

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

«До захисту в ЕК»

«До захисту допущено»

Директор інституту (декан факультету)

Завідувач кафедри

_____ Грегірчак Н.М.
(підпис) (прізвище та ініціали)

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

«__» _____ 2020 р.

«__» _____ 2020 р.

Кваліфікаційна робота

на здобуття освітнього ступеня бакалавра

зі спеціальності _____ 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(шифр та назва спеціальності)

на тему: _____

Культивування *Streptococcus pneumoniae* для одержання
стрептококового бактеріофагу

Виконав: здобувач IV курсу, групи 1

Кутрик Іван Володимирович
(прізвище та ініціали)

Керівник _____ Гудзенко Олена Володимирівна _____
(прізвище та ініціали) (підпис)

Консультанти _____ Клименко О.М. _____
(прізвище та ініціали) (підпис)

(прізвище та ініціали) _____ (підпис) _____

Рецензент _____
(прізвище та ініціали) (підпис) _____

Засвідчую, що в цьому дипломному
проекті немає запозичень із праць
інших авторів без відповідних
посилань.

Здобувач _____
(підпис)

Київ – 2020 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю
Кафедра біотехнології і мікробіології
Освітній ступінь бакалавр
Напрямок підготовки _____
(шифр і назва)
Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(шифр і назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

Пирог Т.П.

«17» березня 2020 року

З А В Д А Н Н Я

НА ДИПЛОМНИЙ ПРОЕКТ (РОБОТУ) ЗДОБУВАЧУ

Кутрику Івану Володимировичу

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема проекту (роботи) Культивування *Streptococcus pneumoniae* для одержання стрептококового бактеріофагу

керівник проекту (роботи) Гудзенко О.В., к.б.н., ст. викл.

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

затверджені наказом вищого навчального закладу від «16» березня 2020 року № 227-кв

2. Строк подання здобувачем проекту (роботи) 01 червня 2020 року

3. Вихідні дані до проекту (роботи) біологічний агент: *Streptococcus pneumoniae*, цільовий продукт: стрептококовий бактеріофаг

4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту. РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента. РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування. РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту. РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми. РОЗДІЛ 6. Матеріальний баланс і розрахунок обладнання. РОЗДІЛ 7. Специфікація обладнання. РОЗДІЛ 8. Опис технологічної схеми виробництва бактеріофагу. РОЗДІЛ 9. Контроль виробництва. РОЗДІЛ 10. Автоматизація ділянки виробництва.

5. Перелік графічного матеріалу (з точним зазначенням обов'язкових креслень)

Технологічна схема виробництва – 1 аркуш формату А1. Апаратурна схема виробництва – 2 аркуші формату А1. Схема автоматизації ділянки виробництва на форматі А2.

6. Консультанти розділів проекту (роботи)

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
10	Клименко Олег Миколайович доцент, к.т.н., кафедра автоматизації та комп'ютерних технологій систем управління	23.03.2020	24.04.2020

7. Дата видачі завдання «17» березня 2020 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів дипломного проекту (роботи)	Строк виконання етапів проекту (роботи)	Примітка
1.	Характеристика цільового продукту	21.03.2020 – 23.03.2020	
2.	Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	23.03.2020 – 29.03.2020	
3.	Техніко-економічне обґрунтування	30.04.2020 – 05.04.2020	
4.	Біосинтез цільового продукту	07.04.2020 – 11.04.2020	
5.	Обґрунтування вибору технологічної схеми	12.04.2020 – 21.04.2020	
6.	Матеріальний баланс і розрахунок обладнання	22.04.2020 – 29.04.2020	
7.	Специфікація обладнання	30.04.2020 – 03.05.2020	
8.	Опис технологічної схеми виробництва	04.05.2020 – 10.05.2020	
9.	Контроль виробництва	11.05.2020 – 15.05.2020	
10.	Автоматизація ділянки виробництва	16.05.2020 – 20.05.2020	
11.	Оформлення пояснювальної записки	21.05.2020- 31.05.2020	
12.	Виконання графічної частину проекту	21.05.2020 - 31.05.2020	

Здобувач _____ Кутрик І.В.
(підпис) (прізвище та ініціали)

Керівник проекту (роботи) _____ Гудзенко О.В.
(підпис) (прізвище та ініціали)

РЕФЕРАТ

Дипломний проект присвячений розробленню виробництва препарату Бактеріофага стрептококового Ср-1, який виявляє високу літичну активність до бактерійроду *Streptococcus*.

У проекті розрахована потреба в цільовому продукті (8000 л на рік) для оброблення ран, післяопераційних ран, виходячи з кількості хворих, а також дози та тривалості лікування.

Технологічний процес реалізується за допомогою допоміжних робіт (санітарна підготовка виробництва, підготовка інертного газу, підготовка і стерилізація поживних середовищ) та основних процесів (вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці, в інокуляторі об'ємом 50 л, виробничому ферментері об'ємом 500 л, центрифугування культуральної рідини, мікрофільтрації, ультрафільтрації), що наведені в технологічній та апаратурних схемах.

Дипломний проект складається з вступу, десяти розділів, списку використаних джерел, графічних матеріалів: апаратурної схеми та технологічної. Загальний обсяг роботи – 100 сторінок та 12 таблиць.

Ключові слова: бактеріофаг, фаголізат, резистентність, *Streptococcus pneumoniae*, лізуюча здатність, біосинтез, виділення.

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ.....	3
ВСТУП.....	6
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	8
РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА.....	11
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування.....	11
2.2. Розрахунок складу поживного середовища	13
2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента	14
2.4. Таксономічний статус	16
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ.....	17
3.1. Потреба у цільовому продукті.....	17
3.2. Розрахунок потужності виробництва	19
3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів	20
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.	21
РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	23
РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	25
5.1 Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу	25
5.1.1. Обґрунтування способу культивування та типу ферментера	25
5.1.2. Обґрунтування вибору стадій підготовки інертного газу	27
5.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів	28
5.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища	37
5.2. Обґрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту.....	39
5.2.1 Відділення залишків біомаси від фагових часток	39
5.2.2 Обґрунтування методу концентрування та очищення фагів	42
5.2.3. Обладнання для очищення фагів	46
5.3 Обґрунтування допоміжних робіт для стадії виділення та очищення цільового продукту	48
РОЗДІЛ 6. МАТЕРІАЛЬНИЙ БАЛАНС І РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ	50
6.1 Розрахунок партій продукту (виробничих циклів).....	51
6.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого культивування та вирощування посівного матеріалу	51
6.2.1. Приготування та стерилізація поживного середовищ для виробничого біосинтезу	51

6.2.2. Визначаємо кількість стадій вирощування посівного матеріалу.....	52
6.2.3	
Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу в ферментері	52
6.2.4 Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті геометричним об'ємом 50 л.	55
6.2.5. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках.....	57
6.3. Розрахунок матеріального балансу	58
6.4 Підбір та розрахунок ферментаційної апаратури.....	60
6.4.1 Уточнюючий розрахунок кількості ферментерів.....	60
6.4.2 Уточнюючий розрахунок кількості посівних апаратів	60
6.4.3 Уточнюючий розрахунок кількості качалочних колб.....	61
6.4.4 Розрахунок кількості реакторів-змішувачів для приготування та стерилізації ПС.....	61
РОЗДІЛ 7. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ.....	63
РОЗДІЛ 8. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	67
РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	84
9.1. Постадійний контроль виробництва бактеріофагу стрептококового	84
9.2 Мікробіологічний контроль виробництва.....	89
9.3 Показники росту і синтезу цільового продукту	90
9.3.1. Концентрація біомаси	90
9.3.2. Концентрація цільового продукту.....	90
9.3.3. Концентрація джерела вуглецю і азоту.....	92
РОЗДІЛ 10. АВТОМАТИЗАЦІЯ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЦТВА.....	94
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	99

ВСТУП

Неконтрольоване та не виправдане застосування протимікробних препаратів призвело до появи антибіотикорезистентності бактерій. Нині ця проблема набула світового масштабу. Міжнародні організації запроваджують моніторингові програми, намагаючись контролювати появу резистентних до протимікробних препаратів популяцій. Із погляду мікробіології нічого дивного не відбувається, адже всесвіт має свої закони, що допомагають йому існувати вже багато мільйонів років. Це один із механізмів адаптації бактерій задля виживання [1].

Різного роду механізми виживання є й в інших форм життя — вірусів. Майже кожний відомий нині вид бактерій є хазяїном для одного або кількох вірусів (бактеріофагів). Фаги бактерій поширені майже у всіх екосистемах: у ґрунті, воді, повітрі, фекаліях людей і тварин, промислових і побутових стоках тощо. Вони є одним із елементів цих систем, відповідно, спектр бактеріальних патогенів, що можуть бути мішенями фагів, досить широкий.

Це робить їх вагомим альтернативним антибіотикам й ідеальною «зброєю» проти мікроорганізмів. [2].

Наукова дискусія щодо ефективності фагової терапії розгорнулася відразу після заяви про можливість профілактики та лікування бактеріальних інфекцій за допомогою вірусів бактерій. Деякі вчені вважали бактеріофаги неживими ферментами, деякі стверджували про наявність у фаголізатах антибактеріальних речовин тощо. Дійсно, перші препарати були дещо недоопрацьованими, тому що містили залишки поживних середовищ, продуктів метаболізму та рештки бактеріальних клітин. Продукти метаболізму можуть містити антимікробні речовини, а уламки лізованих бактеріальних клітин — ліпополісахариди, що активізують імунну систему, чим згладжують ефект фаготерапії. Тому було розроблено технології отримання високо очищених фагових препаратів. Фагопрепарати поділяють на видоспецифічні (впливають лише на певний вид мікроорганізмів) і фаги, що впливають на декілька видів мікроорганізмів.

Бактеріофаги завдяки вузькій специфічності дії, на відміну від антибіотиків, не пригнічують нормальну мікрофлору, імунного захисту, не мають токсичної дії і не викликають алергії. Наявність резистентності бактерій до антибіотиків не впливає на літичну активність бактеріофагів. Бактеріофаги застосовують для лікування і профілактики гнійно-запальних захворювань і кишкових інфекцій [3].

