

**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

Т.П. Пирог  
(підпис) (прізвище та ініціали)

«  » червень 2021 р.

«  » червень 2021 р.

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА**  
**НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА**

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»  
(код та назва спеціальності)  
освітньо-професійної програми \_\_\_\_\_

на тему Біосинтез L-аспарагінази *Erwinia carotovora*

Виконав: здобувач 4 курсу, групи 2ск

Тихолоз Данило Андрійович  
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник Пенчук Юрій Миколайович

(прізвище, ім'я та по батькові повністю) (підпис)

Консультанти Клименко О.М.

(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)

Київ – 2021 р.

## Реферат

Дана дипломна робота присвячена розробленню технологічної схеми біосинтезу аспарагінази штамом *Erwinia carotovora* МТСС 1428, який продукує фермент на півсинтетичному середовищі з глюкозою з активністю 38,8 од/мл. Аспарагіназа – являє собою фермент гідролаз, що каталізує аспарагін до аспарагінової кислоти та аміаку, що веде до його використання в протипухлинній терапії та комбінованій терапії проти лейкозів.

Технологічна схема біосинтезу L-аспарагінази містить допоміжні роботи (приготування розчинів титрувальних агентів, приготування розчину композиції А, приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу та для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 1 м<sup>3</sup>, приготування розчинів на стадію виділення та очищення) і технологічний процес, що включає наступні стадії: вирощування посівного матеріалу, виробничий біосинтез, зберігання культуральної рідини, відділення біомаси, гомогенізація, осадження ферменту, виділення L-аспарагінази, концентрування та сушіння.

Курсова робота складається з вступу, дев'яти розділів, списку використаної літератури (34 найменувань) 3 листів апаратурних схем (формати А1), 2 листів технологічних схем (формати А1). Загальний обсяг роботи – 94 сторінок, 6 рисунків, 15 таблиць.

**Ключові слова:** *L-аспарагіназа, лейкоз, протипухлинна активність, Erwinia carotovora МТСС 1428, біосинтез.*

|             |      |              |        |      |                          |             |      |         |
|-------------|------|--------------|--------|------|--------------------------|-------------|------|---------|
|             |      |              |        |      | НУХТ БТЕК 04.02.40 КР ПЗ |             |      |         |
| Змн.        | Лист | № докум.     | Підпис | Дата | Реферат                  | Літ.        | Арк. | Аркушів |
| Розроб.     |      | Тихолоз Д.А. |        |      |                          |             |      |         |
| Перевір.    |      | Пенчук Ю.М.  |        |      |                          |             | 2    | 94      |
| Консультант |      |              |        |      |                          | Кафедра БТМ |      |         |
| Н. Контр.   |      |              |        |      |                          |             |      |         |
| Затверд.    |      | Пирог Т.П.   |        |      |                          |             |      |         |

## ЗМІСТ

|  |    |
|--|----|
| РЕФЕРАТ.....   | 2  |
| ВСТУП.....   | 4  |
| РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту.....   | 5  |
| РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента.....  | 8  |
| 2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування.....                            | 8  |
| 2.2. Розрахунок складу поживного середовища.....   | 11 |
| 2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента..   | 13 |
| 2.4. Таксономічний статус біологічного агента.....   | 15 |
| РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування.....  | 16 |
| 3.1. Потреба у цільовому продукті.....   | 16 |
| 3.2. Розрахунок потужності виробництва .....   | 17 |
| 3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів.....  | 17 |
| 3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.....   | 18 |
| РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми.....  | 21 |
| 4.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу.....  | 21 |
| 4.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера.....  | 21 |
| 4.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря.....   | 23 |
| 4.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів.....  | 25 |
| 4.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища.....  | 29 |
| 4.2. Обґрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту.....   | 30 |
| 4.3. Обґрунтування допоміжних робіт для стадії виділення та очищення цільового продукту.....                                 | 40 |
| 4.4. Підбір технологічного обладнання для післяферментаційних стадій з урахуванням матеріальних потоків по стадіях.....      | 41 |
| РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання.....   | 45 |
| РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми. ....   | 50 |
| РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва.....  | 71 |
| 7.1. Карта постадійного контролю доферментаційних процесів.....  | 71 |
| 7.2. Мікробіологічний контроль .....   | 75 |
| 7.3. Показники росту і синтезу цільового продукту.....   | 76 |
| 7.3.1. Концентрація біомаси.....   | 76 |
| 7.3.2. Концентрація цільового продукту .....   | 76 |
| 7.3.3. Концентрація джерела вуглецю і азоту.....   | 77 |
| 7.4. Показники якості готового продукту.....   | 78 |
| РОЗДІЛ 8. Автоматизація ділянки виробництва.....   | 84 |
| РОЗДІЛ 9 Охорона довкілля.....   | 89 |
| 9.1. Аналіз технологічної схеми виробництва цільового продукту на місця емісії твердих, рідких та газоподібних відходів..... | 89 |
| 9.2 Перспективи впровадження системи екологізації виробництва.....   | 89 |
| 9.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів.....   | 89 |
| 9.2.2. Система знешкодження та утилізації твердих відходів.....  | 90 |
| 9.2.3. Система знешкодження газоповітряних викидів.....  | 91 |
| ЛІТЕРАТУРА.....  | 92 |
| Додатки.....   | 96 |

|                          |      |              |        |      |
|--------------------------|------|--------------|--------|------|
| НУХТ БТЕК 04.02.40 КР ПЗ |      |              |        |      |
| Змн.                     | Лист | № докум.     | Підпис | Дата |
| Розроб.                  |      | Тихолоз Д.А. |        |      |
| Перевір.                 |      | Пенчук Ю.М.  |        |      |
| Консультант              |      |              |        |      |
| Н. Контр.                |      |              |        |      |
| Затверд.                 |      | Пирог Т.П.   |        |      |
| ЗМІСТ                    |      |              | Літ.   | Арк. |
|                          |      |              | 3      | 94   |
| Кафедра БТМ              |      |              |        |      |

## ВСТУП

Ферментативна терапія широко використовується в терапії онкологічних захворювань. Аспарагіназа не є виключенням, її також широко використовують в протилікемійній терапії як цитостатик, що діє на аспарагін в період G1-мітозу, знижуючи тим самим поділ бластних клітин у крові [1].

L-аспарагінази протягом більше 40 років успішно застосовуються в комбінованій хіміотерапії гострих лімфобластний лейкозів у дітей і спектр пухлин, чутливих до дії даних ферментів, постійно розширюється [2].

Хоча і L -аспарагіназа синтезується різними мікроорганізмами, такими як *Erwinia chrysanthemi* і *Escherichia coli* на даний час використовуючи в клінічній практиці в якості лікарських засобів при різних лейкозах. Але, на жаль, не дивлячись на широке використання L -аспарагінази, більшість процедур було припинено через важку побічну дію та імунологічну реакцію у пацієнтів [3].

Щоб ідентифікувати ферменти з меншою токсичністю, протягом багатьох років були ретельно досліджені декілька членів гомологічних L -аспарагіназ. Таким чином, L -аспарагіназа з високою специфічною активністю по відношенню до L -аспарагіну та низькою або не значною активністю до L -глутаміну, як повідомляється, має менш шкідливий вплив при курсі протиракової терапії [1].

Новизною курсового проекту є реалізація технологій біосинтезу L-аспарагінази, проведення створення та розробки нового препарату на основі L-аспарагінази від *Erwinia carotovora* MTCC 1428.

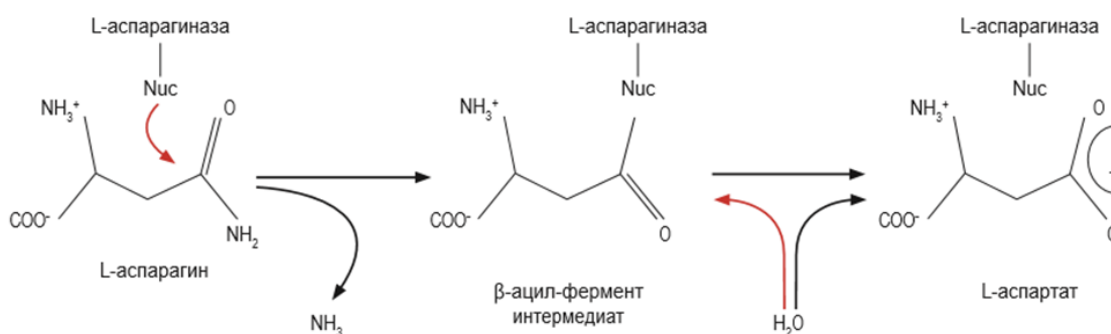
|             |      |              |        |      |                          |             |      |         |
|-------------|------|--------------|--------|------|--------------------------|-------------|------|---------|
|             |      |              |        |      | НУХТ БТЕК 04.02.40 КР ПЗ |             |      |         |
| Змн.        | Лист | № докум.     | Підпис | Дата |                          |             |      |         |
| Розроб.     |      | Тихолоз Д.А. |        |      | Вступ                    | Літ.        | Арк. | Аркушів |
| Перевір.    |      | Пенчук Ю.М.  |        |      |                          |             | 4    | 94      |
| Консультант |      |              |        |      |                          | Кафедра БТМ |      |         |
| Н. Контр.   |      |              |        |      |                          |             |      |         |
| Затверд.    |      | Пирог Т.П.   |        |      |                          |             |      |         |

## РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту

На даний момент відомо безліч аспарагіназ які синтезують мікроорганізми (*Erwinia chrysanthemi*, *Escherichia coli*, *Streptomyces brolosoae*.) для ефективного лікування лікемії, але недивлячись на велику різноманітність під час терапії виникало багато алергічних реакцій, які викликали погіршення на стан хворого, що в свою чергу зменшувало терапевтичну дію лікування.[3]

Тому з'явилась потреба в знаходженні та дослідженні нових бактеріальних аспарагіназ, що мають меншу алергічну реакцію та володіють меншою глуматазну активність.[3]

**Аспарагіназа** (L-аспарагін-амідогідролаза), фермент класу гідролаз. Міститься в дріжджах, бактеріях, плісняві, солоді, а також в тканинах тварин. Каталізує гідроліз аспарагіну з утворенням аспарагінової к-ти Рис. 1.1., що призводить до порушення біосинтезу білків, в першу чергу в лейкозних клітинах, що швидко діляться. Значно зменшує число пухлинних клітин в периферійній крові і кістковому мозку.[1]



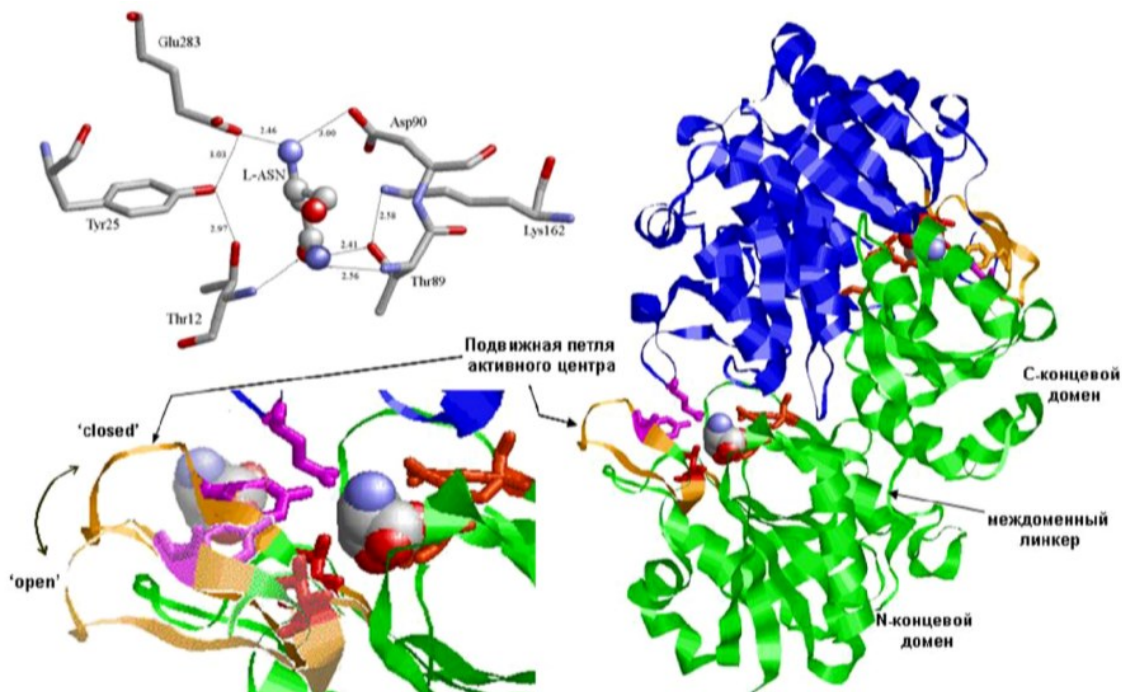
**Рис. 1.1.** Реакція катаболізму L-аспарагіназ [1]

В очищеному вигляді білий порошок, легко розчинний у воді, практично не розчиняється в метанолі, ацетоні і хлороформі.

Середня молекулярна маса аспарагінази 140 килодальтон (кДа). Гомотетрамер складається з мономерів з молекулярною масою 36 кДа (близько 330 амінокислотних залишків).

|             |      |              |        |      |   |             |      |         |
|-------------|------|--------------|--------|------|---|-------------|------|---------|
|             |      |              |        |      | НУХТ БТЕК 04.02.40 КР ПЗ                          |             |      |         |
| Змн.        | Лист | № докум.     | Підпис | Дата |   |             |      |         |
| Розроб.     |      | Тихолоз Д.А. |        |      | РОЗДІЛ 1.<br>Характеристика цільового<br>продукту | Літ.        | Арк. | Аркушів |
| Перевір.    |      | Пенчук Ю.М.  |        |      |   |             | 5    | 94      |
| Консультант |      |              |        |      |   | Кафедра БТМ |      |         |
| Н. Контр.   |      |              |        |      |   |             |      |         |
| Затверд.    |      | Пирог Т.П.   |        |      |   |             |      |         |

Кожен мономер має 40  $\beta$ -шарів і 8  $\alpha$ -спіралей, укладених в N-термінальний домен і менший за розміром С-термінальний доменом. Між N- і С-термінальними доменами примикають мономерів сформовані 4 активних каталітичних центру. (Рис. 1.2)



**Рис.1.2** Електронна фотографія аспарагінази

Застосовується як протипухлинний цитостатичний засіб в терапії деяких лейкозів. Він також використовується в якості технологічного засобу для зниження утворення акриламід у крохмалистих харчових продуктах.

Головним виробником аспарагінази на ринку України є компанія Medac  
Рис 1.3.



**Рис. 1.3.** Пролонгована форма аспарагінази

**Умови зберігання.**

Зберігати в холодильнику (при температурі від +2 °С до +8 °С). Зберігати в оригінальній упаковці для захисту від світла.

**Показання:**

Як компонент комбінованої антинеопластичної терапії гострої лімфобластної лейкемії у дітей та дорослих, а також у випадках неходжкінських лімфом у дітей.

**Протипоказання:**

Пацієнтам з панкреатитом у період лікування або в анамнезі не слід вводити L-аспарагіназу, оскільки після застосування аспарагінази спостерігалися випадки гострого геморагічного панкреатиту.

Пацієнтам, у яких розвивалася алергічна реакція на аспарагіназу *E. coli*, не можна призначати Аспарагіназу 5000 МО (10000МО) медак (аспарагіназа *E. coli*).

Пацієнтам репродуктивного віку слід вживати заходи контрацепції або утримуватися від статевих відносин під час лікування і протягом 3 місяців після його закінчення.

## РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента

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

Бактеріальні L-аспарагинази II класу (КФ 3.5.1.1) – періплазматичні ферменти, що каталізують реакцію гідролізу L-аспарагіну з утворенням L-аспарагінової кислоти і аміаку. Вони також здійснюють гідроліз L-глутаміну, але з меншою швидкістю, ніж L-аспарагіну [1]. L-аспарагиназою *Escherichia coli* (EcA) і *Erwinia chrysanthemi* (ErA) вже більше 40 років успішно застосовуються в хіміотерапії пухлин, перш за все, гострого лімфобластного лейкозу, а також неходжкінської лімфоми і лімфоми Беркита. [3]

По літературним даними, відносна швидкість гідролізу L-глутаміну під дією L-аспарагинази *Erw. chrysanthemi* становить від 9% до 15% по відношенню до для L-аспарагіну, а у лікарського препарату L-аспарагинази *E. coli* - близько 2%. Дезамінування L-глутаміну, а також розвиток різних алергічних реакцій знижують терапевтичну ефективність L-аспарагинази [3].

Очевидно, для проведення хіміо- та ензимотерапії лейкозів доцільно розташовувати набором L-аспарагиназ, що володіють високою ферментативною активністю, але відрізняються за своїми антигенними властивостями і володіють зниженою токсичністю за рахунок відносно невисокій L-глутамазній активності, оскільки більшість із них здатні не тільки до гідролізу L-аспарагіну але і до L-глутаміну.

Узагальнюючу характеристику технологічних особливостей одержання аспагінази наведено у таблиці 1.1. Цей фермент виділяють бактеріальні штами такі як *Erwinia carotovora* (синонім *Pectobacterium carotovorum* MTCC 1428) з продуктивністю 38,8 U/л, що спостерігалась після 12 годин культивування, та інші бактерії.

|             |      |              |        |      |  |             |      |         |
|-------------|------|--------------|--------|------|--|-------------|------|---------|
|             |      |              |        |      | НУХТ БТЕК 04.02.40 КР ПЗ   |             |      |         |
| Змн.        | Лист | № докум.     | Підпис | Дата |  |             |      |         |
| Розроб.     |      | Тихолоз Д.А. |        |      | Розділ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента | Літ.        | Арк. | Аркушів |
| Перевір.    |      | Пенчук Ю.М.  |        |      |  |             | 8    | 94      |
| Консультант |      |              |        |      |  | Кафедра БТМ |      |         |
| Н. Контр.   |      |              |        |      |  |             |      |         |
| Затверд.    |      | Пирог Т.П.   |        |      |  |             |      |         |

**Особливості одержання L-аспарагінази шляхом культивування *E.coli* BL-21, *Erwinia carotovora* MTCC 1428 та *Streptomyces broloosae* NEAE-115**

| Продуцент                              | Склад поживного середовища, г/л   | Концентрація продукту, г/л | Активність ферменту, од/мл | Тривалість культивування, год | Література  |
|--|---|----------------------------|----------------------------|-------------------------------|---|
| <i>E.coli</i> BL-21                    | Глюкоза – 100;<br>Соевий екстракт – 120;<br>Дріжджовий екстракт – 50;<br>КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub> - 50 ;<br>NaН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub> - 20;<br>Розчин мікроелементів - 20;<br>Канаміцином - 0,003.  | 6,7                        | 44,8                       | 16                            | Rajesh Kumar Kantea, Sandeep Vemulaa, Silpa Somavarapu Optimized upstream and downstream from Escherichia coli and its characterization<br>doi.org:10.1016/j.biologicals.2018.10.002  |
| <i>Erwinia carotovora</i> MTCC 1428    | Глюкоза – 30;<br>L-аспарагін – 30;<br>Na <sub>2</sub> НРО <sub>4</sub> x 2Н <sub>2</sub> О – 6,0;<br>КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub> – 1,772;<br>NaCl – 0,5;<br>MgSO <sub>4</sub> x 7Н <sub>2</sub> О – 0,373;<br>СаCl <sub>2</sub> x 2Н <sub>2</sub> О – 0,015;<br>Дріжджовий екстракт –1,0;<br>Пептон –1,0. | 7,21                       | 38,8                       | 12                            | Sanjay Kumar, Ashish A. Prabhu, V. Venkata Dasu, Kannan Pakshirajan «Batch and fed batch bioreactor studies for the enhanced production of glutaminasefree L-asparaginase from Pectobacterium carotovorum MTCC 1428» DOI: 10.1080/10826068.2016.1168841 |
| <i>Streptomyces broloosae</i> NEAE-115 | Декстроза – 2;<br>Крохмаль – 20 ;<br>L-аспарагін –10;<br>КNO <sub>3</sub> – 1;<br>K <sub>2</sub> НРО <sub>4</sub> – 1;<br>MgSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O – 0,5;<br>NaCl – 0,1.  | (7.78) 21                  | 75,151                     | 168                           | Department of Bioprocess Development, Genetic Engineering and Biotechnology Research Institute, City for Scientific Research and Technological Applications, Alexandria, Egypt. (2019)<br>doi.org:10.1038/s41598-019-49709-6<br><br>ISSN 2250-0480      |

**Вартість компонентів поживних середовищ для культивування *E.coli* BL-21, *Erwinia carotovora* MTCC 1428 та *Streptomyces brotlosae* NEAE-115**

| Продуцент  | Компоненти поживного середовища, г/л   | Ціна компонента, грн/кг              | Вартість компонента (грн) на 1 л середовища                | Джерело |
|--|--|--------------------------------------|--|---------|
| <i>E.coli</i> BL-21  | Глюкоза – 100  | 30                                   | 3  | 1       |
|  | Соевий екстракт – 120  | 859                                  | 103  | 1       |
|  | Дріжджовий екстракт – 50   | 2262                                 | 113  | 2       |
|  | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> - 50   | 120                                  | 6  | 1       |
|  | NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> - 20  | 110                                  | 2,2  | 1       |
|  | Розчин мікроелементів:<br>FeCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O - 0,081;<br>ZnCl <sub>2</sub> - 0,006;<br>CoCl <sub>2</sub> - 0,006;<br>Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O – 0,002;<br>CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O – 0,003;<br>CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O – 0,0057. | 58,50<br>88<br>17<br>550<br>50<br>67 | 0,0047<br>0,0005<br>0,0001<br>0,0011<br>0,00015<br>0,00038 | 1       |
|  | Канаміцин - 0,003  | 15000                                | 0,045  | 4       |
|  | Вартість 1 л середовища – 227,25 грн   |                                      |  |         |
|  | <i>Erwinia carotovora</i> MTCC 1428  | Глюкоза – 30                         | 30   | 0,9     |
| L-аспарагін – 30   |  | 490                                  | 14,7   | 1       |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O – 6,0 |  | 65                                   | 0,39   | 1       |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – 1,772                    |  | 120                                  | 0,21   | 1       |
| NaCl – 0,5   |  | 30                                   | 0,015  | 1       |
| MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O – 0,373              |  | 65                                   | 0,024  | 1       |
| CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O – 0,015              |  | 50                                   | 0,0075   | 1       |
| Дріжджовий екстракт – 1,0                                  |  | 2262                                 | 2,62   | 2       |
| Пептон – 1,0   |  | 850                                  | 0,85   | 5       |
| Вартість 1 л середовища – 19,72 грн                        |  |                                      |  |         |
| <i>Streptomyces brotlosae</i> NEAE-115                     | Декстроza – 2  | 24                                   | 0,048  | 1       |
|  | Крахмал – 20   | 15                                   | 0,3  | 1       |
|  | L-аспарагін – 10   | 490                                  | 4,9  | 1       |
|  | KNO <sub>3</sub> – 1   | 39,50                                | 0,04   | 1       |
|  | K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> – 1  | 120                                  | 0,12   | 1       |
|  | MgSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O – 0,5   | 65                                   | 0,033  | 1       |
|  | NaCl – 0,1   | 30                                   | 0,003  | 1       |
| Вартість 1 л середовища – 5,44 грн                         |  |                                      |  |         |

**Примітка! Ціни наведено станом на березень 2020 року: 1 - <https://prom.ua/>; 2- <https://shop.hlr.ua/>; 3- <https://snabhim.com.ua/>; 4 - <https://bzv.com.ua/>; 5 - <https://shop.hlr.ua/> .**

Умовна вартість 1 г L-аспарагінази при культивуванні *E.coli* BL-21, *Erwinia carotovora* MTCC 1428 та *Streptomyces broloosae* NEAE-115

| Біологічний агент                      | Вартість 1 л середовища, грн | Біомаса L-аспарагінази, г/л | Умовна вартість 1 г L-аспарагінази, грн/г | Тривалість культивування, год | Кількість утвореної L-аспарагінази за годину, г/год |
|--|------------------------------|-----------------------------|---|-------------------------------|---|
| <i>E.coli</i> BL-21                    | 227,25                       | 6,7                         | 33,92                                     | 16                            | 1,11  |
| <i>Erwinia carotovora</i> MTCC 1428    | 19,72                        | 7,21                        | 2,73                                      | 12                            | 0,6   |
| <i>Streptomyces broloosae</i> NEAE-115 | 5,44                         | 7,78                        | 0,7                                       | 168                           | 0,04  |

Роблячи висновки з попередніх розрахунків, можна сказати, що штамм *Erwinia carotovora* MTCC 1428 є найвигіднішим продуцентом для синтезу аспарагінази, ніж *E.coli* BL-21, *Streptomyces broloosae* NEAE-115. Також слід відзначити те, що аспарагіназа *Erwinia carotovora* MTCC 1428 за клінічними підтвердженнями має найменшу глутамазну активність, та майже не викликає алергічної реакції, що є доцільно використовувати цей фермент для майбутньої терапії, але і також вигідний для майбутнього масового промислового синтезу.

