceAnburajan, Thadikamala Sathish, Rangamaran Vijaya Raghavan, Gopal Dharani, Nambali Valsalan Vinith Kumar & Ramalingam Kirubakaran. L-Asparaginase from *Streptomyces griseus* NIOT-VKMA29: optimization of process variables using factorial designs and molecular characterization of L-asparaginase gene *Scientific Reports*, 2015; 5, 12404 doi:10.1038/srep12404

73. Аспаргін, хімічний склад: Електронний ресурс: [режим доступу] <https://ru.wikipedia.org/wiki/Аспарагин>

74. Пирог.Т.П , Ігнатова О.А Загальна біотехнологія: - К : НУХТ, 2009 – ст 47-200.

75. Данилов.І.П , Самойленко С.І Апарати мікробіологіної промисловості: - Харків : НТУ «ХП», 2008 – ст 21.

76. Ферментер БіотехноЕлектронний ресурс: [режим доступу] <https://biotechno.ru/catalog/bioreactory/promyshlennyy-bioreaktor-biotechno-obemom-1000-3000-l/>

77. Технологія мікробного синтезу лікарських засобів: Метод. Рекомендації до викон. курс. роботи для студ. Напряму 6.051401 «Біотехнологія» ден. форм. навч. / Уклад.: Т. П. Пирог, Ю.М. Пенчук. – К.: НУХТ, 2011. – ст 17-19.

78. Піногасник. Електронний ресурс [режим доступу]
<https://innochem.com.ua/p718167-penogasitel-pischevoj-silikonovyj.html>

79. Noura El-Ahmady El-Naggar, Sahar F. Deraz, Sara M. El-Ewasy & Ghada M. Suddek Purification, characterization and immunogenicity assessment of glutaminase free L-asparaginase from *Streptomyces brolosae* NEAE-115 BMC Pharmacol Toxicol 19, 51 (2018).

<https://doi.org/10.1186/s40360-018-0242-1>

<https://link.springer.com/article/10.1186/s40360-018-0242-1>

80. Louise L. Tundisi, Diego F. Coêlho, Beatriz Zanchetta, Patricia Moriel, Adalberto Pessoa- Jr, Elias B. Tambourgi, Edgar Silveira & Priscila G. Mazzola L-Asparaginase Purification, Separation & Purification Reviews (2016), DOI: 10.1080/15422119.2016.1184167

<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/15422119.2016.1184167>

81. Основи проектування біотехнологічних виробництв: Конспект лекцій для здобувачів освітнього ступеня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» освітньо-професійної програми «Біотехнологія» денної та заочної форм навчання / Уклад.: Ю.В.Карлаш, Є.О.Омельчук. – К.: НУХТ, 2019. 252 с.

82. Властивості ферменту [Електронний ресурс] : режим доступу
<https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=3.5.1.1#MOLECULARWEIGHT>

83. Лич І.В. Промислова технологія лікарських засобів : конспект лекцій для студентів напряму підготовки 6.051401 «Біотехнологія» денної та заочної форм навчання / уклад. ІВ Лич, Т.П Пирог.. – К. : НУХТ, 2015. – 220 с.

84. Лікарська форма l-аспарагінази. [Електронний ресурс] : режим доступу https://www.vidal.ru/drugs/l-asparaginase__30548

85. Фільтр фторопластовий Електронний ресурс: [режим доступу] https://www.alibaba.com/product-detail/China-Manufacturer-0-2-Um-Air_60857176823.html?spm=a2700.7724857.normalList.10.52416c12TsTmit&s=p&fullFirstScreen=true

86. Повітрезабірник Електронний ресурс: [режим доступу] : <https://7-vz.com/product/cm-st-214/>

87. Фільтри для стисненого повітря. Електронний ресурс: [режим доступу] : <https://www.omega-air.com.ua/filtr-szhatogo-vozduha-whfit-seriya>

88. «Уралкомпресормаш» Електронний ресурс: [режим доступу] : <http://abscorp.ru/aso-receivers-rv230-10.html>

89. Реактор на 6000 л для СІР мийки. Електронний ресурс: [режим доступу] : <https://www.fuchen-tw.com/ru/product/-/process-tanks.html>

90. Насоси відцентрові Електронний ресурс: [режим доступу] : https://vaterpass.com.ua/catalog/centrobezhnie-nasosi/nasosyi_s_vortex_impellerom

91. Реактор на 25 л для титранів. Електронний ресурс: [режим доступу] : <https://www.fuchen-tw.com/ru/product/-/process-tanks.html>
<https://azovchemservice.prom.ua/p342833041-reaktor-nerzhaveyuschej-stali.html>

92. Насоси перистальтичні Електронний ресурс: [режим доступу] : https://vaterpass.com.ua/catalog/peristalticheskie_nasosyi/seriya_psf/rotho_psf3

93. Реактор на 40 л Електронний ресурс: [режим доступу] : <https://azovchemservice.prom.ua/p511070799-reaktor-nerzhaveyuschij-004mkub.html>