Актуальність теми полягає в пошуку альтернативних антибіотичних препаратів, а саме препаратів на основі фаголізу, оскільки дані препарати не викликають резистентності бактерій та діють прицільно на збудник хвороби за рахунок спеціальних механізмів адсорбції.

Новизна полягає у використанні стрептококового бактеріофагу, який проявляє високу літичну активність щодо бактерій роду *Streptococcus*. А отже, препарат на основі даного бактеріофагу може бути використаним для лікування хвороб, викликаних бактеріями, що не чутливі до дії антибіотиків, якими лікують стрептококові інфекції.

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

Наразі гостро стоїть питання пошуку альтернатив антибіотикам, і однією із сучасних розробок є застосування вірулентних бактеріофагів для боротьби з бактеріальними інфекціями. На даний момент фагопрепарати набувають популярності в фармацевтичній промисловості, оскільки мають ряд переваг над традиційними антибіотиками. Зокрема:

- не викликають резистентності;
- не мають побічних дій;
- діють прицільно на збудник, не шкодячи при цьому нормальній мікрофлорі організму;

Не мають особливих застережень з приводу прийому фагопрепаратів з іншими медичними засобами [3].

Бактеріофаг стрептококовий Cp-1 складається з головки, що має діаметр 45-60 нм, та хвіст довжиною 20 нм, товщиною 15 нм. Вага геному фага складає $12 \cdot 10^6$ Да, що приблизно дорівнює половині ваги всього бактеріофага [4].

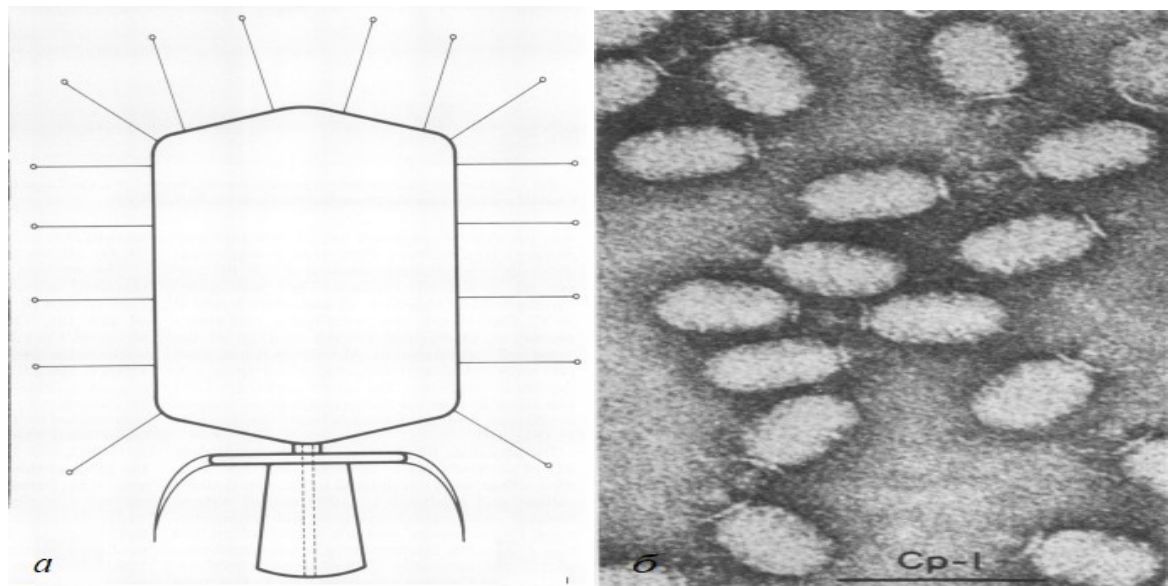


Рис.1.1. Бактеріофаг –Cp-1: а- комп'ютерна модель; б – під електронним мікроскопом [4].

					НУХТ БТЕК 04.01.23. ДП ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Кутрик І.В.			РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	Літ.	Арк.	Аркушів
Консультант							8	103
Керівник		Гудзенко О.В.				Кафедра БТМ 8		
Зав.кафедри		Пирог Т.П.						

Бактеріофаг стрептококовий є імунобіологічним препаратом, що використовується для лікування і профілактики гнійних ушкоджень шкіри, слизових оболонок та для лікування хірургічних та ентеральних інфекцій, викликаних стрептококовими бактеріями.

Діючою речовиною усіх лікарських фагопрепаратів є стерильні фаголізати, що здатні до лізису бактерії-збудника. Основною вимогою до таких препаратів є чутливість мікроорганізму, що спричинив інфекцію до обраного виду фагів, не токсичність для пацієнта, а також використання тільки вірулентних фагів, які лізують клітину мікроорганізму, а не вбудовуються в її генетичний код. Оскільки ми розглядаємо хворобу яка спричинена збудниками бактерій роду *Streptococcus*, то кінцевим продуктом нашого виробництва буде препарат «Бактеріофаг стрептококовий» (рис.1.2)



Рис.1.2. Препарат «Бактеріофаг стрептококовий» [5]

Форма випуску. Бактеріофаг стрептококовий - рідина для внутрішнього, місцевого та зовнішнього застосування, по 20, 50 або 100 мл у флаконах, в ампулах по 10 мл по 10 шт. в упаковці.

Фармакологічна дія. Бактеріофаг стрептококовий – лікарський препарат, що володіє специфічною бактерицидною дією відносно штамів стрептококів, найбільш поширених в етіології гнійних і запальних захворювань. Бактеріофаг стрептококовий специфічно лізує бактерії роду *Streptococcus*. Фагові частки прикріплюються до мембрани чутливих бактерій, проникають всередину клітини і розмножуються за рахунок її ресурсів. Внаслідок цього

відбувається загибель клітини і вихід зрілих фагових частинок, здатних до зараження інших чутливих бактеріальних клітин. Бактеріофаг стрептококовий не впливає на інші бактерії, зокрема не порушує природну мікрофлору.

Діюча речовина. Стерильний фільтрат фаголізатів патогенних штамів бактерій роду *Streptococcus*, допоміжна речовина – хінозол.

Показання для застосування. Лікування і профілактика захворювань викликаних бактеріями роду *Streptococcus* людей і тварин. Даний препарат не викликає побічних реакцій та не має протипоказань до застосування.

Лікарська взаємодія. Бактеріофаг стрептококовий можна застосовувати одночасно з іншими лікарськими препаратами, в тому числі антибіотиками різних груп [5].

РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

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

Виробничі штами бактерій-продуцентів бактеріофагів, виділяють від хворих з гнійно-септичними або кишковими інфекціями і отримують з бактеріологічних діагностичних лабораторій (бажано розташованих в регіонах реалізації та споживання лікувально-профілактичних бактеріофагів). Колекція виробничих штамів бактерій, що використовуються у виробництві бактеріофагів, повинна щорічно оновлюватися.

Промислове виробництво препаратів бактеріофагу здійснюється на основі робочої культури, яку отримують з музейної. В умовах сучасного світу застосування бактеріофагів має місце в медицині, косметології, сільському господарстві, харчовій промисловості та генній інженерії [6].

Оскільки метою культивування є отримання стрептококового бактеріофагу для застосування в медицині, то для порівняння було взято бактеріофаг Ср-1, і бактеріофаг HN48, що здатні до лізису бактерій роду *Streptococcus*. Клітинами-хазяїнами цих бактеріофагів є *Streptococcus pneumoniae* та *Streptococcusagalactiae* відповідно. Для вибору ефективнішого біологічного агента порівняємо показники синтезу бактеріофагів двома зазначеними продуцентами (таблиця 2.1).

					НУХТ БТЕК 04.01.23. ДП ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.	Кутрик І.В.				Літ.	Арк.	Аркушів
Консультант						11	103
Керівник	Гудзенко О.В.				Кафедра БТМ 11		
Зав.кафедри	Пирог Т.П.						
					РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА		

Поживні середовища для культивування *Streptococcus pneumoniae*R36A та *Streptococcus agalactiae*SS130920 з метою одержання бактеріофагів

Біологічний агент	Склад поживного середовища, г/л	Концентрація цільового продукту, БУО/л	Тривалість культивування год	Особливості біосинтезу	Використана література
<i>Streptococcus pneumoniae</i> R36A, фаг – Cp-1	Гідролізат казеїну – 10 Триптон – 5 Дріжджовий автолізат – 1 КСІ – 5 Глюкоза – 0,002 K ₂ HPO ₄ - 15	6×10 ⁹	35	37°C pH 7,2-7,8	<i>Concepcion Ronda, Rubenslopez, Ernesto Garcia. Isolation and Characterization of a New Bacteriophage, Cp-1, Infecting Streptococcus pneumoniae // Journal of virology, - 2007, - p. 551-559</i>
<i>Streptococcus agalactiae</i> SS130920 фаг - HN48	Настій яловичого серця – 10 Настій телячих мізків – 7,5 Глюкоза – 10 Пептон – 10 K ₂ HPO ₄ – 2,5 NaCl - 5	5,8×10 ⁸	35	pH 7,4±0,2 37°C	<i>Jumpei Uchiyama, Hidehito Matsui, Hironobu Murakami et al. Potential Application of Bacteriophages in Enrichment Culture for Improved Prenatal <i>Streptococcus agalactiae</i> Screening // Journal List, Viruses, - 2018, - Vol. 10, - P. 552</i>

Оскільки час культивування продуцентів однаковий (35 год), особливу увагу приділяємо кількості бактеріофага в кінці культивування. Так для *S. agalactiae*SS130920 цей показник становить 5,8×10⁸ БУО/мл, в той час як для *S. pneumoniae*R36A - 6×10⁹ БУО/мл. Також особливої різниці в умовах культивування не спостерігається.

Зазначимо, що склад поживних середовищ для даних біологічних агентів суттєво відрізняється, тому вважаємо показник кінцевої кількості бактеріофага недостатнім для вибору кращого продуцента.