## 2.2. Розрахунок складу поживного середовища

Визначення вмісту азоту

Дано:

$$C_{1377}H_{2208}N_{382}O_{442}S_{17} = 30 \text{ г/л};$$

$$M(C_{1377}H_{2208}N_{382}O_{442}S_{17}) = 31\,732 \text{ г/моль};$$

$$Ar(N_2) = 5\,348 \text{ г/моль};$$

Відсоткове співвідношення азоту:

$$\frac{Ar(N_{382}) \times C_{1377}H_{2208}N_{382}O_{442}S_{17}}{M(C_{1377}H_{2208}N_{382}O_{442}S_{17})} = \frac{5348 \times 30}{31\,732} = 5,05$$

Знаючи те, що в клітині азоту знаходиться 10% від усіх компонентів, тому щоб дізнатися концентрацію біомаси, отримане значення необхідно перерахувати:

$$5,05 \times 10 = 50,5 \text{ г/л}$$

Отже, теоретично можлива концентрація біомаси за азотом дорівнює 50,5 г/л.

*Визначення вмісту вуглецю*

Дано:

$$C_6H_{12}O_6 = 30 \text{ г/л};$$

$$M(C_6H_{12}O_6) = 180 \text{ г/моль};$$

$$Ar(C_6) = 72 \text{ г/моль};$$

Відсоткове співвідношення вуглецю:

$$\frac{Ar(C_6) \times C_6H_{12}O_6}{M(C_6H_{12}O_6)} = \frac{72 \times 30}{180} = 12$$

Знаючи те, що в клітині вуглецю знаходиться 50% від усіх компонентів, тому щоб дізнатися концентрацію біомаси, отримане значення необхідно перерахувати:

$$12 \times 2 = 24 \text{ г/л}$$

Тоді теоретично можливий вихід біомаси за вуглецем дорівнює 24 г/л.

З наведених вище розрахунків можна сказати, що вуглець в даному середовищі є лімітуючим фактором. Тобто при споживанні всього вуглецю ріст мікроорганізмів припиниться. А це означає, що середовище даного кількісного складу використовувати недоцільно.

Для того, щоб в середовищі наведеного складу азот використовувався економічно доцільніше, необхідно зменшити кількість внесеного азоту. Цю кількість можна розрахувати з пропорції. Вуглець відноситься до азоту як  $\frac{5}{1}$  тобто азоту необхідно в 5 разів менше

$$12 / 5 = 2,4 \text{ г/л}$$

Необхідно 2,4 г/л азоту для повного використання вуглецю.

За пропорцією дізнаємося скільки потрібно додати в середовище аспарагінази:

$$\frac{Ar(C_6) \times C_6H_{12}O_6}{M(C_6H_{12}O_6)} = \frac{5\,348 \times X}{31\,732} = 2,4$$

$$5\,348 \times X = 31\,732 \times 2,4$$

$$X = \frac{31\,732 \times 2,4}{5\,348} = 14,24 \text{ г/л}$$

Для економічно доцільного використання компонентів в поживному середовищі, в ньому має бути 14,24 г/л аспарагінази. А оскільки було задано 30 г/л, то необхідно зменшити початкову кількість приблизно в два рази.

### 2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки

**Ервінія** (*Erwinia*) — рід бактерій родини *Enterobacteriaceae*; грам-негативні паличкоподібні бактерії, 1-3 мікрон завдовжки і 0,5-1 мікрон в діаметрі. Рухомі, мають численні джгутики (окрім *Erwinia stewartii*). Гетеротрофи, факультативні анаероби. Типовий вид — *Erwinia amylovora*. Більшість представників роду асоційовані з рослинами, серед них є епіфіти, сапротрофи, фітопатогени.

Кілька видів роду були виділені у окремий рід *Pectobacterium*, що хоча і був ухвалений, перестав використовуватися в кінці 1990-х років. В 1998 році Хаубен з співавторами знову запропонували відновити його на основі дослідження 16S рРНК, куди були віднесені *E. carotovora* (як *P. carotovorum*), *E. cacticida*, *E. chrysanthemi*, *E. cyripedii* (як *P. cacticidum*, *P. chrysanthemi* і *P. cyripedii* відповідно). Крім того, *E. alni*, *E. nigrifluens*, *E. paradisiaca*, *E. quercina*, *E. rubrifaciens* і *E. salicis* були винесені до нового роду *Brenneria*. Зараз, проте, залишаються сумніви щодо доцільності такого винесення і часто для спірних видів застосовуються обидва синоніми, а класифікація роду *Erwinia* та утворених з нього родів продовжує переглядатися. Зокрами було запропоновано надати ранг видів підвидам *P. carotovorum* (syn. *E. carotovora*) *P. atrosepticum*, *P. betavasculorum* і *P. wasabiae*, а *P. chrysanthemi* (syn. *E. chrysanthemi*) і *Brenneria paradisiaca* (syn. *E. paradisiaca*) перенести до роду *Dickeya*.

Кілька видів ервіній іноді виділялися в окремий рід *Pectobacterium*, але до кінця 1990-1990-х років цей рід перестав використовуватися, хоча й був

схвалений. В 1998 року Хаубен зі співавторами на підставі вивчення 16S рННК запропонував відновити його й відніс до роду *Pectobacterium* ряд підвидів *E. carotovora* (як *P. carotovorum*), *E. cacticida*, *E. chrysanthemi* і *E. cypripedii* (*P. cacticidum*, *P. chrysanthemi* і *P. cypripedii* відповідно). Крім того, *E. alni*, *E. nigrifluens*, *E. paradisiaca*, *E. quercina*, *E. rubrifaciens* і *E. salicis* були винесені ними в новий рід *Brenneria*. Обґрунтування доцільності виділення роду *Pectobacterium*, однак, здебільшого наукового співтовариства не були визнані переконливими. У цей час для видів спірного таксономічного положення використовуються обоє синоніми, а класифікація роду *Erwinia* продовжує переглядається. Так, підвидам *P. carotovorum* (син. *E. carotovora*) запропоновано додати ранг виду (*P. atrosepticum*, *P. betavascularum* і *P. wasabiae*), а *P. chrysanthemi* (син. *E. chrysanthemi*) і *Brenneria paradisiaca* (син. *E. paradisiaca*) перенести в рід *Dickeya*.

#### **Культурально-морфологічні ознаки.**

*Erwinia carotovora* 206-B1 утворює колонії на м'ясо-пептонном агарі із глюкозою й дріжджовим екстрактом 1-3 мм округлої форми з рівним або фестончатим краєм, блискучі до матових, опуклі або плоскі, від безбарвних у молодому віці до жовто-коричневих. Клітини короткі, (0,7-1,0x1,0-2,5 мкм), рухливі на перших годинах росту палички.

#### **Фізіолого-біохімічні ознаки.**

Штам *Erwinia carotovora* 206-B1 при періодичному способі культивування в аеробних умовах при температурі 32-36°C і рН=5-7 повністю утилізує нафтопродукти протягом 36-48 год. Розкладає органічний субстрат у рослинній сировині, наприклад, придатний для аеробної й анаеробної обробки калу й гною. На вуглецевому субстраті синтезує низькомолекулярні кислоти, альдегіди, спирти. Зберігається в пробірках при 4°C під маслом на м'ясо-пептонном агарі з 2% глюкози й 0,1% кукурудзяного екстракту, рН = 7,0. Розмножується в пробірках при 30°C на м'ясо-пептонному агарі з 2% глюкози й 0,1% кукурудзяного екстракту, рН=7.

#### **2.4. Таксономічний статус біологічного агента**

Сучасна філогенетична класифікація *Erwinia carotovora* МТСС 1428  
наведена згідно другого видання Керівництва Бергі з систематики бактерій.

Домен – *Bacteria*

Тип – *Proteobacteria*

Клас – *Gamma Proteobacteria*

Ряд – *Enterobacteriales*

Родина – *Enterobacteriaceae*

Рід – *Erwinia*

Вид – *Erwinia carotovora*

Штам – *Erwinia carotovora* МТСС 1428

## РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування

### 3.1. Потреба у цільовому продукті

Згідно даних, за останні 2 роки зафіксовано та лабораторно підтверджено близько 2992 випадків лейкозу, з яких 40,8% припадають на гостру, 51,2% хронічну форму, 0,1% на підгостру та 7,8% на специфічну форми. Захворюваність дитячого населення (вік 0-17 років) на 100 000 чол. дитячого населення сягає 289 осіб, з яких 68 з летальним випадком [4].

Сучасна медицина використовує специфічні схеми для лікування лейкозів, а також L-аспарагіназу, роль якої є підтримуюча цитостатична терапія. Слід зауважити, що L-аспарагіназу призначають лише онко-гематологи, які мають досвід в клінічній картині розвитку хвороби та потребу в її застосуванні.

Доза встановлюється строго індивідуально в залежності від характеру захворювання, загального стану хворого і його віку. Дорослим зазвичай вводять в/в струйно/ крапельно (протягом 30-40 хв), в разовій дозі - 200-300 МО/кг щодня або через день. Для струминного введення разову дозу розчиняють в 20-40 мл 0,9% розчину NaCl (повільно і не струшуючи), для краплинного введення - в 200-500 мл 0,9% розчину NaCl (вводити слід протягом 30-40 хв). Курсова доза для дорослих – 300-400 тис. МО, дітям дозу зменшують відповідно до маси тіла. Тривалість лікування – 3 тижні (при відсутності ефекту лікування припиняють) [5]. Для підрахунку річної потреби препарату наводимо в табл. 3.1.

|             |      |              |        |      | НУХТ БТЕК 04.02.40 КР ПЗ                         |      |         |
|-------------|------|--------------|--------|------|--|------|---------|
| Змн.        | Лист | № докум.     | Підпис | Дата |  |      |         |
| Розроб.     |      | Тихолоз Д.А. |        |      | Літ.   | Арк. | Аркушів |
| Перевір.    |      | Пенчук Ю.М.  |        |      |  | 16   | 94      |
| Консультант |      |              |        |      | Кафедра БТМ                                      |      |         |
| Н. Контр.   |      |              |        |      |  |      |         |
| Затверд.    |      | Пирог Т.П.   |        |      |  |      |         |
|             |      |              |        |      | Розділ 3.<br>Техніко економічне<br>обґрунтування |      |         |

**Вихідні дані для розрахунку річної потреби виробництва L-аспарагінази**

| <b>Захворювання</b>            | <b>Доза препарату</b> | <b>Курс лікування, кількість днів</b> | <b>Кількість препарату в МО (міжнародні одиниці)</b> | <b>Кількість хворих на Україні за 2018 рік</b> | <b>Загальна кількість одиниць на всіх хворих</b> |
|--------------------------------|-----------------------|---------------------------------------|--|--|--|
| Гострий лімфобластний лейкоз   | 5000,10000            | 21                                    | 400 тис  | 2992   | 2,1496x10 <sup>9</sup>                           |
| Хронічний лімфобластний лейкоз |                       |                                       |  | 2382   |  |

І хоча в світі є достатня кількість підприємств, що виробляють L-аспарагіназу, однак Україна на сьогоднішній день використовує лише L-аспарагіназу фірми «Medac» [6].

Слід зазначити, що для розрахунків приймаємо задоволення лише 50% потреби в даному препараті, оскільки приймаємо постачання лише від одного виробника. Саме тому, потреба в L-аспарагіназі для забезпечення хворих на лейкоз становить  $1,0748 \times 10^9$  МО.

### 3.2. Розрахунок потужності виробництва

Для того щоб розрахувати потужність виробництва L-аспарагінази, потрібно врахувати 40 % цільового продукту, який може втратитись під час очищення та виділення цільового продукту.

$G_{\phi} = 1,0748 \times 10^9 + 40\% = 1\,791\,000\,000$  МО, саме стільки потрібно ферменту, враховуючи максимальну частку втрат.

Продуцент *Erwinia carotovora* МТСС 1428 синтезує 38,8 МО/мл, звідси 38800 МО/л [7], тому вираховуємо скільки потрібно культуральної рідини для  $1\,791\,000\,000$  МО:

$$X = 1\,791\,000\,000 / 38800 = 46\,160 \text{ л або } 46 \text{ м}^3$$

Саме стільки потрібно культуральної рідини, аби задовольнити потребу споживача.

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

Для забезпечення потреби в аспарагіназі необхідно виробляти 46 м<sup>3</sup> культуральної рідини на рік.

1) Кількість продукту на добу. Прийmemo кількість робочих трудоднів ( $T_{рд}$ ) 90, тоді кількість продукту на добу ( $V_d$ ) становитиме:

$$V_d = V_{кр}/T_{рд} = 46/90 = 0,51 \text{ м}^3/\text{добу}$$

2) Розрахуємо кількість культуральної рідини за один цикл, ( $V_{крц}$ ):

$$V_{крц} = K_1 * V_d * T_{цф} / 24 = (1,1 * 0,51 * 22) / 24 = 0,51 \text{ м}^3/\text{цикл.}$$

де  $T_{цф}$  – цикл роботи ферментера (22 год), що включає час біосинтезу (12 год), та час підготовки ферментера – 10 год. 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, відвантаження культуральної рідини – 1 год;  $K_1$  – коефіцієнт запасу, що враховує ймовірність нестерильних операцій (1,1-1,5).

3) Об'єм готового поживного середовища та посівного матеріалу у виробничому ферментері з врахуванням втрат при біосинтезі  $E_{ф} = 0,1$  становить:

$$V_{ф} = V_{кр}/(1-E_{ф}) = 0,51 / (1-0,1) = 0,56 \text{ м}^3.$$

4) Геометричний об'єм ферментера для отримання 0,56 м<sup>3</sup> культуральної рідини, з коефіцієнтом заповнення 0,6 має становити:

$$V_{г} = V_{ф}/K_{зап} = 0,56 / 0,6 = 0,93 \text{ м}^3, \text{ найближчий ферментер } 1 \text{ м}^3.$$

Перевіряємо коеф. заповнення:  $K_3 = 0,56 / 1 = 0,56$ . Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах.

5) Кількість циклів на рік:

$T_{рд} = 46/0,51 = 91$  циклів потрібно на синтез 46 м<sup>3</sup>, з врахуванням втрат виробництва.

### 3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

За виробничий цикл необхідно отримати  $V_{кр} = 0,51 \text{ м}^3$  культуральної рідини, але слід врахувати втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять 10 % ( $E_{ф}$ ).

$$V_{\text{роб.1}} = \frac{V_{\text{кр}}}{1 - E_{\phi}} = \frac{0,51}{1 - 0,1} = 0,56 \text{ м}^3$$

де  $E_{\phi}$  – втрати культуральної рідини під час біосинтезу.

Для культивування необхідний ферментер, геометричний об'єм якого становить:

$$V_{\phi} = \frac{V_{\text{роб.1}}}{K_{\text{з}}} = \frac{0,56}{0,6} = 0,93 \text{ м}^3$$

Найближчий за номінальним об'ємом ферментер  $V_{\text{сф}} = 1 \text{ м}^3$ .

Уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап.1}} = \frac{V_{\text{роб.1}}}{V_{\text{сф}}} = \frac{0,56}{1} = 0,56$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах.

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить 10 % від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища у ферментері становитиме:

$$V_{\text{пс1}} = \frac{V_{\text{роб.1}}}{1 + X_{\phi}} = \frac{0,56}{1 + 0,1} = 0,51 \text{ м}^3$$

де  $X_{\phi}$  – доза посівного матеріалу для ферментера.

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить:

$$V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб.1}} - V_{\text{пс1}} = 0,56 - 0,51 = 0,05 \text{ м}^3 (50 \text{ л})$$

Для одержання 50 л посівного матеріалу розрахунки проводяться аналогічно.

$$V_{\text{роб.2}} = \frac{V_{\text{пм1}}}{1 - E_{\text{ін}}} = \frac{50}{1 - 0,1} = 55 \text{ л}$$

Таку кількість посівного матеріалу (55 л) для засівання ферментера можна отримати під час культивування продуцента у апараті об'ємом:

$$V_{\text{ін.1}} = \frac{V_{\text{роб.2}}}{K_{\text{з}}} = \frac{55}{0,6} = 90 \text{ л}$$

Найближчим за номінальним об'ємом інокулятор  $V_{\text{ін1}} = 100 \text{ л}$ .

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап.2}} = \frac{V_{\text{роб.2}}}{V_{\text{ін1}}} = \frac{55}{100} = 0,55$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах.

Кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{пс2}} = \frac{V_{\text{роб.2}}}{1 + X_{\text{ін}}} = \frac{55}{1 + 0,1} = 50 \text{ л}$$

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пс2}} = 55 - 50 = 5 \text{ л}$$

Для одержання 5 л посівного матеріалу розрахунки проводяться аналогічно.

$$V_{\text{роб.3}} = \frac{V_{\text{пм2}}}{1 - E_{\text{ін}}} = \frac{5}{1 - 0,1} = 5,5 \text{ л}$$

Таку кількість посівного матеріалу (5,5 л) для засівання інокулятора можна отримати під час культивування продуцента у апараті об'ємом:

$$V_{\text{ін.2}} = \frac{V_{\text{роб.3}}}{K_3} = \frac{5,5}{0,6} = 9 \text{ л}$$

Найближчим за номінальним об'ємом інокулятор  $V_{\text{ін2}} = 10 \text{ л}$ .

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап.3}} = \frac{V_{\text{роб.3}}}{V_{\text{ін2}}} = \frac{5,5}{10} = 0,55$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах.

Кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{пс3}} = \frac{V_{\text{роб.3}}}{1 + X_{\text{ін}}} = \frac{5}{1 + 0,1} = 4,5 \text{ л}$$

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{\text{пм3}} = V_{\text{роб.3}} - V_{\text{пс3}} = 5 - 4,5 = 0,5 \text{ л}$$

Для одержання 0,5 л посівного матеріалу використовують качалочні колби об'ємом 750 мл та коефіцієнтом заповнення  $K_{\text{зк}} = 0,2$ . Кількість колб становитиме:

$$N_{\text{колб}} = \frac{V_{\text{пм3}}}{V_{\text{колб}} \times K_{\text{зк}}} = \frac{500}{750 \times 0,2} = 4 \text{ колб}$$

Таким чином, для одержання посівного матеріалу необхідно 4 качалочні колби.

Отже, процес підготовки інокуляту для виробничого біосинтезу у 1 м<sup>3</sup> ферментері з коефіцієнтом заповнення 0,6 складається з 3 стадій (інокулятори об'ємом 100 л, 10 л та 4 качалочні колби).

## РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми

### 4.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу

#### 4.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

##### *Вибір умов і способу культивування.*

При культивуванні *Erwinia carotovora* МТСС 1428 використовуються умови рН – 8,5 при температурі 30 °С, що створює оптимальні умови для росту сторонніх культур мезофільних та алкалофільних мікроорганізмів, які можуть виділяти вторинні метаболіти та пригнічення росту культури. Тому для цього є необхідність створити аспетичні умови культивування даного продуцента. [8].

Оскільки даний мікроорганізм відноситься до облігатних аеробів , це створює необхідність в аерації ферментерів стерильним повітрям.

Під час культивування не утворюється міцелій, тому для покращення інтенсифікації процесів потрібно оснастити ферментер мішалкою.

Також, слід звернути увагу на те, що серед піноутворювальних компонентів входить дріжджовий екстракт та пептон, але в досить малій кількості , що дозволяє відмовитись від використання піногасників.

##### *Вибір типу ферментера*

Всі ферментери (біореактори) можна віднести до одного з трьох основних типів: реактори з механічним перемішуванням , барботажні колони, ерліфтні реактори.

Найчастіше використовуються реактори з механічним перемішуванням, оскільки у них є ряд переваг , а саме :

- Дозволяють легко змінювати технічні умови
- Просту зручність використання , та адаптування до процесів культивування

|             |      |              |        |      |  |             |      |         |
|-------------|------|--------------|--------|------|--|-------------|------|---------|
|             |      |              |        |      | НУХТ БТЕК 04.02.40 КР ПЗ                           |             |      |         |
| Змн.        | Лист | № докум.     | Підпис | Дата | Розділ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми | Літ.        | Арк. | Аркушів |
| Розроб.     |      | Тихолоз Д.А. |        |      |  |             | 21   | 94      |
| Перевір.    |      | Пенчук Ю.М.  |        |      |  | Кафедра БТМ |      |         |
| Консультант |      |              |        |      |  |             |      |         |
| Н. Контр.   |      |              |        |      |  |             |      |         |
| Затверд.    |      | Пирог Т.П.   |        |      |  |             |      |         |

- Мають високий об'єм коефіцієнту масообміну

З недоліків можна відмітити те, що вони не придатні для культивування мікроорганізмів, що утворюють міцелій, який необхідний для синтезу цільового продукту оскільки вони створюють втрати при механічному пошкодженні культури.

Реактори з механічним перемішуванням бувають з різним типом мішалок [9]

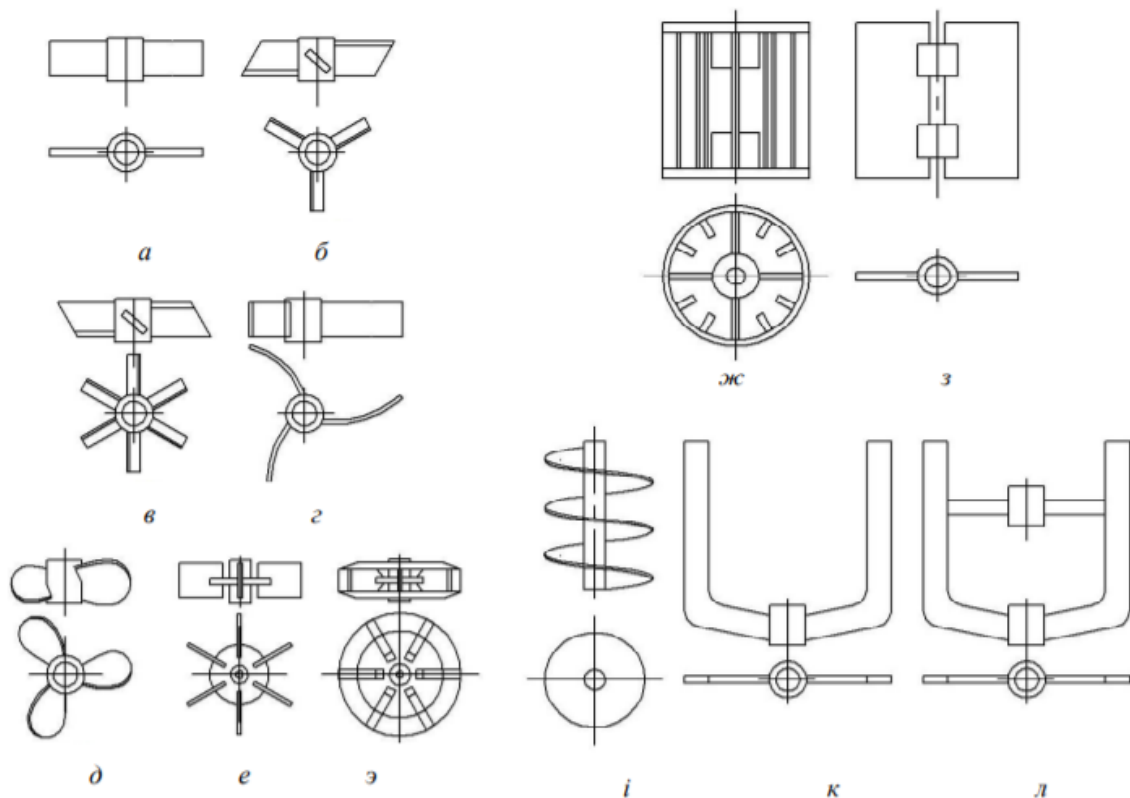


Рис.3.1. Конструкції механічних мішалок: а – лопатева мішалка; б – трьохлопатева мішалка; в – шестилопатева мішалка; г – спіральньо-лопатева мішалка; д –гвинтова мішалка; е – відкрита турбінна мішалка; є – закрыта турбінна мішалка; ж –клітьова мішалка; з – листовая мішалка; і – шнекова мішалка; к – якірна мішалка; л – рамна мішалка

Оскільки культура *Erwinia carotovora* МТСС 1428 не утворює псевдоміцелій, то доцільніше використовувати найпростішу та найдешевшу мішалку – лопатеву. Також на стінки ферментера потрібно встановити відбивні перегородки, що б не утворювалась воронка під дією сили тяжіння.