94. Реактр на 100 л Електронний ресурс: [режим доступу] :
<http://www.kft2.com.ua/real100.html>
95. Реактор на 400 л Електронний ресурс: [режим доступу] :
<https://azovchemservice.prom.ua/p542552440-reaktor-nerzhaveyuschej-stali.html>
96. Реактор на 1000 л Електронний ресурс: [режим доступу] :
<https://azovchemservice.prom.ua/p227350239-apparat-nerzhaveyuschej-stali.html>
97. Реактор на 4000 л Електронний ресурс: [режим доступу] :
<https://azovchemservice.prom.ua/p580290764-reaktor-nerzhaveyuschej-stali.html>
98. Насос перистатичний Електронний ресурс: [режим доступу] :
https://vaterpass.com.ua/catalog/peristalticheskie_nasosyi/seriya_psf/rotho_psf1
99. Насоси відцентрові Електронний ресурс: [режим доступу] :
https://vaterpass.com.ua/catalog/centrobezhnie-nasosi/nasosyi_s_vortex_impellerom
100. Ферментер на 50 л Електронний ресурс: [режим доступу] :
<https://snablab.by/p70516825-bioreaktor-sartorius-biostat.html>
101. Ферментер на 500 л Електронний ресурс: [режим доступу] :
<https://biotechno.ru/catalog/bioreaktory/promyshlennyy-bioreaktor-biotechno-obemom-300-500-l/>
102. Ферментер на 5000 л Електронний ресурс: [режим доступу] :
<https://biotechno.ru/catalog/bioreaktory/promyshlennyy-bioreaktor-biotechno-obemom-1000-3000-l/>
103. Дозатори Електронний ресурс: [режим доступу] :
<https://asvik.kiev.ua/ru/catalog/group/6>
104. Реактор. [Електронний ресурс] : режим доступу
<https://prom.ua/p871166203-reaktor-sern-emalirovannyj.html>

105. Центрифуга. [Електронний ресурс] : режим доступу https://www.mybeckman.ru/landing/ppc/cent/centrifuges-with-flow-rotor?utm_source=google&utm_medium=cpc&gclid=EAIaIQobChMIwa6306TD7AIVA9KyCh2SrgGFEAAAYASAAEgKcd_D_BwE

106. Реактор на 1300 л . [Електронний ресурс] : режим доступу <https://prom.ua/p1151925671-reaktor-1300-litriv.html>

107. Ультрафільтраційна установка . [Електронний ресурс] : режим доступу https://www.alibaba.com/product-detail/Ultrafiltration-Ultrafiltration-Equipment-Ultrafiltration-MBR-Membrane_60481013572.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal_offer.d_title.287e725dPxamNj&s=p

108. Хроматографічна система. [Електронний ресурс] : режим доступу https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/CoPrime-Biochromatography-System,MM_NF-C196730#specifications

109. Вакуумна сушильна шафа . [Електронний ресурс]: режим доступу <https://ua.uoslab.com/sushylne-obladnannia/vakuumni-shafy/vakuumnyj-sushilnyj-shkaf-sv-50>

110. Дробарка молоткова . [Електронний ресурс] : режим доступу <https://prom.ua/p1120690127-molotkovaya-drobilka-dku.html?&primelead=OC4zOQ>

111. Установка для наповнення флаконів [Електронний ресурс] : режим доступу <https://www.prostanki.com/board/item/235791>

112. Автомат для пакування у коробки. [Електронний ресурс] : режим доступу <http://cphem.com/ua/product/smp>

113. Апарат для обклеювання коробів [Електронний ресурс] : режим доступу <https://www.manuli.ua/obladnannya/pallopakuvalniki/pallopakuvalniki-serednogo-rivnya/pallopakuvalnik-model-f1-pl-20-detail>

114. Фарбування за Грамом [Електронний ресурс] – Режим доступу:
https://studopedia.com.ua/1_229434_tehnika-farbuвання-za-gramom.html

115. Світлова мікроскопія по граму : <http://microbe-canvas.com/Bacteria.php?p=1282>

116. Метод гідролізу декстрину [Електронний ресурс] – Режим доступу:
<https://studopedia.org/10-345.html>

117. Горюшкіна Т. Б, О. В. Остроухова. В. О, Солдаткін. О. П, Дзядевич С. В. Оптимізація методики визначення вмісту глюкози у виноматеріалі ензимним амперометричним біосенсором//– УДК 577.15:573.6. БІОТЕХНОЛОГІЯ. -2009. – Т 2 , N 1. – . Ст . 89-93.

118. Визначення амінного азоту [Електронний ресурс] – Режим доступу:
http://nevaprofi.ru/nitratomery-i-ionomery-nitrity-i-nitraty-v-pischevyh-produktah/article_post/649806

119. Визначення концентрації біомаси [Електронний ресурс]. Режим доступу : <https://studfiles.net/preview/5194349/page:18/>

120. Методики визначення основних показників [Електронний ресурс] :
режим доступу <http://sphu.org/viddil-dfu>