Тож на наступному етапі розраховуємо вартість поживних середовищ для культивування обраних штамів. Для виконання цієї задачі користувались цінами на сайтах українських постачальників станом на березень 2019 року.

2.2. Розрахунок складу поживного середовища

Таблиця 2.2

Вартість поживних середовищ для культивування *Streptococcus pneumoniae*R36A та *Streptococcus agalactiae*SS1309

20

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1л середовища	Джерело (1,2,3)*
<i>Streptococcus pneumoniae</i> R36A	Гідролізат казеїну - 10	200	2	2
	Триптон - 5	243	1,215	2
	Дріжджовий автолізат – 1	979,33	0,979	3
	КСІ - 5	14,65	0,07325	1
	Глюкоза – 0,002	65	0,00013	1
	К ₂ НРО ₄ – 15	187	2,8	1
	Вартість 1л поживного середовища становить 7,07 грн			
<i>Streptococcus agalactiae</i> SS130920	Настій телячих мізків – 7,5	652	4,89	2
	Настій яловичого серця – 10	585	5,85	2
	Глюкоза – 10	65	0,65	1
	Пептон – 10	200	2	2
	К ₂ НРО ₄ – 2,5	187	0,4675	1
	NaCl - 5	5,20	0,026	1
	Вартість 1л поживного середовища становить 13,9 грн			

Примітка: * - ціни наведено з урахуванням ПДВ станом на травень 2020 року: 1 – <http://www.prom.ua>; 2 – <http://www.alibaba.ua>; 3 – <http://www.euroimpex.net.ua>

Так, вартість поживного середовища для *S. agalactiae*SS1309290 становить 13,9 грн, коли поживне середовище для культивування *S. pneumoniae*R36A коштує лише 7,07 грн.

Вже два фактори вказують, що кращим біологічним агентом є *S. pneumoniae*R36A, та ми зведемо ці дані в одну таблицю для наочного ознайомлення.

Біологічний агент	Вартість 1л середовища	Концентрація бактеріофага, БУО/мл	Умовна вартість цільового продукту, грн/БУО	Тривалість культивування	Концентрація насинтезованого бактеріофагу за 1 год, БУО/мл
<i>Streptococcus pneumoniae</i> R36A, фаг – Cp-1	7,07	6×10^9	$1,18 \times 10^{-9}$	35	17×10^7
<i>Streptococcusagalactiae</i> SS130920, фаг – HN48	13,9	$5,8 \times 10^8$	$2,4 \times 10^{-8}$	35	16×10^6

Розрахувавши в даній таблиці умовну вартість цільового продукту та концентрацію цільового продукту насинтезованого за 1 год, можемо з впевненістю сказати, що *S. pneumoniae*R36A є кращим продуцентом ніж,*S. agalactiae*SS130920.

Умовна вартість цільового продукту для обраного біологічного агента становить $1,18 \times 10^{-9}$ грн/БУО з концентрацією синтезованого за 1 год бактеріофага, що становить 17×10^7 БУО/год.

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

Бактерія *S. pneumoniae* має ланцетоподібну або овальну форму, розміром 0,5-1,25 мкм, нерухомі клітини. Грам-позитивні бактерії, характерна наявність товстої полісахаридної капсули, яка виконує захисну функцію (рис. 2.1) [7].

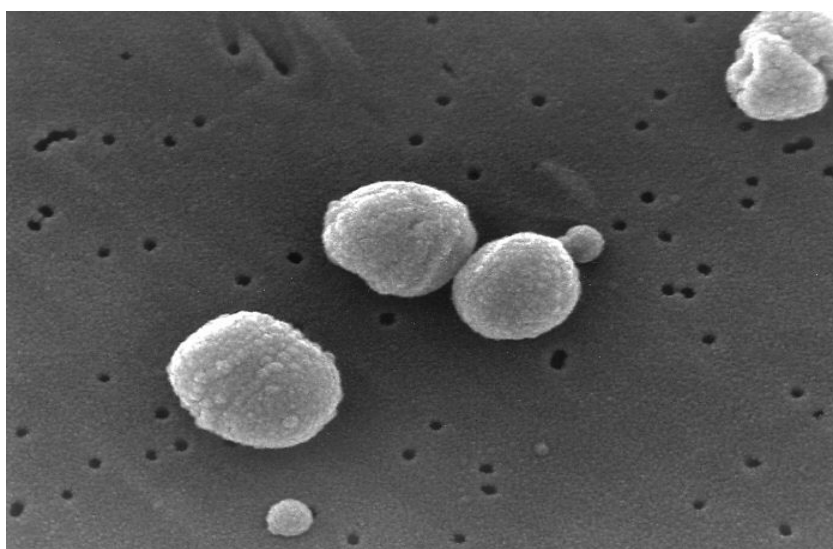


Рис. 2.1. Зображення з електронного мікроскопа *S. pneumoniae*[7].

У площині розміщуються поодинокі, по двоє або короткими ланцюжками, не утворюють спор. Всі види *Streptococcus* виділяють пігменти і залежно від середовища на якому вони ростуть, змінюють колір середовища і колоній від блідо-сірого до зелено-жовтого і блідо-рожевого відтінків.

S.pneumoniae розмножуються й ростуть в середовищах, що містять 0,5% глюкози і 5% крові тварин. На МПА утворюють дрібні прозорі колонії з голубим відтінком, на МПБ – помутніння, на сироватковому агарі з'являються дрібні прозорі колонії, що нагадують крапельки роси.

Колонії свіжовиділених культур диплококів на кров'яному агарі дрібні, круглі, прозорі, оточені зоною гемолізу (рис. 2.2(а,б)) [7].

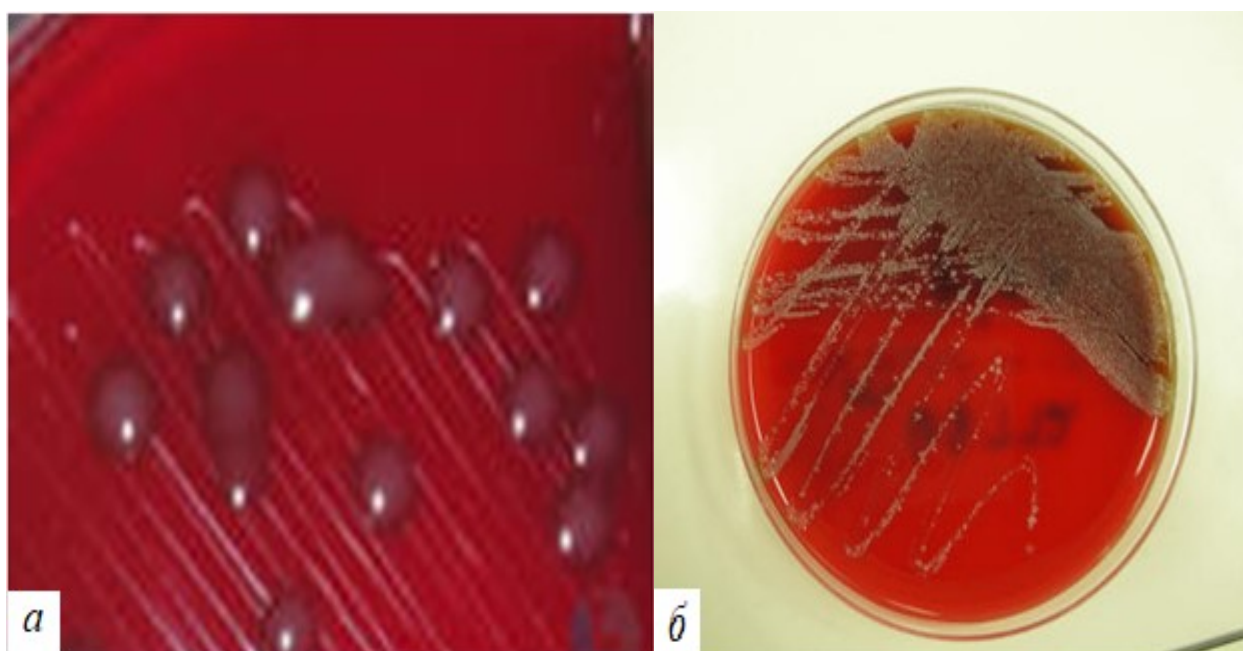


Рис. 2.2. Колонії *S. pneumoniae*: а - на сироватковому середовищі; б – на кров'яному агарі [7].

S.pneumoniae являється факультативним анаеробом, розмножується при 28-42°C, оптимум - 37°C. Для нормальної життєдіяльності є нейтральні значення рН 7,2–7,8, але оскільки в процесі життєдіяльності бактерій середовище може змінюватись, то значення рН може варіювати в межах 5,2-8,0.

За типом живлення даний представник стрептококів хемоорганотроф, який потребує додаткових факторів росту, наприклад вітамінів. В якості джерела вуглецю використовують глюкозу, лактозу, сахарозу, мальтозу, манніт [8].

Також варто відзначити стійкість даного виду до різного типу антибіотиків. В останні роки відзначається зростання резистентності *S. pneumoniae* до антибактеріальних засобів у багатьох країнах. В Азії число пневмококів, резистентних до пеніциліну становить близько 47%, в Північній Америці - 46%, в Південній Америці трохи нижче - 35%, в Європі - 19%. У Європі поряд з країнами з високим рівнем стійкості (Іспанія - 38%, Португалія - 18%) є держави, де частка пеніцилінорезистентних пневмококів залишається низькою (Німеччина, Ісландія і Нідерланди - 2, 2 і 1% відповідно). Масштабних досліджень поширення резистентності пневмококів до пеніциліну в Росії і Україні не проводилося [9].

2.4. Таксономічний статус

Рід *Streptococcus* був описаний в 1884 році і є одним з найбільш поширених і різноманітних серед інших бактерій. Представники цього роду були виділені з принципово різних зон існування, від Антарктики і до тропіків, були присутні у зразках рослин, грибів, тваринних рештках, воді, ризосфері і т.д.