Швидкість обертання для оптимального культивування становить 180 об/хв , при цій швидкості найкраще розчиняється кисень з подачею 1,5 л(л/хв) , а саме 20% , що сприяє врівноваженому приросту біомаси.

Також ферментер повинен бути оснащений датчиком рН , оскільки потрібно контролювати значення 8,5.

Отже підсумовуючи вище наведені факти, потрібно використовувати ферментер, що має датчик рН , аерації , дволопатева мішалка з швидкістю обертання 180 об/хв. [8]

#### **4.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря**

*E.carotovora* МТСС 1428 є облигатним аеробом, це створює необхідність в аерації ферментерів стерильним повітрям [7].

Оскільки найбільше мікроорганізмів знаходиться над поверхнею землі, то забір повітря будемо здійснювати на висоті приблизно 20-30 м, де їх кількість є сталою. Повітряний компресор засмоктує всередину навколишнє повітря і стискає його для подальшого використання в робочих процесах [10, 11].

Для очистки (стерилізації) повітря, використовують методи фільтрування, а систему підготовки повітря конструюють ступінчастою.

На кожному рівні очищення слід передбачити штуцери з метою відбору проб повітря для визначення концентрації механічних часток до та після фільтрації.

У відповідності з існуючими стандартами фільтрувальні елементи класифікуються на групи і класи залежно від якості фільтрування (ефективності і проникності):

- фільтри грубої очистки;
- фільтри тонкої очистки;
- індивідуальні фільтри.

Повітряні фільтри використовуються для підтримки заданої чистоти повітря, відповідно до технологічних вимог.

Після забору, повітря потрапляє на фільтр грубої очистки, де досягається ступінь його очищення 80 %. Фільтри грубого очищення застосовуються

відразу після забірних решіток повітря та в якості попередньої очистки для систем кондиціонування повітря.

Фільтри грубої очистки можуть мати різну ефективність фільтрації від 65% до 90%, так звана перша ступінь фільтрації. Фільтри грубої очистки призначені для затримки великих механічних частинок розміром більше 5 мкм (пух, листя, волосся, цементний пил і т. ін.). Далі повітря вентилятором подається у теплообмінник, де відбувається його кондиціонування (стабілізуються термодинамічні показники).

Фільтри грубої очистки складаються з каркасу з нержавіючої сталі, в який встановлюється фільтруючий матеріал. Продуктивність по повітрю кожного фільтра не більше 1540 м<sup>3</sup>/год.

Пропонуються використовувати ячеюкові фільтри грубої очистки (зі ступенем очистки 80%) такі як, ФЯУ, ФЯП, ФЯР, ФЯВ, які відрізняються лише типом фільтруючого матеріалу.

Основні типи фільтруючих матеріалів:

- ультраскло,
- хімволокно,
- поліуретан,
- поліестер,
- мельтблоун,
- фільтрувальний папір тощо.

У якості фільтрувального матеріалу ми обираємо поліуретан.

Особливості поліуретану:

- низький початковий опір і висока пиловмісткість,
- екологічно безпечний,
- витримує відновлення,
- нейтральний до дії дезінфікуючих засобів [12].

Фільтри для тонкого очищення повітря найбільш часто застосовують в якості другого ступеня очищення (доочищення). Рекомендується використання модульного картриджного фільтра модель FMW. Це

ефективний фільтр, який має компактну конструкцію і ступінь очищення повітря 99%. Продуктивність фільтра складає 2040 м<sup>3</sup>/год.

Переваги даного фільтра:

- безперервне автоматичне очищення фільтруючих картриджів стисненим повітрям;
- подвійна - дублююча один одного система очищення картриджів за допомогою часового таймера і датчика перепаду тиску;
- ефективність очищення до 99% для часток розміром до 0,5 мікрон;
- легкість в обслуговуванні - необхідно тільки спустошувати пилозбірники,
- в конструкції використовуються екологічно чисті матеріали;
- стійка конструкція, винослива до зовнішніх факторів, відмінні аеродинамічні властивості, висока пиломісткість.

Для остаточної очистки повітря від частинок, що містяться в ньому, і мікрофлори застосовують фільтр типу "Лайк". Такі типи складаються з корпусу і фільтрувального матеріалу, який дає змогу уловлювати частинки розміром 0,04-0,06 мкм. Як фільтрувальний матеріал у ньому використовується ультратонке волокно з перхлоровінілової смоли. Цей матеріал гідрофобний, стійкий до хімічно агресивних середовищ і може експлуатуватися при температурі не вище 60 °С і відносній вологості до 100 %. Ступінь очистки 99,999% [10, 13].

Проаналізувавши вище наведені дані, на першій стадії очистки повітря найдоцільніше для нас буде використовувати фільтри грубої очистки з ефективністю фільтрації 80%. Обираємо фільтр типу ФЯП, на основі особливостей фільтрувального матеріалу. На наступній стадії найкраще буде використати фільтри тонкої очистки картриджного типу, моделі FMW, з ефективністю 99%. Фільтри типу «Лаік» використовують на фінішних стадіях очистки повітря, тобто безпосередньо перед подачею у ферментаційне обладнання. Фільтр затримує більше 99,999% всіх частинок [10, 13, 11].

### 4.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

На будь-якому виробництві важливим є правильний вибір і використання мийних та дезінфікуючих засобів. Не допускається тривале застосування одного дезінфікуючого засобу, оскільки це може призвести до утворення резистентних штамів мікроорганізмів, тому слід періодично комбінувати дезінфікуючі засоби. Рекомендують дезінфікуючий засіб змінювати кожні 10 – 14 днів або застосовувати декілька типів. При виборі дезінфікуючої речовини необхідно враховувати не тільки її бактерицидні та фунгіцидні властивості і спектр дії, але й можливу токсичність для людини.

Не допускається, щоб дезінфікуючий засіб згубно впливав на здоров'я людини, тобто був отруйним чи токсичним у використовуваних концентраціях. Мийні і дезінфікуючі засоби необхідно контролювати щодо мікробіологічної чистоти. Їх розчини слід тримати в попередньо очищених контейнерах (тарі) й зберігати лише протягом установлених термінів [14].

Порівняємо такі дезінфікуючі засоби для персоналу, як «Стериліум», «Манорм», «Аниосгель 85 НПК» та «Неостерил М», які мають широкий спектр дії та відрізняються діючою речовиною.

Вибір будемо робити на основі економічної доцільності. Згідно даних (див. табл. 5.1.) найдешевшим асептичним засобом є «Стериліум». На його заміну обираємо «Неостерил М», який виявляє пролонговану бактерицидну, віруліцидну та фунгіцидну дію. Різні діючі речовини дадуть можливість уникнути резистентних штамів до них [15].

Асептичний засіб «Стериліум» має такі властивості:

- зменшує кількість транзиторної мікрофлори шкіри за 30 секунд у 100 тисяч разів;
- швидкодіючий засіб, що зберігає свою дію протягом 1 години на незахищеній шкірі рук;
- не подразнює шкіру;
- не порушує водно-жирового балансу шкіри.

Засіб володіє фунгіцидною, туберкулоцидною та пролонгованою бактерицидною дією.

Отже, як дезінфікуючі засоби для персоналу пропонуємо застосовувати такі антисептики, як «Стериліум» та «Неостерил М». Обидва засоби мають широкий спектр дії, гарний дезінфікуючий ефект, є безпечними для людини і відносно дешевими [15].

Для обробки приміщень, повітроводів, обладнання використовують такі засоби, як розчин перекису водню, хлорамін Б, етиловий спирт, «Хлорантоїн», «Біомой» тощо. При виборі миючого засобу, будемо опиратися не лише на вартість засобу, а і на необхідну концентрацію розчину в %.

Зважаючи на концентрацію, одним найбільш економічно вихідним варіантом є розчин перекису водню. Перекис водню використовують 0,5-3%, по мірі забруднення, з додаванням 0,5% миючого засобу для миття приміщення. Стерилізація цим розчином при температурі 18 °С повинна тривати 360 хв, а при температурі 50°С — 180 хв. Розчин не має запаху, розпадається на воду і атомарний кисень, який викликає окислення хімічних компонентів мікробних клітин. Недоліком є те, що перекис водню є сильним окисником, що ушкоджує об'єкти з заліза, хрому, свинцю, срібла, марганцю, чавуна, міді, латуні, нелегірованих і низьколегірованих сталей. Не сумісна з лугами.

**Перекис водню** відноситься до високонебезпечних речовин (2 клас небезпеки по ГОСТ 12.1.007). Подразнює шкіру, слизову оболонку очей та верхніх дихальних шляхів. Тому, ми не рекомендуємо його використовувати як дезінфікуючий засіб, адже він не відповідає вимогам [15].

Миючий засіб **хлорамін Б** - містить 25-29 % активного хлору. Відомо, що його протимікробна дія проявляється дуже швидко, але вона недовготривала. Тому ми не використовуватимемо цей хлорвмісний розчин для знезараження поверхонь [15].

**Біомой** - мийний засіб, що містить синтетичні поверхово-активні речовини та протеолітичні ферменти (лужна фосфатаза). На відміну від інших мийних засобів, біомой виявляє високу мийну активність при температурі не вище (40±5) °С. Перевагою є те, що розчини біомою не ушкоджують об'єкти з

нержавіючої сталі, чорного металу з антикорозійним покриттям, алюмінію, скла, гуми, полімерних матеріалів, кахлю, емалі.

Засіб належить до малонебезпечних речовин (4 клас небезпеки по ГОСТ 12.1.007), не виявляє кумулятивні, шкіряно-резорбтивні та алергенні властивості [16].

**Хлорантоїн** ефективно видаляє механічні білкові, жирові забруднення, залишки лікарських засобів із зовнішніх поверхонь тощо. За дезінфікуючою активністю хлорантоїн перевищує в 5-10 разів звичайні дезінфікуючі засоби та виключає застосування лужних миючих засобів. Використання хлорантоїну дозволяє поєднати в одній операції стадії миття, дезінфекції та предстерилізації, скоротити тривалість санітарної обробки [17].

Проаналізувавши вище наведені дані, для дезінфекції поверхонь (приміщення, обладнання) рекомендуємо використовувати розчин «Біомой» та «Хлорантоїн». Обидва засоби мають широкий спектр дії, гарний дезінфікуючий ефект, не псують оброблювальні матеріали, не мають неприємного запаху, є безпечними для людини і відносно дешевими. Характеризуються пролонгованою дією і стабільністю [17].

На фармацевтичних підприємствах для миття ферментаційного обладнання від залишків поживного середовища, культуральної рідини та інших речовин використовують каустичну або кальциновану соду.

**Каустична сода** (їдкий натрій - NaOH) ефективна для миття жирних поверхонь, для миття білкових залишків, залишків солей чи мікроорганізмів, та продуктів їх життєдіяльності. Недоліком є те, що каустична сода є шкідливою для людини (2 клас небезпеки за ГОСТ 12.1.007). При попаданні на шкіру викликає хімічний опік. Подразнює слизову оболонку очей та верхніх дихальних шляхів. Тому ми не рекомендуємо використовувати дану речовину для миття обладнання, щоб уникнути нещасних випадків [15].

**Кальцинована сода** має вигляд білого дрібнокристалічного порошку, який добре розчиняється у воді. У водних розчинах кальцинована сода частково розкладається з утворенням їдкого лугу та гідрокарбонату, які зумовлюють мийні властивості. Вона є більш безпечною для використання (3

клас небезпеки – помірно небезпечна речовина за ГОСТ 12.1.007). Саме тому, ми її обираємо у якості миючого засобу для ферментаційного обладнання. Також, це є більш економічно вигідний варіант [15].

#### 4.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

При використанні колб на качалках для синтезу 600 мл інокуляту потрібно підготувати 600 мл поживного середовища, компоненти якого, при невеликому об'ємі можна простерилізувати в автоклаві, тому поділ композицій буде відбуватись наступним чином:

- *Композиція А* – глюкоза, дріжджовий екстракт, L- аспарагін, пептон (режим стерилізації: 121°C, 20 хв)
- *Композиція Б* –  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (режим стерилізації: 131 °C, 40 хв)
- *Композиція В* –  $\text{NaCl}$ ,  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  (режим стерилізації: 131 °C, 40 хв)

Для вирощування посівного матеріалу в інокуляторах об'ємом 10 л та 100 л поділ композицій буде відбуватись наступним чином (згідно температурних режимів стерилізації):

- *Композиція А*: глюкоза, дріжджовий екстракт, L- аспарагін, пептон (режим стерилізації: 121°C, 20 хв)
- *Композиція Б*:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  (режим стерилізації: 131 °C, 40 хв)

Для виробничого біосинтезу в ферментері об'ємом 1 м<sup>3</sup> композиції будуть поділятися так як і для 10 л і 100 л інокуляторів. Тому необхідно передбачити попереднє приготування титрувальних розчинів а саме 6% розчин хлоридної кислоти для підкислення середовища перед стерилізацією композиції, та 6% розчин гідроксиду натрію для підкислення композиції перед внесенням посівного матеріалу.

- *Композиція А*: глюкоза, дріжджовий екстракт, L- аспарагін, пептон (режим стерилізації: 121°C, 20 хв)

- *Композиція Б:*  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв)

#### **4.2. Обґрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту**

В результаті процесу біосинтезу ми отримали культуральну рідину, яка містить клітини продуцента, залишки поживного середовища, різні позаклітинні продукти метаболізму та ін.

Для того щоб, отримати чистий кінцевий продукт – аспарагіназу, необхідно здійснити ряд послідовних процесів:

1. Відділення біомаси,
2. Дезінтеграція клітин,
3. Осадження сульфатом амонію – концентрація насичення становить 20%,
4. Центрифугування
5. Повторне осадження сіллю – концентрація насичення 60%,
6. Повторне центрифугування,
7. Знесолення,
8. Гель-хроматографія,
9. Концентрування,
10. Стабілізація зразка,
11. Ліофільне висушування [18].

#### **Обґрунтування способу відділення біомаси від культуральної рідини**

Першим етапом виділення ендoferментів є відділення клітин продуцента від культуральної рідини. Для відділення бактеріальних клітин використовують метод фільтрування, флотацію, центрифугування, сепарування тощо [10].

Для відділення клітин від культуральної рідини використовують також флотацію. Однак, застосування даного методу для відділення клітин продуцента від культуральної рідини є недоцільним, оскільки він призначений для згущення більших і важких клітин дріжджів і міксоміцетів. Крім того, ступінь очищення культуральної рідини від клітин за допомогою даного

способу невисокий, що унеможлиблює його використання у технології отримання препарату Аспарагінази.

Швидкість розділення сумішей в центрифугах значно вища, ніж у фільтрах і відстійниках, завдяки більшій рушійній силі, що виникає при обертанні ротора центрифуги разом з суспензією, що знаходиться в ній, або емульсією.

Центрифугування - процес розділення рідких неоднорідних систем у полі дії відцентрових сил. У мікробіологічній промисловості центрифуги широко використовують для розділення суспензій на рідину й тверді фази, що містять мікроорганізми, ферменти, амінокислоти й інші продукти біосинтезу кристалічної або аморфної структур [10, 11].

Відповідно до методів розділення *центрифуги* підрозділяють на:

- відстійні,
- фільтруючі,
- шнекові,
- комбіновані,
- сепаратори.

Істотним недоліком сепараторів при відокремленні біомаси від культуральної рідини є швидке забиття мундштуків і міжтарілкового простору механічними включеннями. Також до недоліків даного методу належать: складність обладнання та велика енергоємність процесу. Застосування сепараторів краще підходить для відокремлення біомаси, яка містить дріжджові клітини.

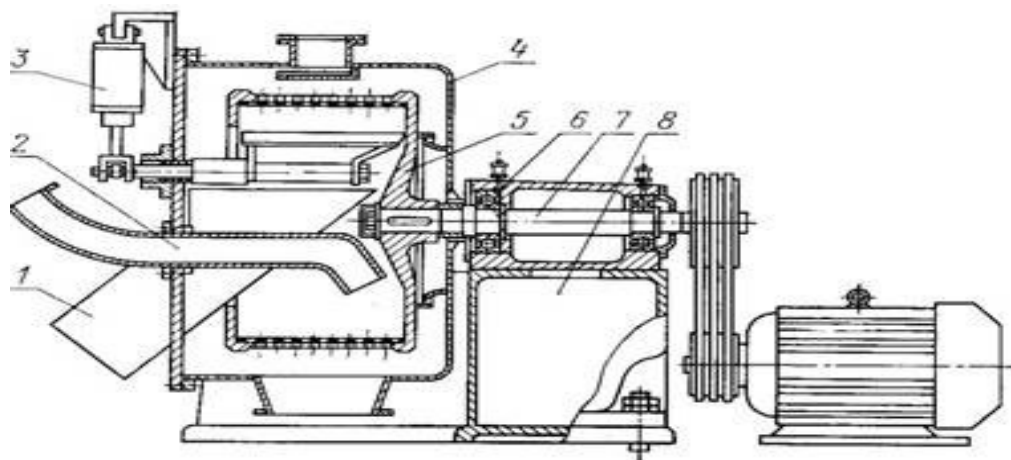
Центрифуги безперервної дії продуктивніші періодично діючих і обслуговування їх значно легше. Тому центрифуги безперервної дії все ширше упродовжуються в промисловість, поступово витісняючи центрифуги періодичної дії. Останні зберігають своє значення у виробництвах невеликого масштабу.

Широкого застосування набули центрифуги фільтруючого типу, які служать для розділення суспензій, у яких тверда фаза має кристалеву або зернисту структуру з розміром зерна 30-150 мкм.

При розділенні суспензій у фільтраційних центрифугах в роторі під дією відцентрової сили відбувається фільтрація рідини через фільтрувальну тканину або металеву сітку з одночасним відкладанням на останній частинок твердої фази; рідина проходить через сита і потім через отвори в роторі викидається в кожух центрифуги, що оточує ротор, а осад вивантажується або під час обертання ротора, або після його повного зупинення [10, 11, 13].

Процес розділення у фільтраційних центрифугах складається з таких стадій:

- 1) утворення осаду;
- 2) ущільнення осаду;
- 3) механічне сушіння осаду;
- 4) промивання осаду (застосовується для полегшення видалення його з поверхні ротора).



*Рис.4.2. Фільтруюча центрифуга МГ-350*

Даний процес проходить при таких параметрах: швидкість обертів – 9000 об/хв., час процесу – 30 хвилин.

***Перевага центрифуги:***

- простота конструкції,
- зручність в обслуговуванні,
- широкий діапазон габаритних розмірів (типорозмірів),

- можливість обробки суспензій у широкому діапазоні концентрацій твердої фази та розмірів частинок,
- висока якість промивки твердої фази,
- отримання освітленої рідкої фази,
- завдяки герметичності, конструкції можуть працювати у вибухонебезпечних приміщеннях, а також у приміщеннях з підвищеною вологістю [10, 11, 13, 19].

Як фільтрувальну основу застосовують полімерні плетені сітки. Оскільки фільтрувальні основи часто чинять вирішальний вплив на якість відцентрового фільтрування, вони повинні задовольняти таким вимогам:

- гарно затримувати тверду фазу суспензії;
- мати мінімальний гідравлічний опір;
- мати гарну адгезію до фільтрувального матеріалу;
- бути достатньо міцними;
- не набухати при зіткненні з рідиною;
- характеризуватися рівномірним розподіленням властивостей.

Від правильного вибору фільтрувальної основи, способу кріплення, зручності промивки, очистки та заміни, а також від довговічності та надійності багато в чому залежить ефективність застосування центрифуги.

Суттєвий недолік осаджувально-фільтруючих центрифуг з шнековим вивантаженням:

- високий вміст твердого в фугаті,
- значна затрата енергії на переміщення осаду і на витрати в диференціальному редукторі [10].

### **Обґрунтування вибору способу дезінтеграції клітин**

Оскільки фермент аспарагіназа є внутрішньоклітинним, після відділення біомаси, необхідно зруйнувати клітинну стінку, для отримання безклітинного екстракту.

Хоча позаклітинні ферменти більш стабільні ніж внутрішньоклітинні, все ж більша їх частина локалізована всередині клітин. Існує багато методів руйнування клітин, що обумовлено різноманітністю типів клітин (еритроцити,

які легко руйнуються та клітини деяких бактерій, для руйнування яких необхідна сильна механічна дія). Тому методи руйнування клітин поділяють за силою дії [20].

На сьогоднішній день найбільш вживаними є такі методи [19]:

1. *Руйнування клітинної стінки бактеріальних клітин з використанням ферменту лізоциму і подальшій обробці.* Метод зазвичай використовується для руйнування клітинної стінки грампозитивних бактерій, за рахунок атавації пептидогліканів клітинної стінки, внаслідок чого глікозидний зв'язок легко руйнується. Однак недоліками даного методу є дороговизна ферменту та руйнація клітин в декількох місцях, внаслідок чого залишки клітинних стінок мають різні розміри і різну масу. Наявність у розчині неоднорідних утворень ускладнює подальше відділення білка від зруйнованих клітин, залишки яких, рівні по масі білка, забруднюють напівпродукт [20].
2. *Руйнування клітин у рідких середовищах.* Руйнування клітин, які знаходяться в суспензії, відбувається або при обертанні лопатей чи поршня (блендери), або при поступальному рухові вгору і вниз поршня або шарів (гомогенізатори).
3. *Руйнування клітин за допомогою високого тиску.* Метод використовується переважно для руйнування мікробних клітин.

Для цього використовують спеціальні преси, наприклад френч-прес (French Pressure), в якому утворюється тиск до 104–107 Па.

4. *Руйнування за допомогою ультразвуку.* Клітини можна руйнувати також за допомогою високочастотних ультразвукових коливань. Основним недоліком даного методу є вивільнення значної кількості тепла [18].
5. Досить популярний спосіб руйнування клітини за допомогою гомогенізатора Гаулина з вмістом різної хімічної природи осаджувачів. Недоліком відомого способу є багатостадійна послідовність руйнування клітин-продуцента. Це пов'язано з тим, що тиск, що створюється в гомогенізаторі Гаулін, що становить МПа, не забезпечує повного руйнування клітини-продуцента за один прохід культури клітин через

гомогенізатор. Повне руйнування клітини досягається тільки при неодноразовому, наприклад двох чи трьох разовому, пропусненні культури клітин-продуцента через гомогенізатор. На що затрачається час виділення [20].

### **Обґрунтування вибору способу осадження ферменту**

Наступна стадія є осадження білків в безклітинному екстракті.