Класифікація бактерій пов'язана з іменем відомого американського бактеріолога Девіда Бергі, який у 1923 році опублікував «Керівництво Бергі з систематики бактерій». У цій роботі була наведена фенотипова класифікація усіх відомих на той час бактерій. Цей метод ґрунтувався на класифікації прокариот за морфологією і структурою клітин, складом клітинної стінки, пігментами, що є в клітині, типом метаболізму, продукції антибіотиків, патогенністю до тих чи інших організмів, антигенними структурами, генетичними і екологічними характеристиками.

Класифікація *S. pneumoniae* за Бергі:

Царство - *Bacteria*

Тип - *Firmicutes*

Клас - *Bacilli*

Порядок - *Lactobacillales*

Родина - *Streptococcaceae*

Рід - *Streptococcus*

Вид - *pneumonia*

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

3.1. Потреба у цільовому продукті

В останні роки спостерігається тенденція антибіотико-резистентних штамів мікроорганізмів як збудників ранової хірургічної інфекції, що значно ускладнює пошук ефективних шляхів лікування, особливо якщо пацієнти мають полівалентні алергічні реакції на антибіотики. Нами запропонований спосіб лікування такої групи пацієнтів з використанням бактеріофагів.

Проблема лікування гнійних ран м'яких тканин до теперішнього часу залишається далекою від остаточного вирішення. Впродовж останніх десятиріч відмічені значні досягнення в вивченні закономірностей перебігу ранозагоєння, але це не призвело до суттєвого зменшення кількості хворих з запально-гнійними ураженнями м'яких тканин.

На теперішній час пацієнти із запально-гнійними захворюваннями складають 35-40% від кількості хворих загальнохірургічного профілю. Не зменшується і летальність при гнійній інфекції.

Переважання ролі умовно-патогенних мікроорганізмів у розвитку загально-гнійних уражень м'яких тканин призвело до зниження ефективності лікування і створило труднощі в підборі лікувальних препаратів.

Природна резистентність до антибіотиків не зникає, і бактерії поступово вдосконалюють механізми резистентності виробляючи фактори захисту від нових груп антибіотиків. Антибіотики створюють селективний фон для поступового поширення стійких до них штамів мікроорганізмів [10].

Крім того, на сьогодні гостро стоїть питання альтернативи антибіотикотерапії хворим, що страждають полівалентною алергією до антибактеріальних препаратів.

Одним із варіантів вирішення цієї проблеми, є можливість використання бактеріофагів.

					НУХТ БТЕК 04.01.23. ДП ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Кутрик І.В.			Літ.	Арк.	Аркушів
Консультант						17	103
Керівник		Гудзенко О.В.			Кафедра БТМ 17		
Зав.кафедри		Пирог Т.П.					

Лікувально-профілактичні бактеріофаги містять поліклональні вірулентні бактеріофаги широкого спектру дії, активні, в тому числі, і щодо бактерій, стійких до антибіотиків. Відмічено, що фаготерапія може успішно поєднуватися з призначенням антибіотиків у комплексному лікуванні запально-гнійних уражень м'яких тканин [11].

Тому в сучасних умовах збільшилось число праць [12,13] з експериментального та клінічного застосування бактеріофагів. Важливо зазначити про широкий спектр переваг бактеріофагів над антибіотиками (таб. 3.1) [14].

Таблиця 3.1

Порівняльні можливості терапії фагами та антибіотиками

Бактеріофаги	Антибіотики
Фаги бактерицидні і високоефективні по відношенню до клітин-мішеней	Багато антибіотиків бактериостатичні, тобто блокують зростання бактерій в більшій мірі, ніж знищують їх
Специфічність фага вимагає ідентифікації збудника для вибору терапевтично активного фага Можливе призначення полікомпетентного препарату для визначення фагочутливості	Антибіотики необхідно призначати після виявлення резистентності збудника до препарату
Фаги розмножуються в клітинах-мішенях до моменту загибелі клітини, після чого виводяться з організму	Метаболізуються в організмі, після чого виводяться. Абсолютної концентрації в бактеріях немає
Фармакокінетика фагів оригінальна: ініціальна доза при наявності бактерій-мішеней збільшується експоненціально до тих пір, поки існують бактерії-мішені. При їх наявності немає необхідності в додатковому введенні специфічних бактеріофагів	Для лікування хвороби потрібно повторне введення антибіотика
Висока специфічність бактеріофагів дозволяє їм впливати на клітину-мішень, не змінюючи мікрофлору людини	Антибіотики надають бактерицидний або бактериостатичний ефект на мікрофлору людини
Специфічність фагів не дозволяє формувати стійкість до фагів у інших збудників	Широкий спектр антимікробної активності антибіотика може бути причиною стійкості багатьох патогенів
Людина контактує з фагами протягом усього життя, але побічних ефектів не описано	При контакті з антибіотиками описані алергія, шлунково-кишкові розлади, вторинні грибкові інфекції
Поширеність фагів - причина того, що селекція нових фагів, специфічних до раніше стійкої флори, займає тижні/дні	Створення нових форм антибіотиків проти резистентних форм мікроорганізмів займає декілька років
Фаги можна розглядати як альтернативу антибіотиків при сенсibiliзації пацієнта	Алергія на антибіотик істотно ускладнює вибір препарату

Зважаючи на перспективність та ефективність використання бактеріофагів в медицині пропонуємо розглянути можливість забезпечення медичного ринку України стрептококовим бактеріофагом для попередження розвитку запально-гнійних уражень м'яких тканин. Оскільки в Україні відсутнє виробництво бактеріофагів (даний препарат імпортується з Росії), враховуючи складні політичні відносини між Росією та Україною стратегічно важливо для нашої держави мати власне виробництво даного препарату.

Аналізуючи статистичні дані [15] в яких вказано, що на кожні 10 тис. населення в рік проводиться 481,63 оперативних втручань. Тож для населення України, яке становить 42 млн осіб, ця цифра становитиме приблизно 2 млн.

Враховуючи літературні дані зазначимо, що при застосуванні антибіотиків, резистентність до них або алергічна реакція проявляється від 0,1% до 10% випадків. Для зручності розрахунків приймемо середнє значення – 5%.

$$2\,000\,000 \times 5\% = 100\,000 \text{ осіб}$$

У цих випадках лікар повинен призначити альтернативне лікування, для 10% пацієнтів це буде використання стрептококового бактеріофагу.

$$100\,000 \times 10\% = 10\,000 \text{ осіб}$$

3.2. Розрахунок потужності виробництва

Препарат використовують місцево у вигляді зрошень, примочок, аплікацій (на вогнище запалення два рази на день накладають марлеву серветку (пов'язку), змочену препаратом бактеріофага), а також промивання дренажів не менше 1 разу на день в дозі від 20 до 40 мл протягом 10 днів. При абсцесах бактеріофаг вводять у порожнину вогнища після видалення гною за допомогою пункції. Приймемо середню дозу для пацієнта – 80 мл в день (зовнішньо).

$$10\,000 \text{ осіб} \times 10 \text{ днів} \times 0,08 \text{ л} = 8000 \text{ л}$$

Враховуючи ці статистичні дані отримуємо потребу в бактеріофазі стрептококовому в розмірі 8 тис. л в рік.

3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів

Враховуючи загальну кількість культуральної рідини необхідної на рік, розрахуємо скільки культуральної рідини потрібно отримати за цикл ферментації.

Приймаємо кількість робочих трудоднів ($T_{рд} = 70$). Тоді кількість культуральної рідини за цикл ($V_{ц}$) становитиме:

$$V_{цк} = V_{нт} \cdot T_{цф} / (T_{рд} \cdot 24) = 8000 \cdot 41,5 / (70 \cdot 24) = 197,6 \text{ л}$$

де $V_{нт}$ – кількість потрібної культуральної рідини, $T_{цф}$ – цикл роботи ферментера, який складається з тривалості виробничого біосинтезу (35 год) та часу підготовчих операцій (6,5 год), $T_{рд}$ – кількість трудоднів.

Підготовчі операції: миття та огляд (1,5 год), перевірка на герметичність (0,5 год), підігрів апарату (0,5 год), стерилізація (1 год), охолодження (0,5 год), завантаження середовища (1,5 год), засів (0,5 год), вивантаження культуральної рідини (0,5 год).

Визначаємо кількість виробничих циклів на рік:

$$N_{ц} = V_{нт} / V_{цк} = 8000 / 197,6 = 41 \text{ цикл,}$$

Кількість культуральної рідини за цикл з урахуванням втрат, л:

$$V_{кр} = K_1 \cdot V_{ц} / (1 - E_{св}) = 1,1 \cdot 197,6 / (1 - 0,2) = 271,7 \text{ л}$$

Такий об'єм культуральної рідини (271,7 л) можна отримати у ферментері з геометричним об'ємом:

$$V_{гф} = V_{кр} / K_3 = 271,7 / 0,6 = 452,8 \text{ л,}$$

де K_3 – коефіцієнт заповнення ферментера ($K_3 = 0,6$), що обирається в межах 0,5 – 0,7.

У ГОСТ 20680–2002 знаходимо ферментер номінальним об'ємом $V_{нф} = 500$ л.

За виробничий цикл отримують $V_{кр} = 271,7$ л культуральної рідини.

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом (з урахуванням втрат в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря (10%)) становитиме:

$$V_{\text{роб.1}} = \frac{V_{\text{кр}}}{1 - E_{\text{ф}}} = \frac{271,7}{1 - 0,1} \approx 302 \text{ л}$$

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

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері з робочим об'ємом $V_{\text{роб.1}} = 302 \text{ л}$.

При вибраному коефіцієнті заповнення $K_{\text{зап}} = 0,6$ можливий геометричний об'єм ферментера $V_{\text{ф.1}} = 302/0,6 = 503 \text{ л}$. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{сф}} = 500 \text{ л}$ та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап.1}} = \frac{V_{\text{роб.1}}}{V_{\text{сф}}} = \frac{302}{500} = 0,6$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах.

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.