Найчастіше для осадження ферментів використовують нейтральні солі (в цьому випадку процес називають *висолюванням*) або органічні розчинники, а також методи, засновані на зміні температури або рН розчину, додаванні високомолекулярних полімерів і ін. У якості розчинника зазвичай використовують: етанол, ацетон, ізопропіловий спирт та метанол [18].

При додаванні до розчину ферменту органічного розчинника знижується діелектрична постійна середовища. При цьому, як при висолюванні, руйнується оболонка гідрату білка, і він випадає в осад. Концентрація розчинника, необхідна для осадження різних білків, природно, також розрізняється, що дозволяє проводити їх фракціонування. При насиченості безклітинного екстракта сульфатом амонію до 20% вдається позбавитися фільтруванням від частини баластних білків. Після відділення отриманого осаду, методом фільтрування, здійснюють повторне висолювання рідини сульфатом амонію до концентрації 60% - отримують осад, що містить переважно всю активність аспарагінази [10, 18, 20].

Найчастіше для проведення висолювання використовують сульфат амонію (завдяки його високій розчинності у воді і низькій вартості), рідше — хлорид натрію. Різні білки випадають в осад при різних концентраціях солі в розчині, у зв'язку з цим процес висолювання використовують не тільки для виділення ферментів, але і для їх очищення від небажаних домішок.

На процес сольового фракціонування ферментів істотно впливає температура. В більшості випадків цей процес проводять при температурі +4°C. Підвищення температури приводить до денатурації багатьох ферментів, оскільки їх термолабільність при додаванні розчинників сильно зростає.

Також, для осадження L-аспарагінази застосовують досить високу концентрацію спирту 20-60%, при додавання приблизно 2-х його об'ємів на 1 об'єм розчину ферменту. Вихід на цій стадії становить 55-62% [21].

Для підвищення ступеня очищення L-аспарагінази фракціонування спиртом проводять при підвищеній температурі (20-30°C). Для збільшення виходу шляхом запобігання денатурації ферменту необхідно додавати до датково стабілізатор – аспарагін.

При двократному осадженні 4 об'ємами ацетону вихід аспарагінази становитиме 24-34%, що є значно меншим ніж при осадженні сульфатом амонію [21].

Недолік процесу осадження органічними розчинниками полягає в тому, що вживані реагенти порівняно дорогі, вогненебезпечні і вельми отруйні, тому потрібне виконання відповідних заходів безпеки.

Одже, оптимальними умовами для осадження ферменту є:

- тип розчинника – сульфат амонію, який є безпечним та економічно вигідним;
- вихід на стадії становитиме 78%,
- температура при якій здійснюється процес висолювання +4°C,
- процес проходить при дворазовому насиченні сульфатом амонію: перше висолювання - 20%, друге - 60% [10].

### **Обґрунтування способу видалення осаду**

Після осадження сульфатом амонію необхідно видалити осад.

Для відділення ферментного осаду з розчину можна використовувати такі методи: центрифугування та фільтрацію.

Метод фільтрування має такі недоліки:

- мала швидкість фільтрування;
- неможливість забезпечення санітарно-гігієнічних умов.

Переваги методу центрифугування:

- мала енергоємність процесу;
- більша швидкість фільтрування;
- простота конструкції;

- висока продуктивність;
- компактність обладнання.

До основних переваг центрифуг відноситься зручність у користуванні, простота конструкції, автоматичне управління, можливість обробки суспензій у широкому діапазоні концентрацій твердої фази та розмірів частинок, швидке і ефективне розділення фаз.

### **Обґрунтування способу очищення**

Серед лабораторних методів очистки, фракціонування та аналізу структури білків, нуклеїнових кислот та їх компонентів сукупність різних хроматографічних методів займає центральне місце. Жоден інший метод не може порівнятися з хроматографією за широтою кількісного діапазону. Хроматографія базується на тому, що розчинені речовини відстають від фронту розчинника по мірі його проходження по носію.

Фракціонування хроматографічних методів за принципом їх фракціонування:

- гель-фільтрація,
- розподільча,
- адсорбційна,
- афінна,
- іонообмінна хроматографія тощо.

Для очищення аспарагінази використовують лише гель- та іонообмінну хроматографію. На основі фізико-хімічних властивостей речовини пропонується використовувати гель-хроматографію на CM-Sepharose FF. Знесолений осад ферментного препарату наносять на колонку з CM-Sepharose FF, що врівноважена калій-фосфатним буфером. Елюцію цільового продукту проводять при показнику рН 7,0-7,6. Швидкість потоку становить 6,7 мл/хв.. Вихід цільового продукту на цій стадії становить 76%.

Для прикладу наведемо хроматографічну очистку ферментного осаду з використанням колонки з Диасфером СТ-150. Використовується той же самий буфер, рН становить 7,2. Суттєво різниться швидкість очистки, вона становить – 3мл/хв. Основним недоліком є малий вихід – 50% [22, 23, 24, 25].

Обираємо хроматографічну очистку на CM-Sepharose FF, перевагою якої є більший вихід на 26%, що є дуже суттєвим на виробництві.

Кінцевий етап хроматографічної очистки напівфабриката аспарагінази являє собою стадію концентрування зразка, одночасно супроводжуючи більш глибокого ступеню очистки .

### **Обґрунтування вибору стабілізатора аспарагінази.**

Відомо, що для підвищення стабільності аспарагінази при зберіганні до препарату додають різноманітні цукри. Ліофілізація ферментів відбувається в присутності таких цукрів:

- глюкоза,
- маніт,
- сорбіт.

Встановлено, що 100%-е зберігання активності в процесі ліофілізації досягається при використанні глюкози, маніта (0,1%) і суміші сорбітола і NaCl (відповідно 0,5% і 10мМ). Однак, при зберіганні при  $-20^{\circ}\text{C}$  найбільш стабільним виявився препарат ферменту, стабілізований додаванням 0,5% глюкози. При зберіганні протягом 1 місяця ліофілізованого препарату аспарагінази при  $-20^{\circ}\text{C}$  активність ферменту практично не міняється [18].

### **Обґрунтування вибору способу сушіння**

Після виділення та очистки ферменту необхідно його висушити – видалити з продукту вільну та зв'язану воду. Висока якість, стабільність продукту залежить від технічного рівня сушки - ступеня автоматизації та механізації режимів процесу, досконалості сушильної апаратури, чистоти повітря. Сучасні концепції фармацевтичної науки в галузі теорії сушіння свідчать, що теплові та масообмінні процеси нерідко супроводжуються зміною структурно-механічних властивостей висушеного матеріалу, освітою поліморфних форм і кристаллогидратів лікарських речовин, реакціями окислення, гідролізу, що призводять до зміни розчинності, всмоктування, зниження або втрати терапевтичної активності лікарських

речовин. Правильно організований процес сушіння дозволяє зберегти або поліпшити властивості матеріалів [26].

Оскільки ферменти в основному термолабільні, для їх висушування необхідно застосовувати методи які не призводять до втрати біологічної активності.

На сьогоднішній день широкого розповсюдження отримав метод ліофільного (сублімаційного) сушіння ферментів, яке відбувається у порівняно низьких температурах:  $-10\dots-15^{\circ}\text{C}$  [26].

Сублімаційна сушка - це найбільш сучасний і досконалий спосіб сушіння продуктів. Незважаючи на те, що він був відкритий ще на початку двадцятого століття, широке застосування він отримав тільки відносно нещодавно в зв'язку з високою вартістю обладнання [27].

Суть методу полягає в тому, що при низькому атмосферному тиску (поріг «потрійна точка» з розрахунку для води при  $0,01^{\circ}\text{C}$  тиск  $611,657\text{ Па}$ ) вода існує тільки в твердому і газоподібному агрегатному стані, таким чином за даних умов можна лід перевести у пар безпосередньо без переводу його в рідину.

При ліофілізації заморожені продукти в умовах вакууму нагріваються до  $0^{\circ}\text{C}$ , таким чином лід випаровується, а всі вітаміни та інші корисні речовини залишаються в продуктах.

До найбільш важливих переваг ліофільного висушування можна віднести [27]:

- тривалі терміни зберігання кінцевого продукту;
- збереження висушеним матеріалом структурної цілісності і біологічної активності (при зволоженні матеріал відновлює свої початкові властивості);
- ліофільно висушені продукти дуже легко розчиняються;
- відсутність вспінювання;
- мала маса готового продукту.

### **Обґрунтування стадії пакування цільового продукту**

Вибір упаковки великим чином залежить від властивостей самого цільового продукту та умови його зберігання. Необхідним є обирати саме таку тару, яка захищала б цільовий продукт від пошкоджень, сприяла безпечному транспортуванню, збереженню та продажу.

Найбільш ефективним методом введення протионкологічних препаратів для їх максимальної ефективної дії є внутрішньовенні ін'єкції чи інфузії. Тому для готової лікарської форми обираємо саме спосіб ліофілизованого порошку у флаконах. Лікарські засоби у формі сухого порошку мають довший термін зберігання, що є економічно вигідним. Проте такі порошки потребують попередньої підготовки для введення (розчинення ін'єкційними, фізіологічними чи іншими розчинами).

#### **4.3. Обґрунтування допоміжних робіт для стадії виділення та очищення цільового продукту**

Під час виділення та очищення L-аспарагінази на етапі знесолення та гель-хроматографії використовується буфер А для розчинення ферментного осаду та калій хлорид в якості елюенту для виділення L-аспарагінази з гель-хроматографічної колонки. Також перед сушінням в ліофільній сушарці необхідно стабілізувати ферментний розчин за допомогою розчину глюкози для кращого зберігання готового продукту.

#### **4.4. Підбір технологічного обладнання для післяферментаційних стадій з урахуванням матеріальних потоків по стадіях**

Визначивши оптимальний метод виділення та очищення L-аспарагінази було теоретично розраховано кількість реактивів, необхідних на весь процес, та підібрано необхідне обладнання, дані значення наведенні в таблиці 4.9.

Вихідні данні:

1. Об'єм культуральної рідини з однієї ферментації -  $V_{кр} = 0,51 \text{ м}^3$ ;
2. Концентрація біомаси у КР = 7,15 г/л;
3. Концентрація цільового продукту у КР = 515,7 мг/л;
4. Втрати на стадіях виділення та очищення цільового продукту складають 30% ( $510 \text{ л} \times 515,7 \text{ мг/л} = 263,007 \text{ г} - 30 \% = \underline{184,1 \text{ г}}$ )

Таблиця 5.2

## Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях

| № п/п   | Назва стадії (операції)                          | Матеріальні потоки на стадії | Кількість по стадіях                   |                        |                                | Необхідне обладнання |
|---|--|------------------------------|--|------------------------|--------------------------------|----------------------|
|   |  |                              | Надійшло                               | Втрати,<br>(Разом 21%) | Вийшло                         |                      |
| 1   | 2  | 3                            | 4                                      | 5                      | 6                              | 7                    |
| <b>ТП 10. Зберігання культуральної рідини</b> |  |                              |  |                        |                                |                      |
| 1   | Зберігання культуральної рідини                  | КР                           | 0,51 м <sup>3</sup><br>(510 л)         | -                      | 0,51 м <sup>3</sup><br>(510 л) |                      |
| <b>ТП 11. Відділення біомаси</b>              |  |                              |  |                        |                                |                      |
| 2   | ТП 11.1.<br>Центрифугування культуральної рідини | Біомаса                      | 3,65 кг (0,51×7,15)<br>90 %<br>36,5 кг | 1,9 кг<br>(5%)         | 34,6 кг                        |                      |
|   |  | Фугат                        | 473,5<br>(510-36,5)                    | -                      | 473,5 л                        |                      |
| <b>ТП 12. Гомогенізація</b>                   |  |                              |  |                        |                                |                      |
| 3   | ТП 12.1. Дезінтеграція клітин                    | Біомаса (волога)             | 34,6 кг                                | -                      | -                              |                      |
|   |  | Клітинний дезінтеграт        | -                                      | -                      | 34,6 л                         |                      |
| 4   | ТП 12.2.Видалення уламків клітин                 | Уламки клітин                | 3,65 кг<br>(7,15× 510 л)               | -                      | -                              |                      |
|   |  | Фугат                        | 30,95 л<br>(34,6 л - 3,65 кг)          | 1,55 л<br>(5%)         | 29,4 л                         |                      |
| <b>ТП 13. Осадження ферменту</b>              |  |                              |  |                        |                                |                      |
| 5   | ТП 13.1. Фракціонування 20 % сульфату амонію     | Сульфат амонію               | 5,88 кг                                |                        |                                |                      |
|   |  | Фугат                        | 29,4 л                                 |                        |                                |                      |
| 6   | ТП 13.2.<br>Центрифугування                      | Фугат                        | 29,4 л                                 |                        |                                |                      |
|   |  | Осад                         | 5,88 кг                                |                        |                                |                      |
|   |  | Супернатант                  | 23,52 л                                | 1,22 л                 | 22,3                           |                      |

|  |   |                                  |                         |              |                        |  |
|--|---|----------------------------------|-------------------------|--------------|------------------------|--|
|  |   |                                  | (29,4 кг – 5,88)        | (5%)         |                        |  |
| 7                                      | ТП 13.3. Фракціонування<br>60 % сульфату амонію | Сульфат амонію                   | 13,38 кг                |              |                        |  |
|  |   | Супернатант                      | 22,3 л                  |              |                        |  |
| 8                                      | ТП 13.4.<br>Центрифугування                     | Розчин з<br>ферментним<br>осадам | 22,3 л                  |              |                        |  |
|  |   | Супернатант                      | 8,3 л<br>(22,3 – 13,38) |              |                        |  |
|  |   | Ферментний осад                  | 14                      | 1,4<br>(10%) | 12,6                   |  |
| <b>ТП 14. Виділення L-аспарагінази</b> |   |                                  |                         |              |                        |  |
| 9                                      | ТП 14.1. Знесолення                             | Ферментний осад                  | 12,6 л                  |              |                        |  |
|  |   | Буфер А                          | 12,6 л                  |              |                        |  |
|  |   | Sephadex G-50                    | 5 л                     |              |                        |  |
|  |   | Знесолений розчин                | 10,2 л                  | 1 л<br>(10%) | 9,2                    |  |
| 10                                     | ТП 14.2. Гель-<br>хроматографія                 | Знесолений розчин                | 9,2                     |              |                        |  |
|  |   | Буфер А                          | 25,2                    |              |                        |  |
|  |   | CM-Sepharose FF                  | 5                       |              |                        |  |
|  |   | Елюент                           | 10                      |              |                        |  |
|  |   | Елюат                            |                         | 1 л<br>(10%) | 9 л                    |  |
| <b>ТП 15. Концентрування</b>           |   |                                  |                         |              |                        |  |
| 11                                     | ТП 15.1.<br>Ультрафільтрація                    | Елюат                            | 9 л                     |              |                        |  |
|  |   | Пермеат                          |                         |              | 7,2 л<br>(9 л – 1,8 л) |  |
|  |   | Ультраконцентрат                 | 1,8 л<br>(9 л – 80%)    | 0,2<br>(10%) | 1,6 л                  |  |
| <b>ТП 16. Сушіння</b>                  |   |                                  |                         |              |                        |  |
| 8                                      | ТП 16.1. Сушіння                                | Ультраконцентрат                 | 1,6                     |              |                        |  |
|  |   | Розчин глюкози                   | 0,01                    |              |                        |  |

|                          |   |   |         |               |         |  |
|--------------------------|---|---|---------|---------------|---------|--|
|                          |   | Висушена L-аспарагіназа                                       | 0,24    | 0,03<br>(10%) | 0,21    |  |
| <b>ПМВ 17. Пакування</b> |   |   |         |               |         |  |
| 9                        | ПМВ 17.1. Фасування, пакування, маркування аспарагінази | Висушена L-аспарагіназа                                       | 0,21 кг |               |         |  |
|                          |   | Упакований в поліетиленовий пакет (по 100 г) цільовий продукт |         | 0,02<br>(5%)  | 0,19 кг |  |

## РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання

Специфікацію обладнання, зображеного на апаратурній схемі (див. графічна частина), наведено у табл. 5.1.

Таблиця 5.1.

### Специфікація ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу

#### L-аспарагінази *Erwinia carotovora* МТСС 1428

| Позиція             | Найменування                  | Кількість | Технічна характеристика   |
|---------------------|-------------------------------|-----------|---|
| 1                   | 2                             | 3         | 4   |
| Д-1                 | Промисловий дозатор рідин     | 1         | Промисловий дозатор води та рідин «БЕКАС»БС-2150, мінімальний крок дозування 0,025 л, потокова точність дозування +/- 0,03 л, витрата рідини 0,03-3 м <sup>3</sup> /год. Виробник: «ЦентрРосОборудование» (Росія). <sup>1</sup> |
| З-2                 | Збірник для хлоридної кислоти | 1         | Збірник об'ємом 2 л, ширина 32 см, довжина 35 см, висота 80 см, боросилікатне скло марки 3.3., оснащений мішалкою, сорочкою. Виробник: «Креатор» (Росія). <sup>2</sup>  |
| Д-3<br>Д-15<br>Д-18 | Дозатор (ваги)                | 3         | Ваги технічні електронні AXIS BD3000/0.1, діапазон зважування від 0,1 г до 3 кг, ціна поділки 0,1 г, IV клас точності. Виробник: «Уніпро» (Україна). <sup>3</sup>   |
| З-4                 | Збірник для натрій гідроксиду | 1         | Збірник об'ємом 2 л, ширина 32 см, довжина 35 см, висота 80 см, боросилікатне скло марки 3.3., оснащений мішалкою, сорочкою. Виробник: «Креатор» (Росія). <sup>2</sup>  |
| ПЗ-5                | Пристрій для забору повітря   | 1         | Повітрязбірник металевий типу АІІ серії 5.903-20, витрата теплоносія у трубопроводі 6000 м <sup>3</sup> /год. Виробник: «Промтрубопроводкомплект» (Україна). <sup>4</sup>   |
| Ф-6                 | Фільтр грубої очистки повітря | 1         | Фільтр грубої очистки повітряний магістральний NEW FILTER. Очищення від фракцій розміром більше 1 мкм, залишковий вміст масла - 0,5 мг/м <sup>3</sup> . Виробник: «NEW FILTER» (Україна). <sup>5</sup>                          |
| К-7                 | Компресор                     | 1         | Компресор поршневий Matarì M1100F75-3, продуктивність 1700 л/хв, потужність двигуна 7,5 кВт. Фірма: «STORGOM» (Україна). <sup>6</sup>   |
| Т-8                 | Теплообмінник-охолоджувач     | 1         | Теплообмінник кожухотрубний. Застосування від 1 до 4 холодильних контурів, холодильна продуктивність 18-1500 кВт. Виробник: «Глобал Фрост» (Україна). <sup>7</sup>  |

|             |      |              |        |      |                                      |             |      |         |
|-------------|------|--------------|--------|------|--------------------------------------|-------------|------|---------|
|             |      |              |        |      | НУХТ БТЕК 04.02.40 КР ПЗ             |             |      |         |
| Змн.        | Лист | № докум.     | Підпис | Дата |                                      |             |      |         |
| Розроб.     |      | Тихолоз Д.А. |        |      | Розділ 5. Специфікація<br>обладнання | Літ.        | Арк. | Аркушів |
| Перевір.    |      | Пенчук Ю.М.  |        |      |                                      |             | 44   | 94      |
| Консультант |      |              |        |      |                                      | Кафедра БТМ |      |         |
| Н. Контр.   |      |              |        |      |                                      |             |      |         |
| Затверд.    |      | Пирог Т.П.   |        |      |                                      |             |      |         |

|                      |   |   |  |
|----------------------|---|---|--|
| Р-9                  | Ресивер                                     | 1 | Ресивер для стисненого повітря промисловий, робочий тиск 0,6-1,6 МПа, матеріал корпусу 09Г2С/08Х18Н10Т. Виробник: «Укргазкомплект-2010» (Україна). <sup>8</sup>  |
| Т-10                 | Теплообмінник-нагрівач                      | 1 | Теплообмінник пластинчастий SWEP V80Hx80/1P-SC-S, матеріал пластин – сталь AISI 316, температура від 195 до + 350 °С, потік до 640 м <sup>3</sup> /год, робочий тиск до 40 бар. Фірма: «Промхолод-Рівне» (Україна). <sup>9</sup>   |
| Ф-11                 | Головний фільтр очистки                     | 1 | Фільтр складчастий ФяС-К класу F8. Фільтруючий матеріал на тканинній основі, ефективність очистки 92%, номінальне повітряне навантаження 12100-14400 м <sup>3</sup> /год*м <sup>2</sup> . Виробник: «Фолтер-Україна» (Україна). <sup>10</sup>                                      |
| Д-12<br>Д-21         | Дозатор                                     | 2 | Дозатор для сипучих речовин, об'єм дози 0,2-10 кг, похибка дозування 0,1%, матеріал – нержавіюча сталь. Виробник: «Політехнік» (Україна). <sup>11</sup>  |
| З-13                 | Збірник для композиції А                    | 1 | Збірник WHE Bio System об'ємом 500 л, діаметр 635 мм, висота циліндричної частини 1070 мм, матеріал нержавіюча сталь. Компанія: «Perry Videx» (Україна). <sup>12</sup>   |
| Н-14<br>Н-24         | Насос циркуляційний                         | 2 | Циркуляційний насос типу in-line (сухий ротор) Mas Daf INM 40-125, продуктивність 14,5 м <sup>3</sup> /год, матеріал корпусу – чугун. Виробник: «PROFIMANN» (Україна). <sup>13</sup>   |
| Ф-16<br>Ф-19<br>Ф-22 | Індивідуальний фільтр                       | 3 | Фільтр індивідуальний ФяС класу очищення Н14, ефективність 99,995%, площа фільтрації від 2 до 25,6 м <sup>2</sup> , номінальна продуктивність 1200 м <sup>3</sup> /год. Є резинове ущільнення. Виробник: «Фолтер-Україна» (Україна). <sup>10</sup>                                 |
| ІН-17                | Інокулятор                                  | 1 | Інокулятор ХС-10L об'ємом 10 л, ширина 50 см, висота 50 см, довжина 120 см, оснащений барботером, температурним датчиком, лопатевою мішалкою (180 об/хв), пробовідбірником, скло боросилікатне марки 3.3., сталь нержавіюча марки 304. Виробник: "Креатор" (Росія). <sup>2</sup>   |
| ІН-20                | Інокулятор                                  | 1 | Інокулятор об'ємом 100 л, ширина 70 см, висота 70 см, довжина 260 см, оснащений барботером, температурним датчиком, лопатевою мішалкою (180 об/хв), пробовідбірником, скло боросилікатне марки 3.3., сталь нержавіюча марки 304. Виробник: "Креатор" (Росія). <sup>2</sup>         |
| ФР-23                | Ферментер                                   | 1 | Ферментер об'ємом 1 м <sup>3</sup> , діаметр 970 мм, загальна глибина 1450 мм (включаючи 120 мм еліптичне дно і кришка), оснащений сорочкою, барботером, пробовідбірником, лопатевою мішалкою (180 об/хв), сталь нержавіюча 316L. Компанія: «Perry Videx» (Україна). <sup>14</sup> |
| Р-24, Р-25, Р-35     | Збірник для зберігання культуральної рідини | 1 | Реактор змішувач від фірми Кабельфармтехніка. Робочий тиск в корпусі -0,7 +3 бару.   |

|  |                                    |    |   |
|--|------------------------------------|----|---|
| Н-26, Н-27, Н-33, Н-38, Н-44, Н-27, Н-51, Н-52, Н-55, Н-58, Н-60, Н-64 | Насос відцентровий                 | 17 | Насос відцентровий від фірми Calpeda NM 50/16A/B з нержавіючої сталі. Продуктивність - 8 м3/год, потужність - 5,5 кВт, напір - 50 м ст.р.   |
| Ц-26, Ц-31, Ц-36   | Центрифуга                         | 2  | Горизонтальна центрифуга виготовлена з нержавіючої сталі 304, виробник Індонезія, швидкість обертів від 2500-10000 об/хв з системою плавної регулювання, діаметр барабана - 260 мм  |
| Г-28   | Наногомогенізатор                  | 1  | Гомогенізатор типу «Microfluidizer», тиск -207 МПа, швидкість проходження 330-450мл/хв. Метал: нержавіюча сталь. Об'єм 80 л. Виробник: Німеччина.   |
| З-42, З-37, З-43, З-49, З-58   | Збірник                            | 1  | Це закрита циліндрична ємність, об'ємом 100 л. Матеріал – нержавіюча сталь.   |
| ГХ-39, ГХ-40, ПХ-41  | Колонка з Sephadex                 | 1  | Габаритні розміри 10×3,2 см. Об'єм 5,5л.  |
| ВФ-45, ВФ-53, ВФ-57, ВФ-62, ВФ-63                                      | Вугільний фільтр                   | 3  | Фільтр ECOSOFT FPA 2162 CG125<br>Втрата води на регенерацію - 0.8-1.9 м3. Країна-виробник Україна<br>Продуктивність - 10 л/ч  |
| ФП-46, ФП-52   | Піщаний фільтр                     | 2  | Піщаний фільтр - тип WGSF 10, Виробник: Aquina<br>Країна виробник: Німеччина Швидкість фільтрації 10 літр/хв  |
| УЗО-48   | Установка зворотнього осмосу       | 1  | Система зворотного осмосу складається із однієї, двох та трьох колон діаметром 4 дюйми, що містять 2 осмотичні мембрани типу HIGH POWER .<br>Номинальна продуктивність - 300-900 л/год<br>Виробник: Тогау, Японія.<br>Мембрана - ТМН20А-430   |
| Ф-50, Ф-59   | Фільтр для індивідуальної очистки. | 2  | Продуктивність – 250 м3/год. Е=99,999 %.<br>Фільтрувальний матеріал - ультратонке волокно з перхлоровінілової смоли. Повітряний сепараторний типу «Лаік»  |
| ЛФ-73  | Ліофільна сушка                    | 1  | Модель SMART LYO™ SL 200<br>Площа полиці – 10 м2<br>Кількість полиць 9+1<br>Розмір полиць - 914 x 1219<br>Температура полиці -55 - +70<br>Потужність конденсатора – 200 кг/добу<br>Температура конденсатора: -75<br>Розміри установки: l×w×h (мм): 5600×3000×4000<br>Маса установки – 9 т |

|                           |   |   |  |
|---------------------------|---|---|--|
| ГФ-65,<br>ГФ-68,<br>ГФ-69 | Стіл для сортування пробок, флаконів та ковпачків                     | 1 | Прямокутної форми, покритий зверху листом нержавіючої сталі. Обладнаний навісними лампами денного світла. З трьох сторін стіл обмежений бортиком висотою 150 мм. Сталь 12Х18Н10Т.  |
| ГФ-70                     | Установка для миття алюмінієвих ковпачків                             | 1 | Установка складається з рами, камери миття; трубопроводів для подачі повітря, пари, води очищеної; трубопроводу переливу, електродвигуна, електрошафи. Продуктивність 68–80 тисяч штук за цикл. Тривалість циклу не більше 120 хв. Об'єм камери 0,78 м <sup>3</sup> . Виробник: ВАТ «НИКТИ спецоборудование», м. Маріуполь.  |
| ГФ-67                     | Апарат для повітряної теплообробки                                    | 1 | Температурні режими, що задаються 85, 160, 180, 220 °С. Заданий час витримки 0–999 хв. Процес стерилізації здійснюється автоматично. Завантаження та розвантаження вручну. Процес стерилізації здійснюється автоматично.   |
| ГФ-66                     | Установка миття, силіконування, стерилізації і сушіння гумових пробок | 1 | Установка складається зі станини, посудини, камери миття, насоса з приводом, трубопроводу передачі пробок, апарата стерилізації, пульта керування, ємностей для стерильних пробок. Продуктивність установки, пробок за цикл, 90 тисяч штук. Тривалість одного циклу роботи установки 180 хв. Завантаження пробок вручну, вивантаження – самопливом. Трубопроводи подачі пари й очищеної води оснащені фторопластовими фільтрами. Виробник: ВАТ «НИКТИ спецоборудование», м. Маріуполь. |
| ГФ-69                     | Автомат для миття флаконів АМФ-9-6                                    | 1 | Автомат миття флаконів складається з столу-накопичувача, ланцюгового транспортеру, блоку вібраторів, ванни для води очищеної, вузла споліскування флаконів, електропульту управління. Продуктивність 5400 флаконів за годину. Мийна машина оснащена вузлом для продування флаконів за допомогою стисненого повітря. Виробник: ПАТ «Київмедпрепарат»  |
| СШ-71                     | Стерилізатор тунельний  | 1 | Тунельний стерилізатор «Rugoklenz» прохідний з рухомою нержавістальною стрічкою, корисна ширина сітки конвеєра 600 мм, оснащений теплоелектронагрівачем. Укомплектований фільтрами для очищення повітря. Виробник: фірма «Klenzaid», Індія.  |
| ГФ-72                     | Фасувальний автомат   | 1 | Апарат для розливу марки AFG-320V-LE, RRD. Складається з накопичувача карусельного типу для флаконів з безступінчастим регулюванням швидкості обертання; апарата фасувально-закупорювального, обладнаного пристроєм з кондиціонером і ламінаром, автомата для обкатування флаконів алюмінієвими ковпачками, стрічкового конвеєра. Продуктивність 132 до 320 флаконів за хвилину. Виробник фірма «Bosch»  |

|       |   |   |   |
|-------|---|---|---|
| ГФ-74 | Машина для наклеювання етикеток   | 1 | Призначений для наклеювання липких етикеток (етикеток-самоклейок) на флакони. Швидкість наклеювання, 6000 флаконів за годину. Виробник: ЕСJ LIMITED, США. Імп. н/сталь аналог вітчизняної 12Х18Н10Т |
| ГФ-75 | Стіл для упаковки готової продукції в коробочки та вкладання інструкції | 1 | Прямокутний, покритий пластиком. Виробник: Чехія  |
| ГФ-76 | Стіл для упаковки готової продукції в пачки                             | 1 | Прямокутний, покритий пластиком. Виробник: Чехія  |

**Примітка\*:** пошук і підбір обладнання здійснювали з використанням

наступних електронних джерел:

- 1 – <http://centros.ru/dozator-vody-promyshlennyy>
- 2 – <https://kreatorlab.ru>
- 3 – <https://unipro.com.ua/ua/ваги-технічні-електронні-axis-bd3000-0-1--нгз--3000-г--d-0-1-г->
- 4 – <https://prom.ua/p3866044-vozduhosborniki-gorizontalnye-vertikalnye.html?&primelead=MQ>
- 5 – <https://newfilter.com.ua/ua/stysnene-povitria/magistralni-filtri-stisnenogo-povitrya.html>
- 6 – <https://storgom.ua/product/kompressor-matari-m1100f75-3.html>
- 7 – [https://globalfrost.all.biz/kozhuhotrubbye-teploobmenniki-dlya-g15464591?gclid=Cj0KCQiAwMP9BRCzARIsAPWTJ\\_Hti3Puh3UVjuO7779nPu\\_jUmXWgRgWq11yJOdH0riZgUtlUv7RHkwaAvsrEALw\\_wcB](https://globalfrost.all.biz/kozhuhotrubbye-teploobmenniki-dlya-g15464591?gclid=Cj0KCQiAwMP9BRCzARIsAPWTJ_Hti3Puh3UVjuO7779nPu_jUmXWgRgWq11yJOdH0riZgUtlUv7RHkwaAvsrEALw_wcB)
- 8 – <https://ukr-gaz.com.ua/ru/catalog/rezervuary-emkosti-baki/ressiver>
- 9 – <https://prom.ua/p391467948-plastinchatyj-teploobmennik-swep.html>
- 10 – <http://folter.com.ua/catalog/fyask>
- 11 – <https://prom.ua/p465400624-dozator-vesovoj-dvsv.html>
- 12 – <https://perryvidex.eu/category/reactors/stainless-steel-reactor-europe-0-4-999-litres>
- 13 – <https://profimann.com.ua/nasosy-i-nasosnye-stancii/cirkulyacionnye-nasosy/nasos-cirkulyacionnyy-tipa-in-line-mas-daf-inm-40-125-0-37-suhoy-rotor>
- 14 – <https://perryvidex.eu/category/reactors/stainless-steel-reactor-europe-0-4-999-litres>

## РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми.

Технологічна схема виробництва L-аспарагінази включає допоміжні роботи (підготовка і стерилізація поживних середовищ, приготування розчинів титрувальних агентів, підготовка аераційного повітря, підготовка пакувальної тари), технологічний процес (підготовка посівного матеріалу, біосинтез L-аспарагінази *E.carotovora* МТСС 1428, відділення біомаси, гомогенізація, осадження ферменту, виділення аспарагінази, концентрування, сушіння та пакування) та знешкодження відходів .

Технологічну схему біосинтезу L-аспарагінази наведено у графічній частині проекту.

### *ДР 1. Підготовка аераційного повітря*

#### *ДР 1.1. Забір повітря*

Забір атмосферного повітря для забезпечення аераційних процесів виробництва здійснюють на висоті 8 м (ПЗ-5).

#### *ДР 1.2. Попереднє грубе очищення повітря*

Повітря пропускають через фільтр грубої очистки (Ф-6), де відбувається відділення крупних часток бруду та затримка пилу (розмір часток до 1 мкм) до ступеня очищення 75%.

#### *ДР 1.3. Подача повітря на компресор*

Стиснення повітря проводиться у компресорі (К-7) до тиску 0,4 МПа, температура повітря зростає від 120 до 250°C.

#### *ДР 1.4. Охолодження повітря і видалення вологи*

Після компресування вміст вологи у повітрі збільшується, з метою виведення вологи повітря охолоджують до 18-19°C у теплообміннику (Т-8). Далі повітря подають до ресивера (Р-9), де відбувається відділення зайвої вологи до вмісту  $W=60\%$ .

|                                    |      |              |        |      |                          |      |         |
|------------------------------------|------|--------------|--------|------|--------------------------|------|---------|
|                                    |      |              |        |      | НУХТ БТЕК 04.02.40 КР ПЗ |      |         |
| Змн.                               | Лист | № докум.     | Підпис | Дата |                          |      |         |
| Розроб.                            |      | Тихолоз Д.А. |        |      | Літ.                     | Арк. | Аркушів |
| Перевір.                           |      | Пенчук Ю.М.  |        |      |                          | 49   | 94      |
| Консультант                        |      |              |        |      | Кафедра БТМ              |      |         |
| Н. Контр.                          |      |              |        |      |                          |      |         |
| Затверд.                           |      | Пирог Т.П.   |        |      |                          |      |         |
| Розділ 6. Опис технологічної схеми |      |              |        |      |                          |      |         |
|                                    |      |              |        |      |                          |      |         |

### *ДР 1.5. Підігрів повітря*

З метою зниження ризику конденсації вологи на волокнах головного та індивідуальних фільтрів, повітря підігрівають у теплообміннику-нагрівачі (Т-10) до температури 30-35°C.

### *ДР 1.6. Тонке очищення повітря*

Нагріте повітря подають на головний фільтр очистки (Ф-11) з фільтруючим матеріалом у вигляді нержавіючої сітки. Ступінь очищення складає  $E=92\%$ .

### *ДР 1.7. Очищення повітря на індивідуальних фільтрах*

Перед кожним інокулятором та виробничим ферментером (ІН-17, ІН-20, ФР-23), установлюють індивідуальні фільтри (Ф-16, Ф-19, Ф-22). При використанні фільтрів такого типу ступінь очищення становить  $E=99,995\%$ .

## ***ДР 2. Приготування титрувальних агентів для титрування поживного середовища***

### *ДР 2.1. Приготування 6% розчину HCl*

Для інокуляторів об'ємами 10 і 100 л, а також для виробничого ферментера 1м<sup>3</sup> готують запасний розчин 6% хлоридної кислоти.

У збірник 3-2 об'ємом 2 л за допомогою дозатора Д-1 подають 0,84 л питної води і додають 0,28 л 37%-ї хлоридної кислоти. В сорочку подають холодну воду і вмикають перемішуючий пристрій (50 об/хв). Отриманий розчин стерилізації не потребує.

### *ДР 2.2. Приготування стерильного 6% розчину NaOH*

У збірник 3-4 об'ємом 2 л вносять 72 г кристалічного NaOH, зваженого на вагах Д-3, і за допомогою дозатора Д-1 додають 1,1 л питної води, вмикають перемішуючий пристрій (50 об/хв). Робочий розчин стерилізують протягом 40 хв при температурі 131°C та тиску 0,15 МПа.

## ***ДР 3. Водопідготовка***

### ***ДР 3.1 Підготовка води очищеної***

Воду очищену отримують за допомогою такої схеми : спочатку воду підігрівають, потім воду пропускають через грубу фільтрацію за допомогою

піщаних фільтрів, після чого відбувається процес пом'якшення, фільтрація через вугільний фільтр і зворотній осмос.

### ***ДР 3.2 Очищення на вугільному фільтрі***

Для збереження зворотньо-осмотичних мембран від деградації при наявності в воді активного хлору передбачено його видалення на фільтрі з активним вугіллям. Також знижується кольоровість води та зменшується вміст низькомолекулярних речовин.

### ***ДР 3.3. Очищення на піщаному фільтрі***

Відбувається відокремлення з води механічних частинок розміром 50-100 мкм, а також видалення з води заліза марганцю і сірководню. В якості фільтруючого матеріалу використовують марганцево-зелений пісок, який служить каталізатором окиснення розчинених у воді двовалентного заліза і марганцю розчиненим киснем, після чого вони переходять в нерозчинну форму і випадають в осад. Утворений осад видаляється після проведення періодичної промивки.

### ***ДР 3.4 Зворотній осмос***

Очищення води на установці зворотнього осмосу необхідна для забезпечення високої знесоленості води, наприклад можна використовувати двоступінчасту установку зворотного осмосу, яка призначена для повного видалення з води іонів розчинених солей, колоїдних домішок і механічних частинок. Видалення домішок відбувається за рахунок використання напівпроникної мембрани, воду подають під тиском, що перевищує осмотичний. Для покращення ефективності процесу використовують тангенціальну подачу до поверхні мембрани при рециркуляції.

### ***ДР 3.5. Очищення на піщаному фільтрі***

Відбувається відокремлення з води механічних частинок розміром 50-100 мкм, а також видалення з води заліза марганцю і сірководню. В якості фільтруючого матеріалу використовують марганцево-зелений пісок, який служить каталізатором окиснення розчинених у воді двовалентного заліза і марганцю розчиненим киснем, після чого вони переходять в нерозчинну

форму і випадають в осад. Утворений осад видаляється після проведення періодичної.

### ***ДР 3.6 Очищення на вугільному фільтрі***

Для збереження зворотньо-осмотичних мембран від деградації при наявності в воді активного хлору передбачено його видалення на фільтрі з активним вугіллям. Також знижується кольоровість води та зменшується вміст низькомолекулярних речовин.

### ***ДР 3.7 Зберігання води***

Автоматична система моніторингу стану води ін'єкційної в системі зберігання і розподілу води очищеної дозволяє в режимі реального часу контролювати поточні параметри води очищеної і керувати елементами системи водопідготовки (автоматичними вентилями, насосами циркуляції і т. п.).

### ***ДР 4. Підготовка пробок***

При надходженні на підприємство гумові пробки проходять вхідний контроль у ВКЯ і зберігаються на складі сировини та матеріалів в умовах, закладених у АНД.

Підготовку пробок проводять на установці для миття, силіконування, стерилізації і сушіння (ГФ-42).

Стиснуте повітря, що подається на установку, проходить очищення на фільтрі з номінальною тонкістю фільтрації 10,0 мкм.

Пара, що надходить у камеру стерилізації установки, проходить очищення на фільтрі з номінальною тонкістю фільтрації 10,0 мкм і на фільтрі з номінальною тонкістю фільтрації 0,2 мкм. Тиск пари на лінії від 0,15 до 0,20 МПа.

Очищена вода, яка подається в камеру миття, проходить очищення на фільтрі з номінальною тонкістю фільтрації 5,0 мкм. Тиск очищеної води на лінії від 0,20 до 0,25 МПа.

Процес підготовки пробок проходить у п'ять етапів:

I етап – миття I;

- II етап – ополіскування;
- III етап – силіконування;
- IV етап – стерилізація і сушіння.

#### ***ДР 4.1. Миття пробок***

У камеру миття вручну порціями завантажують гумові. Для миття використовують миючий засіб.

Процес I етапу миття ведеться при температурі очищеної води від 44 °С до 46 °С протягом 16 хв в автоматичному режимі. Контроль температури – за допомогою реєструючого приладку. Відцентровий насос перекачує пробки з водою з ємкості миття в ту ж ємкість (для видалення гумового пилу та інших механічних домішок). По закінченні цього етапу автоматично відкривається клапан зливу води (вентиль подачі перекривається), промивні води передають у збірник-нейтралізатор цеху ХО. При показнику рН у межах 6,5 – 9,0 і температурі не вище 40 °С промивні води направляють у каналізацію. Промивні води зливають протягом 10 хв.

#### ***ДР 4.2. Ополіскування пробок***

Ополіскування пробок очищеною водою ведуть протягом 32 хв з переливом через зливальний карман. Температура очищеної води від 44 °С до 46 °С, контроль температури – за допомогою приладу реєструючого. Доливання і переливання очищеної води не припиняється протягом всього етапу. Промивні води передають у збірник-нейтралізатор цеху ХО. Воду з рН 6,5-9,0 і температурою не вище 40 °С протягом 15 хв зливають в каналізацію.

#### ***ДР 4.3. Силіконування пробок***

Процес силіконування проводять у камері миття. Апарат наповнюють водою для ін'єкцій до верхнього рівня. Для приготування розчину силіконової емульсії використовують мірний посуд 2 класу. Беруть 60-90 мл силіконової емульсії КЭ-10-16 і розчиняють у 700 мл води для ін'єкцій. Температура процесу силіконування від 80 °С до 95 °С. Контроль температури – за допомогою приладу реєструючого.

Загальна тривалість процесу ополіскування, починаючи, з досягнення заданої температури – 24 хв.

По закінченню процесу ополіскування пробки разом з частиною розчину перекачують в апарат стерилізації. Розчин силіконової емульсії під тиском повітря 0,2 МПа зливають у збірник-нейтралізатор цеху ХО.

#### ***ДР 4.4. Стерилізація і сушіння пробок***

У посудину подають пару для нагрівання пробок до температури від 120 °С до 124 °С при тиску від 0,11 до 0,13 МПа. Контроль тиску – за допомогою мановакууметра. Тривалість процесу стерилізації складає 48 хв. Після стерилізації починається процес сушіння.

Сушіння здійснюється стерильним стиснутим повітрям і вакуумом. Стерильне стиснене повітря надходить в апарат стерилізації підігрітим за допомогою ТЕНів до 70 °С. Посудина періодично обертається на 180°, у результаті чого стікає вода, що утримується в порожнинах пробок. Здійснюється контроль температури процесу сушіння та контроль тиску – за допомогою мановакууметра. Тривалість процесу сушіння складає 80 хв.

По закінченні сушіння подача повітря в апарат припиняється. Упевнившись у відсутності залишкового тиску в апараті стерилізації, відкривають люк вивантаження і перевантажують пробки в рухомі ємкості для стерильних пробок, що входять у комплект установки (ГФ-45). Ємкості попередньо обробляють розчином перекису водню (3,0%) і розчином спирту етилового (76%).

Ємкості з партією стерильних пробок маркують етикетками встановленого зразка із значенням назви матеріалу, номеру партії, кількості, дати та часу стерилізації, прізвища і підпису відповідального.

#### ***ДР 5. Підготовка алюмінієвих ковпачків***

При надходженні на підприємство гумові пробки проходять вхідний контроль у ВКЯ і зберігаються на складі сировини та матеріалів в умовах, закладених у АНД.

Після розтарення проводять перегляд і сортування ковпачків, відбраковуючи ковпачки з порушеною формою, забруднені, темні чи в плямах, такі, що мають вм'ятини, зрізи та інші дефекти (ГФ-42). Брак збирають в контейнери, маркують етикетками і відправляють на утилізацію.

#### ***ДР 5.1. Миття і ополіскування ковпачків***

Здійснюють на установці для миття алюмінієвих ковпачків (ГФ-43).

Очищена вода для миття ковпачків, нагріта в теплообміннику до 60 °С. Далі очищена вода проходить крізь фільтр з номінальною тонкістю фільтрації 5,0 мкм. Тиск очищеної води на лінії від 0,20 до 0,25 МПа.

Використовують миючий розчин. Температура миття від 35 до 60 °С. Миття продовжується 22 хв і задається програмою. Через 22 хв включається клапан доливання очищеної води. Злив води відбувається через зливальну трубу до датчика нижнього рівня в збірник-нейтралізатор цеху ХО.

Ополіскування проводять водою очищеною з температурою від 35 до 60 °С протягом 45 хв.

При митті та ополіскуванні ковпачків барабан обертається з реверсуванням через 1(4) хв. Тривалість процесів миття та ополіскування задається програмою.

Ковпачки вивантажують у нержавсталеві деки шаром 30-40 мм, деки закривають кришками.

#### ***ДР 5.2. Стерилізація ковпачків***

Проводяться в апараті для повітряної термообробки (ГФ-44) при температурі від 178 до 182 °С протягом 60 хв. Здійснюється контроль температури – за допомогою приладу реєструючого. Після стерилізації деки з ковпачками вивантажують у приміщення для охолодження класу чистоти В. Термін зберігання стерильних алюмінієвих ковпачків – не більше 24 год.

Ємкості із стерильними алюмінієвими ковпачками маркують етикетками встановленого зразка із значенням назви матеріалу, номеру партії, кількості, дати та часу стерилізації, прізвища і підпису відповідального.

Тривалість операції підготовки алюмінієвих ковпачків – від 7,5 до 8,0 год.

### ***ДР 6. Підготовка флаконів***

Зі складу флакони у картонних ящиках передають на попередній перегляд і перекладання. Після розтарення флакони встановлюють у положення «горлом вгору» на пристрій для перекладання (ГФ-46) у нержавсталеву трибортову тару. Проводять візуальний перегляд і відбраковують флакони, що мають включення, відхилення від вимог НД за зовнішнім виглядом та геометричними параметрами. Брак збирають у контейнери, маркують етикетками і передають на утилізацію.

#### ***ДР 6.1. Миття флаконів***

Флакони в трибортовій тарі передають на миття, яке проводиться очищеною водою за допомогою ультразвуку на машині автоматичного миття флаконів типу АМФ-9-6 (ГФ-47).

Температура води очищеної від 40 до 50 °С. Контроль температури за допомогою приладів контуру розподілу води очищеної. Тиск очищеної води на лінії – від 0,20 до 0,24 МПа.

#### ***ДР 6.2. Ополіскування флаконів***

Флакони вручну подаються на накопичувальний стіл АМФ-9-6, потім за допомогою шнека ланцюгового транспортеру занурюються у ванну з водою. Ванна обладнана ультразвуковими магнітострикційними випромінювачами, що впливають на процес миття ультразвуком. Після чого флакони надходять до вузла ополіскування внутрішньої і зовнішньої поверхонь ін'єкційною водою (температурою від 80 до 95 °С), що надходить через форсунки.

#### ***ДР 6.3. Сушіння та стерилізація флаконів***

Після ополіскування у флакони подається стиснуте повітря, за допомогою якого з флаконів видаляється залишкова волога і флакони переорієнтовуються «горлом вгору». Чисте стиснуте повітря попередньо проходить через фільтр з номінальною тонкістю фільтрації 0,2 мкм.

Флакони, що надходять із мийної машини АМФ-9-6 подаються за допомогою шнека на конвеєрну стрічку тунельного стерилізатора «Pyroklenz-600» (СШ-48) спочатку в зону сушіння-стерилізації, потім у зону стабілізації-охолодження.