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

В такому разі кількість поживного середовища у ферментері становитиме:

$$V_{\text{пс1}} = \frac{V_{\text{роб.1}}}{1 + X_{\text{ф}}} = \frac{302}{1 + 0,1} = 275 \text{ л}$$

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

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить:

$$V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб.1}} - V_{\text{пс1}} = 302 - 275 = 27 \text{ л}$$

Для одержання 27 посівного матеріалу кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі (з урахуванням втрат в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря) становитиме:

$$V_{\text{роб.3}} = \frac{V_{\text{пм2}}}{1 - E_{\text{ін}}} = \frac{27}{1 - 0,1} = 30 \text{ л}$$

Можливий геометричний об'єм інокулятора $V_{\text{ін.}} = 30/0,6 = 50$. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{сф}} = 50 \text{ л}$ та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап.3}} = \frac{V_{\text{роб.3}}}{V_{\text{сін}}} = \frac{30}{50} = 0,6$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах.

Кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{псз}} = \frac{V_{\text{роб.з}}}{1 + X_{\text{ін}}} = \frac{30}{1 + 0,1} = 27$$

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{\text{пмз}} = V_{\text{роб.з}} - V_{\text{псз}} = 30 - 27 = 3 \text{ л}$$

Для одержання 3 л посівного матеріалу використовують качалочні колби об'ємом 750 мл та коефіцієнтом заповнення 0,2. Кількість колб становитиме:

$$N_{\text{колб}} = \frac{V_{\text{пмз}}}{V_{\text{колб}} \times K_{\text{зк}}} = \frac{3000}{750 \times 0,2} = 20 \text{ шт.}$$

Таким чином, для одержання посівного матеріалу необхідно 20 качалочних колб.

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу бактеріофагу у ферментері об'ємом 500 л з коефіцієнтом заповнення 0,6 буде проходити у два етапи.

РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

Оскільки бактеріофаги є неклітинними формами існування, тому як цільовий продукт ми розглядаємо біомасу клітин *S.pneumoniae*.

До складу поживного середовища для росту клітин входить триптон, дріжджовий екстракт та гідролізат казеїну. Джерелами вуглецю у даному випадку виступає гідролізат казеїну. Як одна так і інша речовина в основному складається з амінокислот, які виступають джерелом усіх необхідних компонентів для росту мікроорганізмів, зокрема *S.pneumoniae*.

У базі KyotoEncyclopediaofGenesandGenomes підбираємо штам *Streptococcus pneumoniae*R36A.

До складу гідролізату казеїну входять амінокислоти у невизначеному співвідношенні. Деякі амінокислоти відразу залучаються на побудову клітин, а частина з них за допомогою ферментів розщеплюється до певних метаболітів і використовуються клітиною.

Для того, щоб утворилася біомаса бактерій *Streptococcus pneumoniae*R36A, необхідним є синтез попередників усіх її складових: білків, що є одним із основних компонентів клітини, так званим «будівним матеріалом» та являють собою ферменти; ліпідів, що використовуються клітиною для побудови клітинної стінки та беруть участь у енергетичному обміні; пептидоглікану, який являє собою полісахарид, що бере участь у побудові клітинної стінки а зовнішньої мембрани; та нуклеїнових кислот: РНК – беруть участь у синтезі білка, ДНК виступає носієм генетичної інформації.

Під час використання амінокислот у якості джерела вуглецю, у клітині функціонують такі основні метаболічні шляхи, які необхідні для утворення попередників клітинних компонентів: глюконеогенез (утворення глюкози та її похідних для конструктивного метаболізму), ЦТК (джерело НАДН для

					НУХТ БТЕК 04.01.23. ДП ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Кутрик І.В			Літ.	Арк.	Аркушів
Консультант						23	103
Керівник		Гудзенко О.В.			Кафедра БТМ 23		
Зав.кафедри		Пирог Т.П.					

дихального ланцюга та інтермедіатів, які є попередниками багатьох амінокислот), пентозофосфатний цикл (джерело НАДФН і рибози для конструктивного метаболізму), біосинтез пуринових та піримідинових нуклеотидів та біосинтез ароматичних амінокислот.

Такі амінокислоти як: валін, ізолейцин, лейцин, тирозин, метіонін, що входять до складу розтового субстрату не засвоюються клітинами *Streptococcus pneumoniae* R36A через відсутність необхідних ферментів.

У свою чергу аланін, цистеїн, пролін та серин прогочаючи ряд реакцій каналізованих ферментами перетворюються на один із ключових інтермедіатів – піруват, що у свою чергу залучається до циклу три карбонових кислот. Ключовим ферментом у катаболізмі цистеїну та проліну виступає аспартатамінотрансфераза (КФ.2.6.1.1.). Перетворення серину відбувається за рахунок сериндегідратази (КФ.4.3.1.17), а аланіну за рахунок аланінтрансамілази (КФ 2.6.1.2).

Такі амінокислоти як лізин, триптофан та фенілаланін перетворюються на Ацетил-Ко-А, що залучається до ЦТК. Ключовим ферментом для перетворення фенілаланіну є фенілацетил-КоА-лігаза (КФ 6.2.1.30), триптофану – ацетил-КоА-ацетилтрансфераза (КФ. 2.3.1.9)

Аспартат під дією аспартатамінотрансфераза (КФ.2.6.1.1.) переходить у оксалоацетат і також залучається до ЦТК. У свою чергу ключовим ферментом у перетворенні треоніну на 2-оксоглутарат виступає L-треоніндегідратаза (КФ 4.3.1.19). Гістидин переходить у 5-фосфорибозил-1-дифосфат, що залучається у пентозофосфатний цикл, під дією ферменту фосфорибозилтрансфераза (КФ. 2.4.2.17).

Оскільки у середовищі відсутня глюкоза, мікроорганізму необхідно синтезувати глюкозу та її похідні для здійснення конструктивного метаболізму, ці перетворення здійснюють шляхом глюконеогенезу. Ключовими ферментами якого є : фосфоенолпіруваткарбоксилаза (КФ. 4.1.1.49), гексозодифосфатаза (КФ 2.7.1.11), глюкозо- 6-фосфат (КФ. 5.3.1.9).

РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

5.1 Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу

5.1.1. Обґрунтування способу культивування та типу ферментера

Оскільки фаг Ср-1, як і інші віруси є облігатним ендопаразитом то спосіб культивування підбирається під клітину-хазяїна, у даному випадку це *Streptococcus pneumoniae*R36A. Дана культура – анаеробна, тож для її культивування необхідно забезпечити подачу інертного газу, що здійснюється в ферментаторі з допомогою барботеру.

Оскільки температура для культивування *S.pneumonia*R36A становить 37°C, а рН підтримується на нейтральному рівні, є ризик контамінації середовища сторонніми нейтрофільними та мезофільними мікроорганізмами, з чого робимо висновок про необхідність проведення стерилізації обладнання і комунікацій, інертного газу та поживного середовища. Також для запобігання контамінації в посівних апаратах та ферментаторі створюється надлишковий тиск.

Культивування *S. pneumonia*R36A для накопичення біомаси проводиться глибинним методом, оскільки цей метод має ряд переваг над поверхневим. Він дозволяє виключити непродуктивну ручну працю, скоротити виробничі площі, спростити механізм культивування, а також автоматизувати процес. Зазначимо, що при глибинному способі культивування поживні речовини середовища використовуються раціональніше, що дає можливість в певній мірі скоротити відходи виробництва у вигляді нерозчинних осадів твердого поживного середовища. Для культивування ми застосовуємо рідке поживне середовище, в якому джерелами вуглецю є гідролізат казеїну, а азоту – триптон.

					НУХТ БТЕК 04.01.23. ДП ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.	Кутрик І.В				Літ.	Арк.	Аркушів
Консультант						25	103
Керівник	Гудзенко О.В.				Кафедра БТМ 25		
Зав.кафедри	Пирог Т.П.						
					РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ		

При глибинному культивуванні можливе забезпечення як безперервного так і періодичного процесу. Зазначимо, що у безперервних процесах продуценти завжди підтримуються в експоненційній фазі росту. Оскільки бактеріофаг накопичується та лізує клітини у стаціонарній фазі росту ми використовуємо періодичне культивування як більш доцільне у даному конкретному випадку.

Узагальнюючи наведені вище дані зазначимо що культивування фагу Ср-1 клітиною-хазяїном *S. pneumonia*R36A проводиться періодичним глибинним способом на рідкому поживному середовищі в стерильних умовах з постійною подачею інертного газу [15].

Вибираючи ферментаційне обладнання враховуємо характеристики описані у попередньому підрозділі.

Даний тип культивування (глибинне культивування) проводиться у ферментерах, основними вимогами до яких є можливість проведення процесу в асептичних умовах за інтенсивного масообміну та подачею інертного газу всередину біореактора. Для культивування *S. pneumonia*R36A необхідною є подача інертного газу в середовище, оскільки бактерії є факультативними анаеробами. У зв'язку з цим варто використовувати ферментер оснащений барботером, який буде забезпечувати культуру необхідною кількістю інертного газу.

Оскільки ферментація має проходити при нейтральному значенні рН, то для забезпечення контролю за цим показником ферментер повинен бути оснащений датчиком, який відображає значення рН.

Для інтенсифікації масообміну та підвищення розчинення кисню всередині ферментера (рис 5.1) повинен бути встановлений перемішувачий пристрій. Зважаючи на те, що в процесі культивування не утворюється міцелій, не відбувається накопичення метаболітів, не злипається біомаса, даний процес не вимагає дуже інтенсивного масообміну. Зважаючи на це пропонується використовувати найдешевшу та найпростішу за конструкцією мішалку – лопатеву (зі стандартною кількістю лопатей – 6 шт.). Оскільки

притепломасообмінні можуть утворюватись воронки, необхідно обладнати ферментер відбивними перегородками (4 шт.).

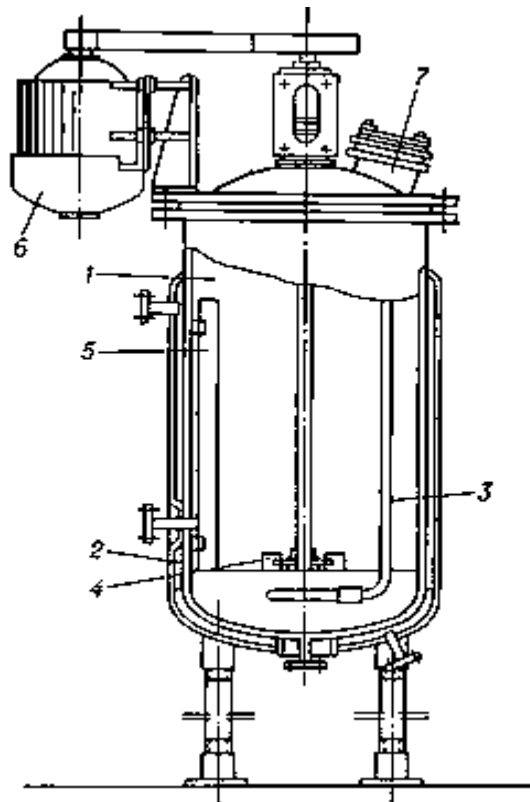


Рис. 5.1. Ферментер з лопатевою мішалкою [15].

1 - корпус; 2 – парова сорочка; 3-барботер;4 -мішалка; 5 – відбивнаперегородка; 6 - двигун; 7 –загрузочний люк.

5.1.2. Обґрунтування вибору стадій підготовки інертного газу

Основною вимогою до інертного газу, що буде надходити до ферментера, це відсутність сторонньої мікрофлори та механічних домішок.

В ферментер має бути безперервна подача очищеного стерильного інертного, так як штам мікроорганізму ми будемо вирощувати глибинним способом. Інертний газ, який буде подаватися в ферментер, відводить газоподібні продукти обміну і тепло яке утворюється в період культивування та створює для мікроорганізму анаеробні умови культивування.

В процесі культивування, інертний газ що подається в ферментер, має бути очищений на 99,9999 % від мікроорганізмів розміром до 1 мкм та механічних домішок.

Оскільки весь процес виробництва бактеріофагу займає лише 70 трудоднів, буде економічно не вигідно ставити генератор інертного газу – азоту.

Тому прийнято рішення, забезпечення процесу культивування азотом буде здійснюватись постачанням на виробництво інертного газу в спеціальних резервуарах. Очищення інертного газу буде відбуватись на фільтрах грубого та тонкого очищення та безпосередньо на індивідуальних фільтрах перед входом в ферментер.

5.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

Планувати допоміжні стадії виробництва необхідно враховуючи особливості культивування продуцента стрептококового бактеріофагу Cp-1 *Streptococcus pneumoniae*R26A. Зважаючи на те, що оптимальними умовами росту для штаму R26A є температура 37°C та нейтральне значення рН (6,8-7,0), процес культивування має проходити в асептичних умовах, щоб мінімізувати ризик контамінації сторонньою мезофільною мікрофлорою.

Виробництво стрептококового бактеріофагу Cp-1 *S. pneumoniae*R26A здійснюється упродовж 70 днів (див. розділ 3), що передбачає підготовку такого обладнання: ферментер об'ємом 500 л, 2 збірники по 150 л, інокулятор об'ємом 50 л, 2 збірники по 50 л, качалки, а також бокс та лабораторне устаткування.

Отже, виробництво включатиме наступні цехи: цех виробничого біосинтезу, качалочна кімната, лабораторія, де знаходяться холодильники, термостати, бокс, автоклав, сухо жарові шафи, рН-метр, ФЕК та ваги для приготування поживних середовищ. Відстань між стінами та апаратами становить 1,0 - 1,5 метра. Ширина проходів між ємнісними апаратами складає 1 метр. На *рис. 5.2* наведено приблизний план приміщення.

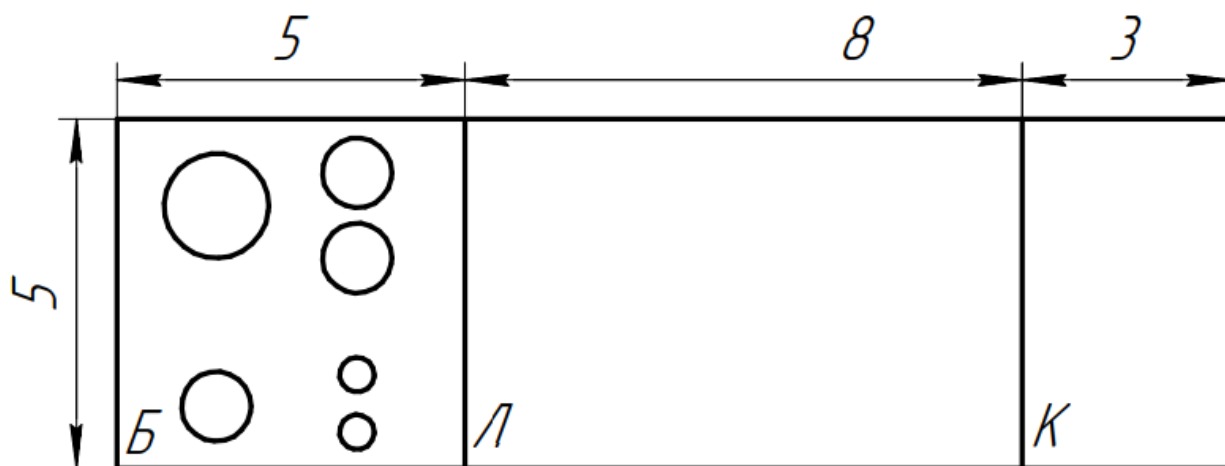


Рис. 5.2. План виробничого приміщення для ділянки біосинтезу стрептококового бактеріофагу Cp-1 *S. pneumoniae*R26A

Б – цех виробничого біосинтезу;

К – приміщення з качалками;

Л – лабораторія.

Таблиця 5.1

Габаритні розміри основного обладнання для виробництва стрептококового бактеріофагу

Обладнання	Геометричний об'єм, л	Діаметр, см	Висота, см
Ферментер	500	64	160
Реактор-змішувач для приготування середовища для виробничого біосинтезу	150	40	120
Реактор-змішувач для приготування середовища для виробничого біосинтезу	150	40	120
Реактор-змішувач для приготування середовища для біосинтезу інокуляту	50	30	75
Реактор-змішувач для приготування середовища для біосинтезу інокуляту	50	30	75
Інокулятор	50	30	75
Всього	950		

Примітка*. Дані з сайту <https://bio-rus.ru>

За даними *табл. 5.1.*, загальний об'єм реакторів-змішувачів та апаратів для вирощування посівного матеріалу і виробничого біосинтезу становить 950 л.

Для підтримання чистоти в виробничих приміщеннях підлогу необхідно мити кожного дня, тобто 70 разів. Обробка стін, вікон та підлоги,

тобто генеральне прибирання здійснюється щомісячно, відповідно 3 раз. Необхідно розрахувати кількість миючих засобів. Для цього розраховуємо приблизну площу оброблення мийними та дезінфікуючими засобами, враховуючи площу підлоги виробничого приміщення та площу стін на висоту 2,5 м.

Оптимальна площа підлоги цеху виробничого біосинтезу становить 25 м² (5×5 м), площа стін – $5 \times 2,5 \times 4 = 50 \text{ м}^2$, загальна площа – $25 + 50 = 75 \text{ м}^2$.

Загальна площа поверхні обробки миючими засобами наведена в *табл. 5.2*.

Таблиця 5.2

Розрахунок загальної площі стін та підлоги виробничих приміщень

Приміщення	Площа підлоги, м²	Площа стін, м²	Загальна площа, м²
Цех виробничого біосинтезу	25	50	75
Лабораторія	40	65	105
Приміщення з качалками	10	35	45
Загальна площа	75	150	225

Кількість виробничих циклів для синтезу бактеріофагу становить 41. Оскільки миття обладнання відбувається перед кожним циклом, кількість процесів миття за весь період виробництва складає 42 (додакове миття після останнього циклу). Тоді загальний об'єм миття становитиме:

$$0,95 \times 42 = 39\,900 \text{ л} = 39,9 \text{ м}^3$$

Узагальнені дані щодо розрахунку площі миття та/або дезінфекції за весь період виробництва наведено в *табл. 5.3*.

Розрахунок загальної площі миття та/або дезінфекції оброблюваного об'єкту за весь період виробництва бактеріофагу Ср-1

Об'єкт миття та/або дезінфекції	Площа (об'єм) оброблюваного об'єкту, м ² (л)	Кількість процесів миття та/або дезінфекції за весь період виробництва	Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м ² (м ³)
Обладнання	0,95	42	39,9
Підлога	80	70	5600
Стіни, двері, вікна	150	3	450

Для того, щоб забезпечити чистоту приміщень, запобігти контамінації, що може виникнути в результаті потрапляння сторонніх мікроорганізмів від персоналу та об'єктів навколишнього середовища, слід проводити миття обладнання та дезінфекцію поверхонь виробничого приміщення.

Щоб обрати мийні та дезінфікуючі засоби, необхідно врахувати їх вартість та витрати на обробку потрібної площі виробничого приміщення. На 1 м² підлоги та стін витрачається приблизно 100 мл робочого розчину дезінфікуючого засобу [16]. Засоби варто застосовувати з інтервалом в 3 місяці для запобігання розвитку стійких штамів мікроорганізмів. Тому вибираємо 2 миючих засоби для послідовної заміни один одним кожного місяця.

Ємнісне обладнання миють автоматичною мийкою СІР, при цьому витрати мийного засобу складають 20% від загального об'єму обладнання. Враховуючи це, для миття обладнання необхідно:

$$39,9 \times 0,2 = 7,8 \text{ м}^3 \text{ мийного засобу на рік.}$$

Загальна площа підлоги, стін, дверей та вікон для миття складає:

$$5600 + 450 = 6050 \text{ м}^2$$

Враховуючи те, що необхідно передбачити здатність мікроорганізмів утворювати резистентність до дезінфікувальних засобів, дані миючі засоби рекомендовано змінювати кожні 3 місяці. Мийні засоби для

обладнання здебільшого відрізняються від таких для стін та підлоги, тож нам необхідно обрати по 2 мийні засоби для кожного типу поверхонь.