Зони тунельного стерилізатора знаходяться в зоні ламінарного потоку стерильного повітря. Повітря за допомогою вентилятора через попередній фільтр подається на фільтр стерилізації «HEPA» при температурі 330-350 °С, що підтримується за допомогою регулюючого приладу пульта управління. Час перебування флаконів у зоні сушіння-стерилізації – 9 хв, у зоні охолодження-стабілізації – 5-7 хв. У зоні охолодження-стабілізації флакони охолоджуються стерильним повітрям до температури 50-60 °С. Флакони, що виходять з тунельного стерилізатора (СШ-48), подаються на накопичувальний стіл фасувального автомата у стерильну зону. Накопичувальний стіл знаходиться у зоні ламінарного потоку технологічного повітря.

Контроль температури здійснюється по реєструючому приладу, розташованому на пульті управління.

У разі потреби стерильні флакони можуть зберігатися в закритих кришками деках не більше 24 год в умовах, що виключають можливість порушення стерильності флаконів. Деки з флаконами маркують етикетками встановленого зразка із значенням назви матеріалу, номеру партії, кількості, дати та часу стерилізації, прізвища і підпису відповідального.

Тривалість операції підготовки флаконів – від 8,0 до 10,0 год.

### ***ДР 7. Приготування та стерилізація поживних середовищ***

*ДР 7.1. Приготування та стерилізація компонентів композиції А для забезпечення інокуляторів та ферментера*

Дозатором Д-12 відміряють 16,9 кг глюкози, 16,9 кг L-аспарагіну, 0,56 кг дріжджового екстракту, 0,56 кг пептону, вносять у збірник З-13. Подають 282 л води за допомогою дозатора Д-1, вмикають перемішуючий пристрій (50 об/хв). Отриманий розчин стерилізують протягом 20 хв при температурі 121 °С та тиску 0,1 МПа.

*ДР 7.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту об'ємом 670 мл в колбах на качалках*

На даному етапі необхідно приготувати 640 мл поживного середовища. Вміст компонентів для приготування поживного середовища (ПС) у колбах на качалках об'ємом 640 мл наведено у таблиці 6.1.

*Таблиця 6.1.*

**Склад композицій для стерилізації поживного середовища для одержання посівного матеріалу в колбах на качалках**

| <b>Компонент поживного середовища</b>                | <b>Вміст, г/л</b> | <b>Кількість для приготування 640 мл середовища, г</b> | <b>Композиція</b> | <b>Об'єм композиції, V, мл</b> |
|--|-------------------|--|-------------------|--------------------------------|
| Глюкоза  | 30                | 19,2   | А                 | 561,8                          |
| L-аспарагін  | 30                | 19,2   |                   |                                |
| Дріжджовий екстракт                                  | 1                 | 0,6  |                   |                                |
| Пептон   | 1                 | 0,6  |                   |                                |
| Вода   |                   | 522,2  |                   |                                |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O | 6                 | 3,8  | Б                 | 69,6                           |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                      | 1,7               | 1  |                   |                                |
| Вода   |                   | 64,8   |                   |                                |
| NaCl   | 0,5               | 0,3  | В                 | 7,93                           |
| MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O                | 0,37              | 0,2  |                   |                                |
| CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O                | 0,015             | 0,01   |                   |                                |
| Вода   |                   | 7,42   |                   |                                |
| <b>Разом:</b>  |                   | <b>640</b>   |                   | <b>640</b>                     |

*ДР 7.2.1. Приготування та стерилізація композиції А*

На технічних вагах зважують 19,2 г глюкози, 19,2 г L-аспарагіну, 0,6 г дріжджового екстракту, 0,6 г пептону, переносять у колбу на 1 л, додають 522,2 мл питної води, перемішують. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві протягом 20 хв при температурі 121°C та тиску 0,1 МПа

*ДР 7.2.2. Приготування та стерилізація композиції Б*

На технічних вагах зважують 3,8 г Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O та 1 г KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, переносять у колбу на 100 мл, додають 64,8 мл питної води, перемішують.

Колбу закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

*ДР 7.2.3. Приготування та стерилізація композиції В*

На технічних вагах зважують 0,3 г NaCl, 0,2 г MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O і 0,01 г CaCl<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O, переносять у колбу на 50 мл, додають 7,5 мл питної води, перемішують. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

*ДР 7.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 10 л*

Для одержання інокуляту на даному етапі потрібно приготувати 6,2 л поживного середовища. Необхідна кількість посівного матеріалу складе 0,6 л. Композиція А у кількості 4,8 л надходить (від ДР7.1). Вміст компонентів для приготування поживного середовища для інокулятора 10 л наведено у таблиці 6.2.

Таблиця 6.2.

**Склад композицій для стерилізації поживного середовища в інокуляторі 10 л**

| Компонент поживного середовища                       | Вміст, г/л | Кількість для приготування 6,2 л середовища, г | Композиція | Об'єм композиції, V, л |
|--|------------|--|------------|------------------------|
| Глюкоза  | 30         | 186  | А          | 4,8                    |
| L-аспарагін  | 30         | 186  |            |                        |
| Дріжджовий екстракт                                  | 1          | 6,2  |            |                        |
| Пептон   | 1          | 6,2  |            |                        |
| Вода   |            | 4,5  |            |                        |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O | 6          | 37,2   | Б          | 0,6                    |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                      | 1,7        | 10,5   |            |                        |
| NaCl   | 0,5        | 3  |            |                        |
| MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O                | 0,37       | 2,3  |            |                        |
| CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O                | 0,015      | 0,1  |            |                        |
| Вода   |            | 0,56   |            |                        |
| Конденсат  |            | 0,62   |            | 0,62                   |
| <b>Разом:</b>  |            | <b>6,2</b>                                     |            | <b>6,2</b>             |

*ДР 7.3.1. Приготування та стерилізація композиції Б*

На технічних вагах Д-15 зважують 37,2 г  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , 10,5 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 3 г  $\text{NaCl}$ , 2,3 г  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  та 0,1 г  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , вносять в інокулятор ІН-17, через дозатор Д-1 додають 0,56 л питної води, вмикають перемішувачий пристрій та подають пару в сорочку для досягнення температури  $40^\circ\text{C}$  до повного розчинення солей. Приготований розчин підкислюють розчином  $\text{HCl}$  (від ДР 2.1.) до рН 4-4,5, після чого проводять стерилізацію протягом 1 год за температури  $131^\circ\text{C}$ .

*ДР 7.4. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 100 л*

Для одержання інокуляту на даному етапі потрібно приготувати 60 л поживного середовища. Необхідна кількість посівного матеріалу складе 6,2 л. Композиція А у кількості 47,7 л надходить (від ДР 7.1). Вміст компонентів для приготування поживного середовища для інокулятора 100 л наведено у таблиці 6.3.

*Таблиця 6.3.*

**Склад композицій для стерилізації поживного середовища в інокуляторі 100 л**

| <b>Компонент поживного середовища</b>                | <b>Вміст, г/л</b> | <b>Кількість для приготування 60 л середовища, г</b> | <b>Композиція</b> | <b>Об'єм композиції, V, л</b> |
|--|-------------------|--|-------------------|-------------------------------|
| Глюкоза  | 30                | 1814   | А                 | 47,7                          |
| L-аспарагін  | 30                | 1814   |                   |                               |
| Дріжджовий екстракт                                  | 1                 | 60,5   |                   |                               |
| Пептон   | 1                 | 60,5   |                   |                               |
| Вода   |                   | 44   |                   |                               |
| $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ | 6                 | 363  | Б                 | 7                             |
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$                             | 1,7               | 103  |                   |                               |
| $\text{NaCl}$  | 0,5               | 30   |                   |                               |
| $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$           | 0,37              | 22   |                   |                               |
| $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$           | 0,015             | 1  |                   |                               |
| Вода   |                   | 6,5  |                   |                               |
| Конденсат  |                   | 6  |                   | 6                             |
| <b>Разом:</b>  |                   | <b>60</b>  |                   | <b>60</b>                     |

*ДР 7.4.1. Приготування та стерилізація композиції Б*

На технічних вагах (Д-18) зважують 363 г  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , 103 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 30 г  $\text{NaCl}$ , 22 г  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  та 1 г  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , вносять в інокулятор (ІН-20), через дозатор (Д-1) додають 6,5 л питної води, вмикають перемішувачий пристрій та подають пару в сорочку для досягнення температури  $40^\circ\text{C}$  до повного розчинення солей. Приготований розчин підкислюють розчином  $\text{HCl}$  (від ДР 2.1.) до рН 4-4,5, після чого проводять стерилізацію протягом 1 год за температури  $131^\circ\text{C}$ .

*ДР 7.5. Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом  $1 \text{ м}^3$*

На даному етапі потрібно приготувати 500 л поживного середовища. Необхідна кількість посівного матеріалу складе 60 л. Композиція А у кількості 426,2 л надходить (від ДР7.1). Вміст компонентів для приготування поживного середовища для ферментера  $1 \text{ м}^3$  наведено у таблиці 6.4.

*Таблиця 6.4*

**Склад композицій для стерилізації поживного середовища у ферментері  $1 \text{ м}^3$**

| Компонент поживного середовища                       | Вміст, г/л | Кількість для приготування 500 л середовища, кг | Композиція | Об'єм композиції, V, л |
|--|------------|---|------------|------------------------|
| Глюкоза  | 30         | 15  | А          | 426,2                  |
| L-аспарагін  | 30         | 15  |            |                        |
| Дріжджовий екстракт                                  | 1          | 0,5   |            |                        |
| Пептон   | 1          | 0,5   |            |                        |
| Вода   |            | 395,2   |            |                        |
| $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ | 6          | 3   | Б          | 58,8                   |
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$                             | 1,7        | 0,85  |            |                        |
| $\text{NaCl}$  | 0,5        | 0,25  |            |                        |
| $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$           | 0,37       | 0,18  |            |                        |
| $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$           | 0,015      | 0,007   |            |                        |
| Вода   |            | 54,6  |            |                        |
| Конденсат  |            | 50  |            | 50                     |
| <b>Разом:</b>  |            | <b>535</b>                                      |            | <b>535</b>             |

*ДР 7.5.1. Приготування та стерилізація композиції Б*

За допомогою дозатора (Д-21) відміряють 3 кг  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,85 кг  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,25 кг  $\text{NaCl}$ , 0,18 кг  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  та 0,007 кг  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , вносять у ферментер ФР-24, через дозатор Д-1 додають 54,6 л питної води, вмикають перемішуючий пристрій та подають пару в сорочку для досягнення температури  $40^\circ\text{C}$  до повного розчинення солей. Приготований розчин підкислюють розчином  $\text{HCl}$  (від ДР 2.1.) до рН 4-4,5, після чого проводять стерилізацію протягом 1 год за температури  $131^\circ\text{C}$ .

### ***ДР 8. Приготування розчинів для стадії виділення та очищення L-аспарагінази***

#### ***ДР 8.1. Приготування буферу А***

На технічних вагах (Д-18) зважують 669 г  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 520 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 129 г  $\text{Na}_2\text{едта}$ , 29 г гліцину, вносять в реактор-змішувач (Р-20), та додають 38,5 л питної води, вмикають перемішуючий пристрій та подають пару в сорочку для досягнення температури  $40^\circ\text{C}$  до повного розчинення солей.

#### ***ДР 8.2. Приготування елюенту***

На технічних вагах (Д-18) зважують 2,6 кг  $\text{KCl}$  вносять в реактор-змішувач (Р-21), та додають 10 л питної води, вмикають перемішуючий пристрій та подають пару в сорочку для досягнення температури  $40^\circ\text{C}$  до повного розчинення солей. Готовий розчин зберігають в реакторі до використання на стадії гель-хроматографічного очищення.

#### ***ДР 8.3. Приготування розчину глюкози для стабілізації ферменту***

На технічних вагах зважують 80 г глюкози, переносять у колбу на 500 мл, додають 200 мл питної води, перемішують. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві протягом 20 хв при температурі  $121^\circ\text{C}$  та тиску 0,1 МПа

### ***ТП 9. Підготовка посівного матеріалу***

#### ***ТП 9.1. Підтримання колекційної культури***

Колекційну культуру *Erwinia carotovora* МТСС 1428 зберігають у пробірках на скошеному м'ясо-пептонному агарі (МПА) за температури  $4^\circ\text{C}$ .

Пересіви здійснюють кожні 3 місяці. Всі роботи з колекційною культурою проводять в строго асептичних умовах.

*ТП 9.2. Одержання Erwinia carotovora MTCC 1428 на агаризованому середовищі*

Колекційну культуру, що зберігається в пробірках з МПА, розсівають петлею до ізолюваних колоній на чашках Петрі з агаризованим м'ясо-пептонним середовищем в асептичних умовах. Вирощують при температурі 30°C упродовж 12 год.

*ТП 9.3. Вирощування робочої культури Erwinia carotovora MTCC 1428 на агаризованому середовищі*

Ізолювані колонії (від ТП4.2) в асептичних умовах пересівають петлею у пробірки з агаризованим м'ясо-пептонним середовищем до ізолюваних колоній, що знаходяться на відстані не менше 1 см одна від одної. Пробірки інкубують 24 год при температурі 30°C.

*ТП 9.4. Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках*

У колбу об'ємом 1 л із 562 мл розчину композиції А (від ДР7.2.1) в асептичних умовах вносять 70 мл розчину композиції Б (від ДР7.2.2) і 7,9 мл розчину композиції В (від ДР7.2.3). Розчин перемішують і розливають по 125 мл у стерильні 4 качалочні колби об'ємом 750 мл. У пробірки з *E. carotovora* MTCC 1428 (від ТП9.3) вносять по 7,5 мл фізіологічного розчину, суспендують та вносять у колби з поживним середовищем. Штам вирощують у колбі на качалці (180 об/хв) при 30°C упродовж 12 год.

Після завершення культивування здійснюють відбір проб для проведення мікробіологічного контролю.

*ТП 9.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 10 л*

В інокулятор ІН-17 зі стерильною композицією Б (від ДР7.3.1) вносять 6% розчин NaOH (від ДР2.2) для нейтралізації середовища та подають стерильну композицію А (від ДР7.1). Потім через засівну колбу подають посівний матеріал (від ТП4.4.) включають перемішуючий пристрій, аерацію, в сорочку інокулятора подають пару. Культивування здійснюють при рН 8,5,

температурі 30°C упродовж 12 год, витрати повітря 1,5 л/(л·хв). Кожні 3-4 год відбирають пробу і здійснюють мікробіологічний контроль та визначають концентрацію біомаси ( $C_6=2,8$  г/л).

#### *ТП 9.6. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 100 л*

В інокулятор ІН-20 зі стерильною композицією Б (від ДР7.4.1) вносять 6% розчин NaOH (від ДР2.2) для нейтралізації середовища та подають стерильну композицію А (від ДР7.1). Потім самопливом подають посівний матеріал (від ТП9.5.) включають перемішуючий пристрій, аерацію, в сорочку інокулятора подають пару. Культивування здійснюють при рН 8,5, температурі 30°C упродовж 12 год, витрати повітря 1,5 л/(л·хв). Кожні 3-4 год відбирають пробу і здійснюють мікробіологічний контроль та визначають концентрацію біомаси ( $C_6=2,8$  г/л).

#### **ТП 10. Виробниче культивування**

##### *ТП 10.1. Виробниче культивування у ферментері об'ємом 1м<sup>3</sup>*

У ферментер ФР-23 зі стерильною композицією Б (від ДР7.5.1) вносять 6% розчин NaOH (від ДР2.2) для нейтралізації середовища та подають стерильну композицію А (від ДР7.1). Потім через трубу перетискування подають посівний матеріал (від ТП9.6.) включають перемішуючий пристрій, аерацію, в сорочку інокулятора подають пару. Культивування здійснюють при рН 8,5, температурі 30°C упродовж 12 год, витрати повітря 1,5 л/(л·хв). Кожні 3-4 год відбирають пробу і здійснюють мікробіологічний контроль, визначають концентрацію біомаси ( $C_6=2,8$  г/л) та L-аспарагінази ( $C_a=7,52$  г/л).

##### **ТП 11. Зберігання культуральної рідини.**

Після закінчення процесів біосинтезу аспарокінази культуральна рідина перекачується на стадію зберігання в реактор змішувач (Р-1). Для запобігання інактивації ферментативної активності необхідним є підтримання температури зберігання культуральної рідини на рівні 10-15 °С, тому для цього в сорочку реактору подається холодна вода та контролюється за допомогою датчика температури. Далі вмикають перемішуючий пристрій на режимі 150

об/хв для рівномірного розподілу температури у товщі рідини. Та подають культуральну рідину подається на стадію центрифугування.

### ***ТП 12. Відділення біомаси***

#### ***ТП 12.1 Центрифугування культуральної рідини***

Процес центрифугування (Ц-3) відбувається зі швидкістю 6000 об/хв. упродовж 30 хв. Отриманий фугат за допомогою відцентрового насоса (Н-4) передається на гомогенізатор (Г-5).

### ***ТП 13. Гомогенізація***

#### ***ТП 13.1. Дезінтеграція клітин***

Біомасу подають через системи трубопроводів в наногомогенізатор «Microfluidizer» (Г-5), де відбувається руйнування клітин. Тиск, що діє на клітинну стінку становить 207 МПа, швидкість потоку культуральної рідини 330-450 мл/хв. Вихід на цій стадії становить 98% - клітини руйнуються за один прохід. Отриманий гомогенізатор збирають в стерильну ємкість та подають на стадію видалення уламків.

#### ***ТП 13.2. Видалення уламків клітин***

Розчин (від ТП13.1) подають на центрифугу для видалення уламків, процес відбувається зі швидкістю 6000 об/хв. упродовж 30 хв. Отриманий фугат за допомогою відцентрового насоса (Н-4) передається на стадію осадження фермента.

### ***ТП 14. Осадження ферменту***

#### ***ТП 14.1. Фракціонування 20% сульфатом амонію***

Для висолювання ферментного препарату необхідно приготувати сульфат амонію для насичення ним розчину у концентрації 20 та 60%. Додавання сульфату амонію до безклітинного екстракту призводить до утворення ферментного осаду. Ступінь осадження білка залежить від його початкової концентрації в розчині, концентрації солі і властивостей системи.

Для того, щоб у безклітинному екстракті осадити фермент необхідно у збірник, з нижнім спуском, (Р-7) об'ємом 10 л з гомогенізатором через об'ємно-ваговий дозатор подати сульфат амонію. Концентрація солі, що додається,

зазвичай близька до концентрації насичення і для сульфату амонію складає 20 г на 100 мл розчину, що висолюється. Сіль додають невеликими порціями, при постійному перемішуванні – 60 обертів за хвилину, щоб уникнути утворення локальних зон з підвищеною концентрацією солі. Після додавання розрахункової кількості солі осад утворюється не відразу, а протягом деякого часу - від 30 хв до декількох годин.

Процес сольового фракціонування ферментів відбувається при температурі +4°C. Охолодження відбувається подачею охолодної води в сорочку збірника (Р-7).

Після цього, перш ніж розчин, який містить фермент надходить на стадію центрифугування, необхідно відділити утворений осад від отриманої суспензії для того, щоб процес центрифугування пройшов ефективніше. Утворений осад відділяють за допомогою нижнього спуску в ємкість та подають на наступну стадію.

#### ***ТП 14.2. Центрифугування***

Утворений ферментний розчин вручну з ємкості подають на центрифугування (Ц – 8) необхідне для того, щоб відділити отриманий осад баластних білків та домішок від розчину з аспарагіназою.

Центрифугування проходить при таких параметрах: 5 000 об/хв, протягом 30 хвилин. Осад направляють на утилізацію, а супернатант відправляють на наступну стадію виділення.

#### ***ТП 14.3. Фракціонування 60% сульфатом амонію***

Супернатант з попередньої стадії (від ТП14.2) поступає на повторне осадження. У збірник (Р-12), з «ферментним розчином» дробно, за допомогою дозатора подають кристалічний сульфат амонію. Насичення відбувається до вмісту сульфату амонію 60%, дана концентрація дасть можливість отримати осад, що містить майже всю аспарагіназну активність. Концентрація солі, що додається у ферментний розчин, зазвичай близька до концентрації насичення і для сульфату амонію складає 60 г на 100 мл розчину, що висолюється. Сіль завантажують у збірник через дозатор. Вихід на цій стадії становить 78%.

Розчин з ферментним осадом подають на наступну стадію для видалення і подальшого очищення.

#### ***ТП 14.4. Центрифугування***

Розчин з ферментним осадом (від ТП14.3) направляють на центрифугу, процес відбувається за таких же умов як і раніше, отриманий осад зберігають до наступної стадії при температурі 4 °С у холодильній камері

#### ***ТП 15. Виділення L-аспарагінази***

##### ***ТП 15.1. Знесолення***

Ферментний осад вручну подається у збірник (З-14), де відбувається його розбавлення невеликою кількістю буферного розчину (від ДР8.1), який містить 10 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 10 мМ  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1 мМ гліцину і 1 мМ ЕДТА. Розчинений осад подається для знесолення на колонку з Sephadex G-50 (coarse) (ГХ-16) об'ємом 5,5 л (14,0×35,5 см) в 20 мМ калій-фосфатному буфері, вмістимим 1 мМ гліцину і 1 мМ ЕДТА, рН 5,6. Знесолення проводять при швидкості потоку біля 30 мл/хв.

##### ***ТП 15.2. Гель-хроматографія***

Знесолену фракцію отриману на стадії розчиняють тим ж самим буфером вдвічі і наносять на колонку з CM-Sepharose FF (ГХ-17) (10×3,2 см), урівноваженою 20 мМ калій-фосфатним буфером (від ДР8.1), вмістимим 1 мМ гліцину і 1 мМ ЕДТА, рН 5,6 з швидкістю біля 400 мл/год. Після нанесення проби, колонку промивають 20 мМ калій-фосфатним буфером, рН 6,3 з ціллю видалення баластних білків. Елюацію цільового продукту проводять 20 мМ калій-фосфатним буфером, рН 7,0 и 7,6.

Кінцеву фракцію, отриману з 250-мілілітрової колонки з CM-Sepharose FF, розчиняють рівним об'ємом 20 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , при цьому рН фракції знижується від 7,0 до 6,3-6,4. Нанесення зразка здійснюють через передколонку з швидкістю потоку 8 мл/хв. Після нанесення зразка колонку ретельно миють 20 мМ калій-фосфатним буфером, рН 6,3 до базової лінії, а потім вимивають білок 20 мМ калій-фосфатним буфером, рН 7,6.

#### ***ТП 16. Концентрування***

### ***ТП 16.1. Ультрафільтрація***

Концентрування проводять на ультрафільтраційні установці з діаметром ультрафільтраційної мембрани 63,5 мм. Елюат (від ТП15.2) направляють на ультрафільтраційну установку після процесу ультраконцентрат збирають і направляють на наступну стадію.

### ***ТП 17. Сушіння продукту ліофільним методом***

#### ***ТП 17.1. Сушіння***

Очищений фермент аспарагінази (від ТП16.1) подаємо у збірник (З-20), куди через об'ємно-ваговий дозатор завантажуюємо 0,5 % глюкозу для стабілізації зразка. Стабілізований розчин у наповнених флаконах вручну подається на стадію ліофільного висушування, (ЛФ-50). Камеру зі встановленими напівзакупореними флаконами герметизують, вмикають холодильну машину, яка прокачує холодоносій крізь плити. Розчин перетворюється на льодяний шар. Розсіл від холодильної машини спрямовують у зміювик, занурений в рідину в ємності. Сублімаційну камеру з'єднують з конденсатором, в якому розташований зміювик або інший теплообмінний пристрій з розвиненою поверхнею. Від холодильної машини ХМ-2 у зміювик починають подавати розсіл з температурою нижче, ніж температура замороженого матеріалу (температури сублімації). Вмикають вакуум-насос і створюють глибокий вакуум у конденсаторі і в сублімаційній камері (15... 150 Па).

### ***ПМВ 18. Фасування та закупорка аспарагінази***

#### ***ПМВ 18.1. Фасування, пакування та маркування аспарагінази***

Процес фасування розчину паклітаксел проводять у приміщенні класу чистоти В у зоні класу А з ламінарним потоком повітря. Фасування порошку проводять на фасувальному автоматі у відповідності з інструкцією зі стерильного фасування препаратів.