Вартість концентратів мийних та дезінфікувальних засобів та їх витрати при виробництві наведено в *табл. 5.4*.

Узагальнена характеристика витрат мийних та дезінфікувальних засобів для виробництва бактеріофага стрептококового

Назва мийного/дезінфікувального засобу	Об'єкт миття та/або дезінфекції	Концентрація робочого розчину, %	Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м ² (л)	Кількість робочого розчину за весь період виробництва, л	Вартість 1 л/кг мийного або дезінфікувального засобу, грн.	Вартість 1 л робочого розчину	Загальна вартість миття та/або дезінфекції за весь період виробництва, грн
NeomoscanCPalk a 160	Обладнання,	0,5-10	39900	7800	245	2,45	19 110
NeomoscanCPacid 300	Обладнання,	0,5-2,5	39900	7800	245	2,45	19 1100
Гембар	Стіни, підлога, вікна, двері	0,1	6 050	605	1680	1,7	1 028,5
Хлорантоїн	Стіни, підлога, вікна, двері	0,2	6 050	605	230	0,46	278,3

Примітка. Ціни наведено станом на травень 2020 р.: <https://prom.ua>

***Приклад розрахунку вартості 1 л робочого розчину мийного засобу «NeomoscanCPalka 160»:** Вартість 1 л засобу складає 245 грн, концентрація його робочого розчину – 2 %, що говорить про те, що в 1000 мл робочого розчину – 20 мл (0,02 л) концентрату. Отже, $245 \times 0,01 = 2,45$ грн/л робочого розчину. Аналогічно розраховують вартість 1 л робочого розчину для решти миючих засобів.

Отже, проаналізувавши *таблицю 5.4.*, для миття обладнання доцільно буде використовувати миючі засіб «NeomoscanCPalka 160» та «NeomoscanCPacid 300» а для миття стін, підлоги, вікон та дверей – «Хлорантоїн», який будемо чергувати з використанням «Гембару» оскільки враховуючи концентрацію даних розчинів, та їх вартість за один літр (кілограм), витрати на їх придбання для всього періоду виробництва становлять найменше.

NeomoscanCPalka 160 - є концентрованим лужним миючим засобом на основі комплексоутворюючих добавок, лугів і тензидов, і володіє такими властивостями: ефективно видаляє органічні забруднення з високим вмістом жирів, масел і білкових з'єднань, а також мазі та креми, володіє емульгуючою і диспергуючою дією, підвищуючи таким чином здатність перешкоджати утворенню відкладень, підходить для розпилення і використання в СІР-мийках завдяки відсутності піноутворення при температурах понад 60 °С може використовуватися на нержавіючої сталі (1.4301, 1.4571) [17].

NeomoscanCPacid 300 - є кислотним миючим засобом на основі фосфорної кислоти і ПАР, і має такі властивості: чудово видаляє мінеральні відкладення і інші розчинні в кислоті відходи виробництва, володіє емульгуючим ефектом, проникає в органічні відкладення і полегшує їх видалення, володіє хорошими грязевловлювальними властивостями, не утворює піни при температурі від 40 °С, не пошкоджує матеріал, може використовуватися на нержавіючої сталі (1.4301, 1.4571) [18].

Хлорантоїн- хлорактивний, багатокомпонентний, поліфункціональний дезінфекційний засіб з миючим ефектом [16]. Хлорантоїн зберігають в упаковці виробника в критих, сухих, провітрюваних приміщеннях, недоступних для загального використання на відстані не менше 1 м від нагрівальних приладів, при температурі від 5°С до 30°С. Засіб повинен бути захищеним від прямих сонячних променів. Ящики і мішки із засобом зберігають на плоских дерев'яних піддонах або піддонах з полімерних матеріалів в штабелях. Висота штабеля не повинна перевищувати 2,5 м. Гарантійний термін зберігання 3 роки з

датовиробництва. При роботі з даним миючим засобом необхідно використовувати засоби особистої безпеки: захисні маски для обличчя та рукавиці [19].

Гембар – препарат для дезінфекції поверхонь, інвентарю і посуду, що належить до класу гуанідинових дезінфектантів, діюча речовина – полігексаметиленгуанідину гідрохлорид. Цей засіб має унікальну здатність – пролонговану знезаражувальну дію. Оброблені Гембаром поверхні зберігають дезінфікуючу здатність тривалий час, що важливо при дезобробці приміщень і обладнання, а нелетучість, нетоксичність діючої речовини дозволяє проводити дезінфекцію в присутності персоналу, хворих. Пролонгована дезінфікуюча дія засобу «Гембару» забезпечує надійну фунгіцидну (протигрибкову) дію. Термін зберігання – 5 років, робочі розчини активні 6 міс; вони не летючі, неагресивні, не призводять до корозії, безпечні при застосуванні [20].

Для забезпечення належної чистоти повітря у виробничих приміщеннях передбачають наявність стельових бактерицидних ламп, які вмикають на 1,5–2 год після проведення генерального прибирання (проводиться раз на тиждень), в попередньо звільнених від персоналу приміщеннях.

Підготовка обладнання та комунікацій складається з таких етапів:

- миття;
- технічний огляд;
- перевірка на герметичність;
- стерилізація.

Миття. Щоб помити ємнісне обладнання обираємо циркуляційну СІР-мийку (Cleaninginplace). Вибір саме такого обладнання зумовлений рядом факторів:

- можливість мити одночасно кілька об'єктів;
- можливість збору води, що використовується для ополіскування;
- автоматичне підтримання температури і концентрації миючого засобу;
- нагрів води в малому контурі економить час, воду та енергію.

Технічний огляд. Після миття та ополіскування обладнання проводять технічний огляд візуально з метою виявлення нещільних з'єднань в комунікаціях та запірній апаратурі на обладнанні. Для усунення цих проблем проводять підтягування різьбових з'єднань.

Перевірка на герметичність. Після миття та технічного огляду проводиться перевірка на герметичність, для цього на апараті закривають усю запірну арматуру і подають інертний газ до набору надлишкового тиску $P = 0,1 - 0,2$ МПа. Перекривають вентиль подачі газу і фіксують покази манометра на кришці апарату та час витримки (30-60 хв). Якщо падіння тиску не перевищує 0,01 МПа, вважається, що апарат герметичний. В іншому випадку здійснюють пошук неущільнень на апараті та у місцях з'єднання запірної апаратури з комунікаціями.

Виявлення неущільнень можна проводити омилуванням або ж галогеновими течієшукачами. Метод омилування є простим і доступним, оскільки в його основу покладено виділення бульбашок у разі наявності на апараті нещільностей, але даний метод є досить застарілим, довготривалим і менш ефективним порівняно із сучасним галогенним методом. Для якого, використовують галоїдні течієшукачі, що дозволяють фіксувати галогенопохідні алканів. Тетрахлорметан закачують в герметично закрите обладнання та комунікації до тиску 0,5 МПа та за допомогою датчика - течієшукача галогенопохідних проводять огляд всіх з'єднань обладнання та комунікацій.

У випадку виявлення нещільних з'єднань проводять розбір та профілактичне ущільнення обладнання та комунікації. Для з'єднань проводять їх підтягування та перепаковування, а для обладнання підтягування кришок, або з'єднань і у випадку необхідності заміну ущільнюючих прокладок люків та кришок. В якості ущільнюючого матеріалу використовують термостійку гуму, пароніт, фторопласт.

Стерилізація. Існує декілька методів стерилізації обладнання: термічні (шляхом автоклавування, подачею пари), хімічний спосіб (використання дезрозчинів) та УФ-опроміненням.

Шляхом автоклавування стерилізація ферментера може здійснюватись тільки у випадку, коли загальний об'єм ферментера не перевищуватиме 20 л та не є стаціонарним. Автоклавують ферментери лише в розібраному вигляді, отже процес підготовки до автоклавування буде досить тривалий.

Хімічний спосіб стерилізації використовується зазвичай для лабораторного обладнання, але це не є доцільним, оскільки у мікроорганізмів що знаходяться на оброблюваній поверхні може виникнути резистентність до певного дезінфікуючого засобу і тоді така стерилізація буде не ефективною.

Використання УФ-опромінення недоцільне оскільки вони не проникнуть в важкодоступні місця обладнання.

Отже найбільш доцільно обрати саме термічний метод стерилізації. До того ж, на сьогоднішній день єдиним загально визнаним способом стерилізації апаратури та комунікацій вважається термічна стерилізація насиченою водяною парю, яка безпосередньо подається в апарат. Попередньо апарат нагрівають до температури 80-90⁰С шляхом подачі глухої пари в сорочку апарата.

Стерилізацію ферментера проводять за температури 125–131⁰С протягом 1 години, що забезпечує надійне знищення сторонньої мікрофлори.

Після стерилізації апарат охолоджують: закривається уся запірна арматура подачі пари в апарат та у сорочку подається холодна вода. Для компенсації падіння тиску в апарат подають інертний газ. Процес охолодження здійснюють до досягнення температур 30-40⁰С.

Очищення відпрацьованого інертного газу. Відпрацьований інертний газ повинен підлягати обов'язковому очищенню, тому подається на окремі колектори з подальшим їх очищенням на фільтрах.

5.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Для одержання бактеріофагу Cp-1 за допомогою біомаси клітин *S. pneumoniae*R36A використовується середовище наступного складу (г/л) [4]:

- Гідролізат казеїну – 10;
- Триптон – 5;
- Дріжджовий автолізат – 1;
- Глюкоза – 0,002;
- KCl – 5;
- K_2HPO_4 – 15.