Заповнені флакони надходять на закупорювальний і закатувальний вузли фасувального автомата, де закупорюються стерильними гумовими пробками і обтискуються стерильними алюмінієвими ковпачками. Закатані флакони

подаються на стіл-накопичувач маркувальної машини або знімаються вручну. Контроль дози порошку у флаконі проводять шляхом зважування на електронних терезах.

Етикетки-самоклейки проходять вхідний контроль якості виготовлення на відповідність параметрам якості специфікації у ВКЯ та у супроводженні аналітичного листа результатів вхідного контролю друкованої продукції, надходять в цех. Маркування флаконів проводять на етикувальній машині (ГФ-51), на якій проводиться нанесення етикетки-самоклейки на флакони. На шрифтодержачі набирають номер серії і термін придатності, встановлюють на принтер, на який подають осушене стиснуте повітря під тиском від 0,4 до 0,6 МПа.

### ***ЗВ 19. Знешкодження відходів***

#### ***ЗВ 19.1. Знешкодження газоподібних відходів***

Відпрацьовані гази подають на знешкодження методом каталітичного спалювання.

#### ***ЗВ 19.2. Знешкодження рідких відходів***

Знешкодження рідких відходів відбувається шляхом пропускання останніх через фільтри комплексної очистки на локальних очисних спорудах. Відфільтрована вода спускатися в каналізацію.

#### ***ЗВ 19.3. Знешкодження твердих відходів***

Тверді відходи, що можуть містити біологічно небезпечні залишки збирають в окремий резервуар та піддається термічній обробці. Після цього відходи відправляються на локальні очисні споруди.

## РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва

### 7.1. Карта постадійного контролю доферментаційних процесів

Постадійний контроль виробництва L-аспарагінази *E. carotovora* MTCC 1428 наведено в табл. 7.1.

Таблиця 7.1

#### Карта постадійного контролю біосинтезу L-аспарагінази *Erwinia carotovora* MTCC 1428

| Номер контрольної точки та назва стадії          | Об'єкт контролю і показник, що визначається                                   | Засоби та методи контролю                                    | Періодичність перевірки та порядок відбору проб | Нормативна характеристика показника, що визначається |
|--|---|--|---|--|
| Кт 1.1<br>Забір повітря                          | Висота забору повітря   | Висота труби забору  | Протягом всього циклу виробництва               | H=8 м  |
| Кт 1.2<br>Попереднє грубе очищення               | Очищене повітря, ступінь очищення повітря на виході з фільтра, перепад тисків | Манометр, перевірка ступеню очищення згідно паспорту фільтра | Після очистки у фільтрі грубого очищення        | E=75%, тиск згідно паспорту                          |
| Кт 1.3<br>Стиснення повітря                      | Стиснене повітря, температура, тиск   | Манометр технічний, термометр                                | Повітря після компресування                     | P=0,4 МПа, t=250°C                                   |
| Кт 1.4<br>Охолодження повітря і видалення вологи | Охолоджене повітря, температура   | Термометр технічний, психрометричний метод                   | Після охолодження повітря і видалення вологи    | t=18-19°C, W=60%                                     |
| Кт 1.5<br>Підігрів повітря                       | Підігріте повітря, температура  | Термометр технічний  | Після нагріву повітря                           | t=30-35°C  |

|                                |      |              |             |      |         |
|--------------------------------|------|--------------|-------------|------|---------|
| НУХТ БТЕК 04.02.40 КР ПЗ       |      |              |             |      |         |
| Змн.                           | Лист | № докум.     | Підпис      | Дата |         |
| Розроб.                        |      | Тихолоз Д.А. |             |      |         |
| Перевір.                       |      | Пенчук Ю.М.  |             |      |         |
| Консультант                    |      |              |             |      |         |
| Н. Контр.                      |      |              |             |      |         |
| Затверд.                       |      | Пирог Т.П.   |             |      |         |
| Розділ 7. Контроль виробництва |      |              | Літ.        | Арк. | Аркушів |
|                                |      |              |             | 70   | 94      |
|                                |      |              | Кафедра БТМ |      |         |

|  |  |  |   |  |
|--|--|--|---|--|
| Кт 1.6<br>Очищення повітря на головному фільтрі  | Очищене повітря, перепади тисків, ступінь очищення повітря на виході з фільтра | Манометр, перевірка ступеню очищення згідно паспорту фільтра   | Після очистки у фільтрі головного очищення  | E=92-95%, тиск згідно паспорту   |
| Кт 1.7<br>Очищення повітря на індивідуальних фільтрах  | Очищене повітря, ступінь очищення повітря                                      | Перевірка ступеню очищення повітря згідно паспорту фільтра     | Під час очищення повітря на індивідуальних фільтрах   | E=99,99%   |
| Кх 2.1<br>Приготування запасного 6% розчину НСІ  | Концентрація НСІ   | Хімічний метод   | Після приготування розчину  | C=6%   |
| Кх, Кт, Км 2.2<br>Приготування стерильного 6% розчину NaOH   | Концентрація NaOH, температура, час, стерильність                              | Хімічний метод, термометр, годинник                            | Після приготування розчину, тиск і температуру перевіряють безперервно під час стерилізації, мікробіологічний метод | C=6%,<br>t=131°C,<br>P=0,15 МПа,<br>τ=40 хв,<br>відсутність мікробіоти |
| Кх, Кт, Км 3.1.<br>Приготування та стерилізація компонентів композиції А для забезпечення інокуляторів та ферментера | Концентрація компонентів композиції А, температура, час, стерильність          | Хімічний метод, термометр, годинник, мікробіологічний контроль | Тиск і температуру перевіряють безперервно протягом стерилізації, мікробіологічний метод                            | t =121°C,<br>P=0,1 МПа,<br>τ=20 хв,<br>відсутність мікробіоти          |
| Кт, Км 3.2.1<br>Приготування і стерилізація композиції А для вирощування інокуляту в колбах на качалках              | Композиція А, температура, час, стерильність                                   | Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль        | Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний метод контролю                                 | P=0,1 МПа, t =121°C,<br>τ=20 хв,<br>відсутність мікробіоти             |
| Кт, Км 3.2.2<br>Приготування і стерилізація  | Композиція Б, температура, час, стерильність                                   | Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль        | Тиск визначається безперервно під час стерилізації,   | P=0,15 МПа,<br>t=131°C,<br>τ=40 хв,                                    |

|   |   |  |  |   |
|---|---|--|--|---|
| композиції Б для вирощування інокуляту в колбах на качалках   |   |  | метод мікробіологічного контролю   | відсутність мікробіот                                       |
| Кт, Км 3.2.3 Приготування і стерилізація композиції В для вирощування інокуляту в колбах на качалках            | Композиція В, температура, час, стерильність      | Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль          | Тиск визначається безперервно під час стерилізації, метод мікробіологічного контролю             | P=0,15 МПа, t=131°C, τ=40 хв, відсутність мікробіот         |
| Кт, Км, Кх 3.3.1 Приготування і стерилізація композиції Б для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 10 л  | Композиція Б, температура, час, рН, стерильність  | Манометр технічний, годинник, рН-метр, мікробіологічний контроль | Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації | P=0,15 МПа, t=131°C, τ=1 год, рН 4,5, відсутність мікробіот |
| Кт, Км, Кх 3.4.1 Приготування і стерилізація композиції Б для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 100 л | Композиція Б, температура, час, рН, стерильність  | Манометр технічний, годинник, рН-метр, мікробіологічний контроль | Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації | P=0,15 МПа, t=131°C, τ=1 год, рН 4,5, відсутність мікробіот |
| Кт, Км, Кх 3.5.1 Приготування і стерилізація композиції Б для ферментера об'ємом 1 м <sup>3</sup>               | Композиція Б, температура, час, рН, стерильність  | Манометр технічний, годинник, рН-метр, мікробіологічний контроль | Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації | P=0,15 МПа, t=131°C, τ=1 год, рН 4,5, відсутність мікробіот |
| Кт, Км 4.1 Підтримання колекційної культури   | Колекційна культура, температура, мікробіологічна | Холодильник  | Мікробіологічний контроль  | t=4°C, відсутність сторонньої                               |

|  | чистота культури   |  |   | мікробіоти   |
|--|--|--|---|--|
| Кт, Км 4.2<br>Одержання<br><i>Erwinia carotovora</i><br>MTCC 1428<br>на<br>агаризованом<br>у середовищі                    | Пересіяна культура, чашки Петрі з МПА, температура, тривалість вирощування, мікробіологічна чистота культури         | Термостат, мікроскоп, мікробіологічний контроль  | Мікробіологічний контроль після вирощування культури  | t=30°C,<br>τ=12 год,<br>відсутність сторонньої мікробіоти  |
| Кт, Км 4.3<br>Вирощування робочої культури<br><i>Erwinia carotovora</i><br>MTCC 1428<br>на<br>агаризованом<br>у середовищі | Пересіяна культура, пробірки з МПА, температура, тривалість вирощування, мікробіологічна чистота культури            | Термостат, мікроскоп, мікробіологічний контроль  | Мікробіологічний контроль після вирощування культури  | t=30°C,<br>τ=24 год,<br>відсутність сторонньої мікробіоти  |
| Кт, Км 4.4<br>Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках   | Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури    | Термометр технічний, годинник, тахометр, мікробіологічний контроль                         | Після вирощування інокуляту в колбах на качалках      | t=30°C,<br>τ=12 год,<br>ω=180 об/хв,<br>відсутність сторонньої мікробіоти                        |
| Кт, Кх, Км 4.5<br>Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 10 л   | Посівний матеріал, тривалість культивування, температура, рН, концентрація біомаси, мікробіологічна чистота культури | Термометр технічний, годинник, рН-датчик, фотоелектроколориметр, мікробіологічний контроль | Під час вирощування інокуляту і в кінці культивування | t=30°C,<br>τ=12 год,<br>рН 8,5,<br>C <sub>6</sub> =2,8 г/л,<br>відсутність сторонньої мікробіоти |
| Кт, Кх, Км 4.6<br>Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 100 л  | Посівний матеріал, тривалість культивування, температура, рН, концентрація біомаси, мікробіологічна чистота культури | Термометр технічний, годинник, рН-датчик, фотоелектроколориметр, мікробіологічний контроль | Під час вирощування інокуляту і в кінці культивування | t=30°C,<br>τ=12 год,<br>рН 8,5,<br>C <sub>6</sub> =2,8 г/л,<br>відсутність сторонньої мікробіоти |

|   |   |  |  | мікробіоти  |
|---|---|--|--|---|
| Кт, Кх, Км<br>5.1<br>Виробниче<br>культивування у<br>ферментері<br>об'ємом 1 м <sup>3</sup> | Культуральна<br>рідина,<br>температура, рН,<br>тривалість<br>культивування,<br>концентрація L-<br>аспарагінази,<br>мікробіологічна<br>чистота<br>культури | Термометр технічний,<br>годинник, рН-датчик,<br>фотоелектроколориметр,<br>мікробіологічний<br>контроль | Мікробіологічний контроль та визначення рівня біомаси проводять кожні 4 годин, концентрація L-аспарагінази визначається після закінчення процесу культивування | t=30°C,<br>τ=12 год,<br>рН 8,5,<br>C <sub>б</sub> =2,8<br>г/л,<br>C <sub>а</sub> =7,52<br>г/л,<br>відсутність<br>сторонньої<br>мікробіоти |

## 7.2. Мікробіологічний контроль

Мікробіологічний контроль здійснюється шляхом розсіву культури на чашки Петрі з агаризованими середовищами і подальшим мікроскопуванням.

Культуральну рідину розсівають петлею до ізольованих колоній на чашки Петрі з триптон-соевим агаром (ТСА) або м'ясо-пептонним агаром (МПА) для виявлення бактерій, з сусло-агаром (СА) – для виявлення дріжджів і грибів. Колонії *E. carotovora* МТСС 1428 скупчені, дрібноточкові, мають овальну форму та кремовий колір. Розмножуючись, бактерії утворюють вологу плівку (рис. 7.1) [28].



Рис. 7.1. Колонії *E. carotovora* МТСС 1428 на чашці Петрі та у полі зору мікроскопу.

Для мікроскопування використовують метод “роздавлена крапля”. Зразок колонії потрібно покласти в краплю води, нанесену на предметне скло, і зверху накрити покривним склом. Надлишок рідини слід видалити за допомогою фільтрувального паперу.

За відсутності у зразку сторонньої мікробіоти під час мікроскопіювання виявляють палички розміром 2 мкм, грамнегативні, ендоспор не утворюють, діаметр складає 0,5-0,6 мкм [28].

### **7.3. Показники росту і синтезу цільового продукту**

#### **7.3.1. Визначення концентрації біомаси**

Зразки центрифугували при 10000 об/хв протягом 10 хв при температурі  $4\pm 1^\circ\text{C}$  і двічі промивали 0,05М Трис-НСІ-буфером (рН 8,6). Промиті клітини руйнували ультразвуком при 20 МГц, 35% амплітуди в 4 цикла (2 хвилини на цикл при 1,5 с і 0,5 с) і вміст центрифугували при 20000 об/хв протягом 10 хвилин ( $4\pm 1^\circ\text{C}$ ) [7].

#### **7.3.2. Визначення активності L-аспарагінази**

Для визначення активності фермента використовували модифікований метод Несслера, в перерахунку на виділення 1 мкМ аміаку на хвилину при  $37^\circ\text{C}$ . [7, 29]. Метод заснований на виділенні аміаку при ферментативному каталізі L-аспарагіну до L-аспарагінової кислоти.

Суміш для ферментативного аналізу складалась з 900 мкл L-аспарагіну (100 мМ) в Трис-НСІ-буфері (рН 8,6) і 100 мкл неочищеного екстракту фермента. Реакційну суміш інкубували при  $37^\circ\text{C}$  протягом 30 хв і додавали 100 мкл 15% трихлороцтової кислоти (ТХУ) для зупинки реакції. Реакційну суміш центрифугували при 10000 об/хв протягом 5 хвилин для видалення осаду і аміаку, що виділявся в супернатанті. Визначення проводили колометрично, додаючи 100 мкл реагенту Несслера в зразок, що містить 100 мкл супернатанту та 800 мкл дистильованої води. Вміст струшували та інкубували при кімнатній температурі протягом 10 хвилин з подальшим вимірюванням на фотоколориметрі при 425 нм порівнюючи з клітинною суспензією до додавання ТХУ. Аміак, виділений в реакції порівнювали за

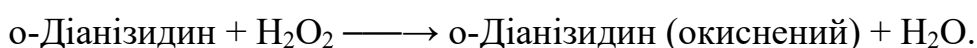
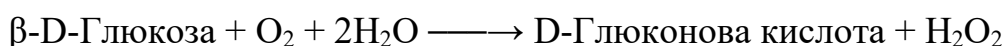
стандартною кривою, отриманою для сульфата амонію в якості стандарту. Одна одиниця активності ферменту була визначена як така кількість ферменту, що вивільняє 1 мкмоль аміаку за 1 хв при 37 °С [10].

### 7.3.3. Концентрація джерела вуглецю і азоту

#### *Визначення концентрації джерела вуглецю*

Глюкозооксидазний метод

Для визначення глюкози в досліджуваному розчині проводять дві послідовні реакції:



У першій реакції використовується ензим глюкозооксидаза, який є високоспецифічним стосовно  $\beta$ -D-глюкози [30].

#### *Визначення концентрації джерела нітрогену*

Оскільки як джерело азоту для синтезу біомаси та цільового продукту використовували пептон та дріжджовий екстракт, то доцільно застосувати метод Лоурі для визначення загального білку.

Слід зазначити, що визначенню можуть заважати деякі солі, тіолові сполуки, вуглеводи, ліпіди, неіонні детергенти, органічні розчинники, комплекси та ін. Більшість заважаючих речовин дає слабе фарбування, однак застосування деяких детергентів призводить до значного збільшення забарвлення. Висока концентрація солі може бути причиною утворення осаду. Тому для зменшення впливу речовин, що заважають визначенню, проводять додаткове розведення розчину, що забезпечує концентрацію випробуваного білка на рівні, достатньому для проведення точних вимірювань, або осадження білків розчинами натрію дезоксихолату і трихлороцтової кислоти.

Метод заснований на реакції білків з солями міді (II) в лужному розчині і відновленні фосфорномолібдено-вольфрамового реактиву (реактив Фоліна) з утворенням забарвлених продуктів, інтенсивність забарвлення яких визначають за оптичною густиною при 750 нм. Реактив Фоліна взаємодіє із залишками ароматичних амінокислот білка, головним чином тирозину, а

також триптофану і фенілаланіну і, в меншій мірі, цистеїну. Яскравість забарвлення досягає максимуму через 20-30 хв при кімнатній температурі, далі спостерігають зменшення інтенсивності. Оскільки різні види білків можуть давати кольорові реакції різної інтенсивності, випробуваний білок повинен відповідати стандартним зразкам. В якості зразка використовували бичачий сироватковий альбумін [31].

#### **7.4. Показники якості готового продукту**

##### ***Визначення активності аспарагінази***

Визначення активності аспарагінази можливо зробити за допомогою тест синтеми МААТ тест medac [29].

##### **Принцип тесту**

Аспарагіназа

Субстрат → продукт розпаду А + продукт розпаду В

ферментативний гідроліз

Продукт розпаду В + хромоген → зелене забарвлення

→ зміна абсорбції при довжині хвилі 700 нм.

Аспарагіназа розщеплює субстрат, аналогічний аспарагіну, на два продукти розщеплення - А і В.

Вивільнений продукт розпаду утворює у результаті комплексної реакції з хромогеном забарвлений у зелений колір продукт, що визначає можливість абсорбційного вимірювання.

Оптична щільність вимірюється на довжині хвилі 700 нм, активність сироваткової аспарагінази визначається за допомогою стандартної кривої.

##### **Переваги методу**

- Кожна мікро лунка може бути розкрита і використана окремо.
- Простота методики, що не потребує відмивання або центрифугування.
- Тривалість виконання тесту - близько 2 годин.
- Висока точність результатів аналізу.

##### **Необхідні матеріали для проведення тесту**

1. Пластина з мікро лунками: брядів по 8 лунок у кожному (у рамці, вакуум герметично упакована в алюмінієвий контейнер), легко розкривається, U-подібної форми, спеціально оброблена.

2. Контроль: 2 пробірки - 0,5мл у кожній, аспарагіназа ліофілізована.

3. Стандарт: 2 пробірки - 0,5мл у кожній, аспарагіназа ліофілізована.

За. Стандарт 1: 600 Од/л Зв. Стандарт 2: 300 Од/л Зс. Стандарт 3: 50 Од/л Зд.  
Стандарт 4: 0 Од/л

4. Розчинник зразків: 1 флакон- 110 мл, PBS/TWEEN/BSA, рН=7,2-7,4, готовий до використання, містить ProClin™300.

Субстрат: 2 пробірки - 0,75 млу кожній, готовий до використання, містить ProClin™ 300.

5. Хромоген: 2 пробірки - 1 млу кожній, концентрований, Хі, подразливий засіб, R 36/38, S 26, міститьдиметилсульфоксид (ЕЕС № 200-664-3).

6. Розчинник хромогену: 2 пробірки - 2 мл у кожній, готовий до використання.

7. Мікропіпетки відповідного об'єму.

8. Чисті скляні або пластикові ємності для розчинення зразків і хромогену.

9. Фотометр для роботи з мікролунками та фільтром з довжиною хвилі 700 нм.

### **Методика аналізу**

1. Надрізають алюмінієвий контейнер для мікро пластини над " блискавкою" та візьміть потрібну кількість мікрогумок (таб. 7.2).

2. За допомогою піпетки вносять у мікролунки пластини по 20 мкл контролю, калібратора та проби.

3. Додають у кожна мікролунку 20 мкл субстрату.

Піпетування калібраторів, контролів, проб і субстрату повинно бути закінчено за 10 хвилин. Акуратно збовтати вміст для ретельного перемішування всіх його компонентів. Після цього відразу ж починають інкубацію мікропластини.

Інкубують закриті мікролунки пластини протягом 60 хв ( $\pm 2$  хв) при кімнатній температурі ( $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ). На момент закінчення часу інкубації готують розчин хромогену. В усі мікро лунки пластини додають 100 мкл розчину хромогену. Інкубують закриті мікро лунки пластини протягом 60 хв ( $\pm 2$  хв) при кімнатній температурі ( $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ). Рівномірно перемішують всі компоненти шляхом обережного струшування. Фотометричний аналіз виконують відразу після закінчення останнього етапу інкубації.

Таблиця 7.2.

**Таблиця проведення аналізу**

|   | Калібратори | Контроль | Зразки  |
|---|-------------|----------|---------|
| Калібратори   | 20 мкл      | -----    | -----   |
| Контроль  | -----       | 20 мкл   | -----   |
| Зразки  | -----       |          | 20 мкл  |
| Субстрат  | 20 мкл      | 20 мкл   | 20 мкл  |
| Інкубація 60 хв при кімнатній температурі ( $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ). |             |          |         |
| Розчин хромогену  | 100 мкл     | 100 мкл  | 100 мкл |
| Інкубація 60 хв при кімнатній температурі ( $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ). |             |          |         |
| Фотометричний аналіз на довжині хвилі 700 нм  |             |          |         |

### **Підрахунок результатів (достовірність)**

- Визначають показники оптичної щільності при довжині хвилі 700 нм. Вимірювання оптичної щільності *blank* проводять проти повітря.
- Обов'язкові показники активності контролю надруковані на етикетці пробірки. Критерії достовірності
- Активність контролю повинна знаходитися у межах величин, які вказані ,, (див. етикетку на пробірці).
- Показник оптичної щільності калібратора 1 повинен бути  $> 1,500$ .
- Показник оптичної щільності калібратора 4 повинен бути  $< 0,150$ .

### **Калібрувальний графік і кількісна оцінка результатів**

Показники оптичної щільності (ОЩ) калібраторів наносяться на графік навпроти показників активності. Рекомендовано для побудови калібрувального графіка використовувати "cubicspline approximation".

Стандартна калібрувальна крива дозволяє визначити показники активності проб аспарагін ази відповідно до значень їх оптичної щільності.

Показники, що вимірюються, знаходяться в інтервалі від 30 до 600 Од/л.

Проби з показниками нижче рівня, що вимірюється, повинні бути інтерпретовані як такі, що мають значення активності < 30 Од/л. Проби з показниками вище рівня, що вимірюється, повинні бути інтерпретовані як такі, що мають значення активності > 600 Од/л. Ці показники не повинні бути екстрапольовані, їх визначення слід повторити приблизно вищому розведенню.

Якщо проба була виміряна при розведенні більшому, ніж 1:10, значення активності аспарагін ази, яке визначене за калібрувальною кривою, необхідно помножити на додатковий фактор розведення (наприклад: розведення проби 1:40, визначена концентрація 250 Од/л, реальна концентрація становитиме:  $250 \times 4 = 1000$  Од/л).

### ***Визначення вмісту вологи***

Контроль вологовмісту готового продукту буде проводитись за допомогою аналізатора вологості «Radwag MA 50/1.R» - сучасного лабораторного електронного вимірювального приладу, призначеного для визначення маси та відносної вологості або сухого залишку продукції [30]. Принцип роботи вологоміра наступний: досліджуваний зразок зважують, нагрівають до визначеної температури за спеціально розробленими методиками та режимами, після чого його знову зважують і визначають різницю, що дорівнює втраті вологи.

Таке дослідження дозволяє виявити та визначити масову частку не лише вільної води, а й зв'язаної вологи.

У аналізаторах вологості Radwag MA 50/1.R в усіх базових моделях з максимальною температурою нагрівання 160°C застосовуються інфрачервоні лампи нагріву замість галогенних. Прилади з інфрачервоною лампою

забезпечують кращу точність та повторюваність результатів, короткий термін сушіння, до того ж ,інфрачервона лампа є універсальнішою - більшість зразків може бути висušена нею.

Таблиця 7.3.

### Технічні характеристики аналізатора вологості Radwag MA 50/1.R

|                                       |                    |
|---------------------------------------|--------------------|
| Найбільша границя зважування (НГЗ), г | 50                 |
| Найменша границя зважування (НмГЗ), г | 0.002              |
| Дискретність відліку (d), г           | 0.0001             |
| Вибирання маси тари, г                | -50                |
| Клас точності (ДСТУ / ГОСТ)           | I / 2              |
| Тип індикатора                        | рідкокристалічний  |
| Робочий діапазон температури, °С      | +5...30            |
| Дискретність визначення вологи, %     | 0.0001             |
| Максимальна температура сушіння, °С   | 160                |
| Інтервал між зважуваннями, сек        | 1...59             |
| Максимальна тривалість сушіння, хв    | 110                |
| Тип лампи нагріву                     | інфрачервоні лампи |
| Розмір зважувальної шальки, мм        | ø90                |

### Функції аналізатора вологості Radwag MA 50/1.R:

- Новий, зручний для читання рідкокристалічний дисплей з додатковим інформаційним текстовим рядком на якому відображаються повідомлення та інша інформація наприклад: назва продукту, вартість продукту, тара тощо. Піктограми позначають: запрограмований режим роботи аналізатора, підключення до комп'ютера, функції, що використовуються.
- Декілька інтерфейсів передачі даних: RS232, USB (Type A, Type B), USB, Wi-Fi (як опція)
- Можливість зберігання інформації у 6 базах даних: користувачів – до 100 осіб;  
товарів – до 1000 товарів;  
зважувань – до 1000;  
значень тари – до 100;

програми висушування – до 100;

звіти – до 1000.

- Можливість імпорту і експорту баз даних за допомогою зовнішніх пристроїв зберігання інформації.
- 4 профілі висушування: (стандартний, швидкий, поступовий, середній).
- 3 типи закінчення висушування: (згідно з методикою, автоматичний, ручний).
- Друк протоколів GLP/GMP.

## РОЗДІЛ 8. Автоматизація ділянки виробництва

Технічне завдання для створення схеми автоматизації у вигляді

показників які необхідно контролювати наведено в *табл.8.1*

*Таблиця 8.1.*

### Завдання на розробку системи автоматизації

| Параметр,<br>місце відбору<br>імпульсу     | Значення<br>параметру<br>допустимі<br>відхилення | Система автоматизації        |   |   |
|--|--|------------------------------|---|---|
|  |  | Вид системи<br>автоматизації | Характер<br>контролю,<br>регулювання,<br>управління         | Додаткові<br>вимоги   |
| Температура в<br>апараті                   | $30 \pm 2^\circ\text{C}$                         | Контроль,<br>регулювання     | Моніторинг  | Керування<br>аналоговим<br>пневматичним<br>клапаном<br>(подача води у<br>сорочку)                     |
|  |  |                              | Підтримання<br>на заданому<br>значенні                      |   |
|  |  |                              | Сигналізація<br>при<br>значному<br>відхиленні<br>(світлова) |   |
| Оберти<br>перемішуючого<br>пристрою        | 180 об/хв  | Контроль,<br>управління      | Покази  | Керування<br>двигуном<br>(дискретне)  |
|  |  |                              | Пуск/стоп   |   |
|  |  |                              | Сигналізація<br>(світлова)                                  |   |
| Вміст<br>розчиненого<br>кисню в<br>апараті | 1,5 л/л  | Контроль,<br>регулювання     | Моніторинг  | Керування<br>аналоговим<br>пневматичним<br>клапаном<br>(подача<br>стисненого<br>очищеного<br>повітря) |
|  |  |                              | Підтримання<br>на заданому<br>значенні                      |   |
|  |  |                              | Сигналізація<br>при<br>значному<br>відхиленні<br>(світлова) |   |

|             |      |              |        |      |  |  |  |             |      |         |    |  |
|-------------|------|--------------|--------|------|--|--|--|-------------|------|---------|----|--|
|             |      |              |        |      | НУХТ БТЕК 04.02.40 КР ПЗ                       |  |  |             |      |         |    |  |
| Змн.        | Лист | № докум.     | Підпис | Дата | Розділ 8. Автоматизація<br>ділянки виробництва |  |  | Літ.        | Арк. | Аркушів |    |  |
| Розроб.     |      | Тихолоз Д.А. |        |      |  |  |  |             |      | 83      | 94 |  |
| Перевір.    |      | Пенчук Ю.М.  |        |      |  |  |  | Кафедра БТМ |      |         |    |  |
| Консультант |      |              |        |      |  |  |  |             |      |         |    |  |
| Н. Контр.   |      |              |        |      |  |  |  |             |      |         |    |  |
| Затверд.    |      | Пирог Т.П.   |        |      |  |  |  |             |      |         |    |  |

|           |     |                          |  |  |
|-----------|-----|--------------------------|--|--|
| Рівень рН | 8,5 | Контроль,<br>регулювання | Моніторинг                             | Керування<br>аналоговим<br>пневматичним<br>клапаном<br>(подача<br>розчину<br>NaOH) |
|           |     |                          | Підтримання<br>на заданому<br>значенні |  |
|           |     |                          | Сигналізація                           |  |

### Опис функціональної схеми автоматизації

**Контур 1.** Необхідно контролювати і регулювати значення величини рН в ферментері, який має регламентоване значення 8,5 од.рН. Спостереження за зміною передбачається на АРМі оператора-технолога зі збереженням (реєстрація) цих змін в його архіві. Для регулювання значенням величини рН передбачається його стабілізація на заданому значенні за рахунок зміни подачі окислювача в апарат. На схемі автоматизації на трубопроводі подачі пари показуємо зображення регулюючого органу і виконавчого механізму, до якого буде під'єднуватись лінія зв'язку яка буде виходити з ПК і ПЛК. Прилад для вимірювання складаються з двох частин: самого датчика і вторинного перетворювача, який перетворює сигнал від датчика в уніфікований електричний сигнал, зображення яких на схемі автоматизації показано у прямокутнику «Прилади по місцю». І вже після них сигнал поступає на аналоговий вхід ПЛК.

У данному випадку передбачається аналогове регулювання, в якому використовується аналоговий пневматичний виконавчий механізм для керування яким необхідно передбачити електро-пнеumo перетворювач, який показується на схемі автоматизації у прямокутнику «Щит перетворювачів». На нього поступає сигнал з ПЛК, який в свою чергу отримує сигнал з АРМа оператора технолога.

**Контур 2.** Показник вмісту розчиненого кисню у культуральній рідині вимірюється рідинним газоаналізатором. Аналоговий сигнал від датчика подається на МПК перетворюючись у цифровий, і в залежності від інтенсивності споживання кисню мікроорганізмами, автоматично дозується

подача аераційного повітря в ферментер регулюючим органом – аналоговою заслінкою, що приводиться в дію за допомогою мембранного виконавчого механізму. Уніфікований пневматичний сигнал до ВМ надходить з електро-пневмоперетворювача.

**Контур 3.** Температура культуральної рідини вимірюється постійно за допомогою термоелектричного перетворювача. Сигнал від термодатчика у вигляді величини термоелектрорушійної сили (ТЕРС) надходить до нормуючого перетворювача і перетворюється в уніфікований електричний сигнал. Останній йде до МПК, конвертується у цифровий. При відхиленнях температури (екзотермічний процес) подача води технічної холодної в сорочку інокулятора автоматично дозується регулюючим органом – аналоговою заслінкою, що приводиться в дію за допомогою мембранного виконавчого механізму. Уніфікований пневматичний сигнал до ВМ надходить з електро-пневмоперетворювача.

**Регулювання перемішуючого пристрою.** При натисканні кнопки «Пуск» на моторі М відбувається перемішування культуральної рідини в апараті із заданою частотою обертів. Керування можна здійснювати як по місцю за допомогою ключа керування так і на щиті (панель дистанційного ручного керування).

### Специфікація засобів автоматизації

Таблиця 8.2

| Позиція | Параметр | Місце установки | Найменування характеристика приладу   | Тип моделі | Завод виготовлювач |
|---------|----------|-----------------|---|------------|--------------------|
| 1       | 2        | 3               | 4   | 5          | 6                  |
| 1a      | pH       | В агрегаті      | pH електроди, матеріал скло, пластик, діапазон вимірювань pH 1...12, максимальна температура до 80 <sup>0</sup> C, максимальний | APS        | Kobold             |

|                  |   |            |  |                   |                       |
|------------------|---|------------|--|-------------------|-----------------------|
|                  |   |            | допустимий тиск<br>ббар  |                   |                       |
| 1б               | pH  | По місцю   | Перетворювач<br>вимірювання pH і<br>окисно-відновного<br>потенціалу,<br>аналоговий вихід   | APM-Z             | Kobold                |
| 1в,<br>2б,<br>3б | pH,<br>Розчинений<br>кисень,<br>Температура<br>КР | На щиті    | Електропневматичний<br>перетворювач,<br>вихідний сигнал –<br>4...20 мА, вихідний<br>сигнал 20...100 кПа  | 2713-WP           | Dwyer                 |
| 1г,<br>2в,<br>3в | pH,<br>Розчинений<br>кисень,<br>Температура<br>КР | По місцю   | Мембранний<br>виконавчий механізм<br>прямої дії для<br>управління кранами та<br>заслінками,<br>управляючий сигнал –<br>20...100 кПа,<br>крутячий момент –<br>5...30 нм/бар, кут<br>повороту – 90°                      | KUP               | Kobold                |
| 2а               | Розчинений<br>кисень                              | В агрегаті | Промисловий<br>екстрактивний<br>газоаналізатор 3-х<br>компонентний, CO –<br>0...250 мг/м <sup>3</sup> , CO <sub>2</sub> –<br>0...400 мг/м <sup>3</sup> , SO <sub>2</sub> –<br>0...400 мг/м <sup>3</sup>                | ULTRA-<br>MAT 23  | SIMENS                |
| 3а               | Температура<br>КР                                 | В агрегаті | Термоелектричні<br>перетворювачі<br>(термопари), матеріал<br>виготовлення –<br>латунь, градувальна<br>характеристика<br>хромель-копель (К),<br>діапазон вимірювань:<br>–50...+1100 градусів<br>С, клас точності – 1,0. | 1-3, ТХА<br>(К)   | ПАО «Тера»<br>Україна |
| КМ<br>1          | Магнітний<br>пускач                               | На щиті    | Магнітний пускач,<br>робочий струм 7А,   | 3RT2015-<br>1AP01 | SIEMENS               |

|                 |           |         |   |                   |         |
|-----------------|-----------|---------|---|-------------------|---------|
|                 |           |         | потужність двигуна<br>3кВт, управляючий<br>сигнал 220В  |                   |         |
| SA<br>1         | Перемикач | На щиті | Перемикач 3-х<br>позиційний<br>(автоматичний-ручний<br>з щита – ручний по<br>місцю) з фіксацією | 3SB3210-<br>2DA11 | SIEMENS |
| SB1<br>,<br>SB2 | Перемикач | На щиті | Двоклавішна кнопка<br>станція «Пуск»-<br>«Стоп» 1НО+1НЗ,  | 8LP2T<br>B7113    | Lovato  |

## РОЗДІЛ 9. Охорона довкілля

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

Технологія одержання L-аспарагінази включає в себе наступні стадії:

1. Доферментаційні допоміжні роботи – підготовка аераційного повітря, санітарна підготовка виробництва, приготування та стерилізація: титрувальних агентів, поживного середовища на стадію отримання посівного матеріалу та на виробничий біосинтез  $\epsilon$ -полілізину, приготування допоміжних розчинів для етапу виділення та очищення.
2. Ферментаційний технологічний процес – одержання посівного матеріалу, біосинтез L-аспарагінази.
3. Післяферментаційний технологічний процес – відділення біомаси, гомогенізація, осадження ферменту, виділення L-аспарагінази, концентрування та сушіння.

Розглянувши дані етапи можна зазначити що місцем емісії рідких відходів є етап приготування титрувальних розчинів, відділення біомаси, виділення L-аспарагінази та концентрування, місцем емісії газоподібних відходів є: одержання посівного матеріалу та виробничий біосинтез, місцем емісії твердих відходів є гомогенізація та осадження ферменту.

### 9.2 Перспективи впровадження системи екологізації виробництва

#### 9.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів

Рідкі промислові відходи за рівнем небезпеки все вони поділяються на п'ять класів: до I - відносяться найбільш небезпечні, до V - найбільш нешкідливі:

- до I категорії відноситься ртуть і речовини, що містять домішки ртуті
- сірчана кислота входить в список II класу високонебезпечних виробничих рідин
- до розряду помірно небезпечних (III клас) відносять масла

|             |      |              |        |      |                               |             |      |         |
|-------------|------|--------------|--------|------|-------------------------------|-------------|------|---------|
|             |      |              |        |      | НУХТ БТЕК 04.02.40 КР ПЗ      |             |      |         |
| Змн.        | Лист | № докум.     | Підпис | Дата |                               |             |      |         |
| Розроб.     |      | Тихолоз Д.А. |        |      | Розділ 9. Охорона<br>довкілля | Літ.        | Арк. | Аркушів |
| Перевір.    |      | Пенчук Ю.М.  |        |      |                               |             | 88   | 94      |
| Консультант |      |              |        |      |                               | Кафедра БТМ |      |         |
| Н. Контр.   |      |              |        |      |                               |             |      |         |
| Затверд.    |      | Пирог Т.П.   |        |      |                               |             |      |         |

- до малонебезпечних (IV клас) - рідкі відходи нафтохімічної промисловості.

Найбільш зручними методами для утилізації рідких відходів є:

- **Біотехнологічний метод.**

Обробка біохімічним способом із застосуванням мікроорганізмів, які живляться компонентами, що входять до складу рідких відходів.

Одним з найбільш ефективним методом очистки стічних вод – Аеробне очищення стічних вод біотехнологічним методом в аеротенках. Аеротенк являє собою споруду з постійно протікючою всередині стічною водою, у всій товщині якої розвиваються аеробні мікроорганізми, які споживають субстрат, тобто "Забруднення" стічної води.

Стічні води надходять в аеротенк, як правило, після стадії механічного очищення. Для забезпечення нормального процесу біохімічної очистки в аеротенках необхідно безперервно подавати повітря, що досягається за допомогою пневматичної, механічної або пневмомеханічної аерації

- **Спалювання.**

Спалювання в циклічних (багатокамерних, випалювальних, соляних) печах, реакторах піролізу (спалювання без повітря). За рахунок застосування високих температур в (до 800 ° C) цей метод дозволяє повністю детоксикувати небезпечні речовини. На жаль цей спосіб досить витратний [32].

### **9.2.2. Система знешкодження та утилізації твердих відходів**

За характером і ступенем впливу на природне середовище вони діляться на:

- виробничий; сміття, що складається з інертних матеріалів, утилізація яких в даний час економічно невиправдана;
- утилізовані матеріали (вторинна сировина);
- відходи 3 класу безпеки;
- відходи 2 класу безпеки;
- відходи 1 класу безпеки

Залежно від класу та типу відходів існують такі методи утилізації твердих промислових відходів:

- поховання на спеціально відведеній території (полігоні);
- спалювання ТПВ на спеціальних заводах;
- реутилізацію (повторна обробка та захоронення);
- детоксикація (знешкодження небезпечних компонентів);
- переробка повна або часткова для подальшого використання.

В нашому випадку тверді відходи представлені пакувальною тарою, тому найбільш економічним та зручним методом утилізації твердих відходів є повна або часткова переробка з подальшим використанням.

[33]

### **9.2.3. Система знешкодження газоповітряних викидів**

Найпростішими в реалізації та недорогими установками для по очищенню і дезодорації повітря є установки, що працюють за абсорбційним метод очищення, при якому забруднення з газової фази переводяться в рідку. Після ферментації відпрацьоване повітря подається на головні фільтри для очищення й знешкодження через колектори.

Адсорбція відбувається в апаратах — адсорберах, які бувають періодичної і безперервної дії. У практиці застосовують два види адсорбції — фізичну і хімічну, необоротну і таку, що має обмежене застосування.

Установки адсорбційного осушення мають зазвичай два — чотири адсорбера. Вологий газ поступає в сепаратори для видалення механічних домішок, краплинної вологи, рідких вуглеводнів і прямує в адсорбер. Осушений газ з адсорбера поступає в магістраль.

Суть даного методу полягає в тому, що легкоадсорбуючі компоненти суміші поглинаються адсорбентом, в той час як слабоадсорбуючі або неадсорбуючі проходять через апарат, завдяки чому відбувається поділ газової суміші.

Адсорбент поглинає газ до стану рівноваги між адсорбцією і десорбцією, після чого адсорбент необхідно регенерувати, тобто видалити з поверхні адсорбенту поглинені компоненти. [34]

## Література

1. Борсакова Д.В., Синаурідзе Е.И. L-аспарагиназа: новые подходы к улучшению фармакологических свойств // Вопросы гематологии, онкологии и иммунопатологии в педиатрии. – 2018. – 17, № 4. – С. 82–99. DOI: 10.24287/1726-1708-2018-17-4-82-99.
2. Devi S., Kulshreshtha A., Kumar A. R., Azmi W. Bench-scale production of L-asparaginase from *Erwinia carotovora* in a laboratory fermenter // Int J Life Sci Pharma Res. – 2012. – 2, № 3. – P. 25-35.
3. Соколов Н.Н., Эльдаров М.А., Покровская М.В. Бактериальные рекомбинантные L-аспарагиназы: свойства, строение и антипролиферативная активность // Биомедицинская химия. – 2015. – 61, № 3. – С. 312-324.
4. 20 випуск Національного канцер-реєстру [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://unci.org.ua/20-vipusk-nacionalnogo-kancer-reyestru/> .
5. АСПАРАГІНАЗА 10 000 МЕДАК інструкція для застосування [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.ifumed.com/ua/asparaginaza-10-000-medak> .
6. Препараты аспарагиназы в лечении детей, больных острым лимфобластным лейкозом [Електронний ресурс] Режим доступу: [https://umedp.ru/articles/preparaty\\_asparaginazy\\_v\\_lechenii\\_detey\\_bolnykh\\_ostroy\\_m\\_limfoblastnym\\_leykozom.html](https://umedp.ru/articles/preparaty_asparaginazy_v_lechenii_detey_bolnykh_ostroy_m_limfoblastnym_leykozom.html) .
7. Kumar S., Prabhu A.A., Dasu V. V., Pakshirajan K. Batch and fed batch bioreactor studies for the enhanced production of glutaminasefree L-asparaginase from *Pectobacterium carotovorum* MTCC 1428 // Prep Biochem Biotechnol. – 2017. – Vol. 47, №1. – P. 74-80. DOI: 10.1080/10826068.2016.1168841.
8. Sanjay Kumar, Ashish A. Prabhu, V. Venkata Dasu, Kannan Pakshirajan «Batch and fed batch bioreactor studies for the enhanced production of glutaminasefree L-asparaginase from *Pectobacterium carotovorum* MTCC 1428» DOI: 10.1080/10826068.2016.1168841

9. Д.М. Закоморний, В.М. Поводзинський, В.Ю. Шибецький «Класифікація та аналіз роботи ферментерів з механічними перемішуючими пристроями в аеробних процесах біотехнології» DOI: 10.15587/2313-8416.2015.42614

10. Карлаш Ю.В. Основи проектування біотехнологічних виробництв: Конспект лекцій для студентів напрямку 6.051401 «Біотехнологія» денної та заочної форми навчання / Уклад.: Ю.В Карлаш – К: НУХТ, 2013. – 143с.

11. Пирог Т.П., Ігнатова О.А. Загальна біотехнологія: Підручник. – К.: НУХТ, 2009. – 336с.

12. *ФЯП* – воздушный фильтр грубой очистки [Електронний ресурс] // Вентиляторный завод «Укрвентсистемы» – Режим доступу: [<http://www.ukrvent.com/fyau.html>].

13. *Обладнання* для промисловості [Електронний ресурс] // Завод «МАШ» –Режим доступу: [<http://www.molmash.ru/page/page39.html>].

14. *Лич І.В.* Промислова технологія лікарських засобів: Конспект лекцій (І частина) для студ.напрямку 6.051401 «Біотехнологія» ден. та заоч.форми навч. – К.: НУХТ, 2011. – 146 с.

15. *Наказ* МОЗ України «Про затвердження методичних рекомендацій щодо виконання санітарно-гігієнічних вимог та проведення мікробіологічного контролю у виробництві нестерильних лікарських засобів» від 14.12.2001. – № 502.

16. *Биомой* – предстерилизационное средство [Електронний ресурс] // Режим доступу: [<http://www.farmakos.ua/bimoj.html>].

17. *Хлорантоин* - дезинфекционное средство [Електронний ресурс] // Режим доступу: [<http://www.farmakos.ua/hlor.html>].

18. Пат. 2441916 РФ. Рекомбинантная плазмидная ДНК расус-lans(km), штамм *Escherichia coli* BL21(de3), трансформированный рекомбинантной ДНК расус-lans(km), и способ получения рекомбинантной 1-аспарагиназы *Erwinia carotovora* / Сидорчук К.В., Богуш В.Г., Эльдаров М.А. – Опубл. 10.02.2012.

19. *Способи* отримання ферментів [Електронний ресурс] // Режим доступу: [ua-referat.com / *Способи отримання ферментів*].

20. Verma N., Kumar K., Kaur G., Anand S. L-asparaginase: a promising chemotherapeutic agent. // Crit. Rev. Biotechnol. – 2007. – Vol. 27, № 1, - P. 45–62

21. Борисова А.А, Эльдаров М.А., Жгун А.А. Выделение, очистка и некоторые свойства рекомбинантной аспарагиназы *Erwinia carotovora*, экспрессированной в клетках *E.coli* // Биомед. химия. – 2003. – Т.49. №5. – С.502-507.

22. Пат. 436085 SU. Способ очистки L-аспарагиназы / В. М. Денисов, В. И. Максимов, Г.А. Молодова. – Оpubл. 1982.

23. Пат. 537114 SU.Способ удаления пирогенных веществ с аспарагиназы / Г. И. Клейнер, Р. А. Жагат, Л. В. Пояркова, Л. М. Елизаровская. – Оpubл. 1976.

24. Pourhossein M., Korbekandi H. Cloning, expression, purification and characterisation of *Erwinia carotovora* L-asparaginase in *Escherichia coli* // *Adv. Biomedical Res.* – 2014. – №3. – P. 8–10.

25. Suchita C. Warangkar and Chandrahas N. Khobragade. Purification, Characterization, and Effect of Thiol Compounds on Activity of the *Erwinia carotovora* L-Asparaginase. – 2010.

26. Я. П. Лиса, О. Я. Беспалова. Дослідження впливу температури як параметра процесу ліофілізації. Вісник КрНУ імені Михайла Остроградського. -2013. – С. 184-189.

27. Ліофільна сушарка. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.mbu-tech.com/uslugi/57-uslugi-liofilnoj-sushki>

28. Cinikli K.T., Kılıç S.M., Uçar S., Canca E., Dikbaş N. Isolation Of *Pectobacterium Carotovorum*, Identification With 16s Rrna, Phytase Activity And Characterization Of The Bacteria // *Research Square.* – 2019. DOI:10.21203/rs.2.18716/v1

29. Kumar S., Pakshirajan K., Dasu V. V. Development of medium for enhanced production of glutaminase-free L-asparaginase from *Pectobacterium*

*carotovorum* MTCC 1428 // Appl Microbiol Biotechnol. – 2009. – Vol. 84, № 3. – P. 477-86. doi: 10.1007/s00253-009-1973-0.

30. Garriga M., Almaraz M., Marchiaro A. Determination of reducing sugars in extracts of *Undaria pinnatifida* (harvey) algae by UV-visible spectrophotometry (DNS method) // Int. J. Environ. Eng. Educ. – 2017. – Vol. 3. – P. 173-179.

31. ОФС.1.2.3.0012.15 Определение белка [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-2-3-0012-15-opredelenie-belka> .

32. Офіційний сайт групи компаній "Екологія" - [Електронний ресурс] - Режим доступу: <https://www.medwaste.ru/>

33. Офіційний сайт MetalSpace - [Електронний ресурс] - Режим доступу: <https://metalspace.ru/>

34. Кологривов М.М. Машини і обладнання газонафтопроводів та газонафтосховищ. Навчальний посібник. Одеса: Видавничий центр ОДАХ, 2009. – 115 с.