Проаналізувавши склад поживного середовища для вирощування даного біологічного агенту, для культивування в колбах на качалках умовно ділимо його на композиції залежно від режиму стерилізації компонентів:

Композиція А: гідролізат казеїну, триптон, дріжджовий автолізат, глюкоза (режим стерилізації: 112°C, 30 хв);

Композиція Б: KCl, K_2HPO_4 (режим стерилізації: 131°C, 30 хв).

В композицію А входять термолабільні речовини, що потребують м'якшого режиму стерилізації ніж солі. Саме тому вирішено розділити дане середовище на дві композиції.

Гідролізат казеїну (компонент А) є термолабільним і потребує м'якого режиму стерилізації. Солі композиції Б стерилізують при стандартній для солей температурі. Фосфати стерилізують окремо, щоб запобігти утворенню нерозчинних фосфатів магнію та кальцію. Стерилізацію проводять в автоклаві.

Оскільки об'єми поживних середовищ занадто великі для стерилізації в автоклаві, їх треба стерилізувати безпосередньо в посівному апараті. Перед кожним посівним апаратом буде розміщено збірник відповідного об'єму для приготування композиції.

Стерилізація композиції Б відбувається в апараті, тому що умови стерилізації є жорсткішими, ніж для композиції А. Солі розводять в збірнику, після чого їх подають у ферментер, де проводиться стерилізація, термолабільні компоненти композиції А розчиняються та стерилізуються в збірнику.

Враховуючи розчинність гідролізату казеїну (5 г в 100 мл), що є основою композиції А, розрахуємо кількість води, необхідну для розчинення

цього компоненту, при приготуванні термолабільних речовин для вирощення інокуляту:

5 г – 100 мл

300 г – x мл

де 300 г – кількість гідролізату казеїну для приготування поживного середовища на стадії біосинтезу інокуляту, x – необхідна кількість води для розчинення.

$x = 6000$ мл

Динаміка утворення двох композицій, зберігається при виробничому біосинтезі в ферментері 500 л. Проте в цьому випадку *композицію Б та композицію А*, попередньо розчиняємо в збірниках на 150 л, що розташовані перед ферментером. Далі розчинені компоненти поживного середовища відправляємо в попередньо простерилізований ферментер.

5.2. Обґрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту

Даний засіб використовується для медичних цілей. Неочищений препарат бактеріофагу стрептококового містить в своєму складі баластні речовини, залишки клітин бактерій та токсини. Для очищення даного засобу потрібен такий спосіб, який би дав змогу максимально очистити препарат від пірогенів, а особливо від стрептококових токсинів, які є сильними стимуляторами імунної системи.

Тобто нашою метою буде очистити препарат від уламків клітин стрептокока та токсинів, відповідно процес виділення бактеріофагу стрептококового можна буде умовно розділити на:

- відділення залишків біомаси від фагових часточок;
- очищення від токсинів.

5.2.1 Відділення залишків біомаси від фагових часток

Для відділення біомаси на сьогоднішній день застосовуються різні методи, в залежності від типу кінцевого продукту та мікроорганізму-продуценту. Оскільки бактеріофаг лізує клітину-хазяїна та знаходиться

укультуральній рідині, потрібно відділити бактеріофаг від залишків поживного середовища та уламків клітин [21].

У промислових умовах після завершення процесу культивування бактеріофагу, про що свідчить повний лізис клітин *S.pneumoniae*, до культуральної рідини додають консервант хінозол (0,01%). Розчин хінозолу володіє протигрибковою та антибактеріальною дією. Протимікробна дія хінозолу обумовлена утворенням сполук з іонами металу, що порушують більшість ферментних систем мікроорганізмів [22].

Першим етапом виділення більшості продуктів біосинтезу є фракціонування культуральної рідини. Найпоширенішими методами відділення біомаси від рідкої фази є:

- фільтрування;
- відстоювання;
- сепарування;
- центрифугування.

Фільтрування – процес розділення неоднорідних систем через перегородку.

Переваги: повне відділення завислих часточок, простота проведення процесу, продуктивність.

Недоліки: значні витрати фільтрувальної тканини.

Центрифугування – це процес відділення завислих часток з розчинів під дією відцентрових сил.

Переваги: продуктивність та ефективність розділення (можна відділяти частинки розміром до 0,01 мкм).

Недоліки: складність конструкції, висока вартість та енергоємність, складність експлуатації, нагрівання мікроорганізмів, складність герметизації та асептики.

Відстоювання – осадження нерозчинних компонентів середовища під дією сили тяжіння.

Для успішного проведення процесу відстоювання не обов'язково, щоб мікроорганізми мали великий розмір. Вони можуть агломеруватись на нерозчинних частинках середовища.

Переваги: простота проведення процесу, невеликі затрати енергії.

Недоліки: велика тривалість процесу, неможливість повністю розділити компоненти середовища.

Сепарування – це процес розділення неоднорідних рідких сумішей на фракції, що розрізняються за щільністю, в полі дії відцентрових сил.

Цей метод дозволяє розділяти суспензію, що погано фільтрується, інтенсифікувати виділення та концентрування твердих часток розміром більше 0,5 мкм. Доцільний, якщо у культуральній рідині міститься невелика кількість твердої фази або біомаса є цільовим продуктом.

Переваги: висока продуктивність; високий рівень концентрування.

Недоліки: складність конструкції; енергоємність[23].

Уламки клітин стрептокока та фагові частинки істотно відрізняються за розмірами, тому в будь-якому випадку неможливо буде в одну стадію зробити повну очистку препарату, відділивши його від бактеріальних клітин, токсинів та баластних речовин. Розмір бактеріальних клітин дуже малий, але розмір часток бактеріофагу ще менший. Спочатку нашою задачею є розділити уламки клітин стрептокока, що лізувалися та часток бактеріофага з культуральною рідиною.

Враховуючи всі недоліки та переваги вищеписаних методів оптимальним буде варіант очищення культуральної рідини звичайним центрифугуванням з подальшою доочисткою. При цьому культуральну рідину центрифугують з хінозолом протягом 15 хв при 5000 об/хв, а далі надосадову рідину подають на доочистку для остаточного очищення від уламків клітин стрептокока [24].

Оскільки консервант хінозол який, за технологією, додають до культуральної рідини після закінчення процесу ферментації, має антибактеріальну дію, то застосування цього реагенту може замінити

використання хлороформу при центрифугуванні. Хінозол є не токсичним як для людей, так і для тварин, його використання забезпечить лізис клітин які «вижили» під час ферментації.

Після додавання хінозолу до культуральної рідини, по завершенню процесу ферментації, розчин витримують протягом 15-30 хвилин при постійному перемішуванні 30 об/хв. Далі піддають центрифугуванню на швидкості 5000 об/хв протягом 15 хвилин. Це дозволяє осадити клітинний дебрис та залишки поживного середовища. В подальшому препарат потребує проведення концентрування та доочищення.

Перевагами саме такого простого методу є значно менша вартість апаратури, швидкість, простота та відсутність токсичних реагентів. Недоліком такого способу відділення бактеріофагів є те, що після таких маніпуляцій препарат має низький ступінь очистки і потребує додаткового більш інтенсивного доочищення. Але оскільки після використання будь якого із запропонованих методів передбачена доочистка, то цим таким недоліком методу з використанням центрифугування можна знехтувати беручи до уваги лише його переваги.

5.2.2 Обґрунтування методу концентрування та очищення фагів

Розрізняють фізичні та хімічні методи концентрування та очистки бактеріофагів. Розглянемо декілька фізичних методів.

Одним із таких методів є фільтрація, яка включає в себе 4 етапи: мікрофільтрацію, яка проводиться в тупіковому режимі в три етапи (на фільтр-картоні, на целюлозних мембранах з діаметром пор 0,5-0,7 мкм, потім на целюлозних мембранах с розміром пор 0,2 мкм) і четвертий етап – це очистка фаголізату методом ультрафільтрації в режимі тангенціального потоку через волокна з порогом затримання речовин 100кД [25].

Також існує двоетапний спосіб очистки, що включає в себе мікрофільтрацію в режимі тангенціального потоку на капронових мембранах з діаметром пор 0,2 мкм і очистку ультрафільтрацією в режимі тангенціального потоку на мембранах з порогом затримання 150-200кД. Якщо порівнювати ці

два методи то фільтрація на капронових фільтрах є більш високотехнологічною та має більшу продуктивність оскільки капронові фільтри більш стійкі до зношування і витримують до 50-70 циклів на відмінну від одноразових целюлозних мембран та фільтр-картона [26].

Наступним методом є диференційне центрифугування. Всі методи центрифугування ґрунтовані на розділенні часток по їх масі. При диференційному центрифугуванні спочатку центрифугують матеріал при 3-4 тис. об/хв., протягом 30 хвилин, надосадову рідину збирають в іншу центрифужну пробірку і ще раз центрифугують при більш високих обертах, близько 5-6 тис. об/хв. Супернатант зливають і для осадження бактеріофагу знову центрифугують вже при швидкості 30-60 тис. об/хв. Осад після центрифугування ресуспендують в фізіологічному розчині та в подальшому очищують [27].

При центрифугуванні в градієнті концентрації використовують розділення часток по швидкості седиментації у в'язкому середовищі при цьому утворюються зони з часток одного типу. В залежності від речовини, яка використовується як градієнт розрізняють зональне (швидкісне) та ізопікнічне центрифугування [27].

При зональному центрифугуванні зазвичай використовують градієнт концентрації сахарози. Для очистки бактеріальних вірусів використовують 10-40% сахарозні градієнти. Щоб здійснити концентрування даним методом необхідно нашарувати один на одного 10, 20, 30 і 40 % розчин сахарози. Далі обережно нашаровують фаговмісний розчин та центрифугують при швидкості 36 тис. об/хв. протягом 2 годин. Зони вірусу буде видно при освітленні, суспензію фагів можна буде відібрати шприцом [27].

Ізопікнічне центрифугування проводять в розчинах хлористого чи сірчаноокислого цезію (CsCl чи Cs_2SO_4). Вибір розчину залежить від властивостей вірусу. Для бактеріофагів зазвичай використовується CsCl . Бактеріофаги перед початком центрифугування суспензію змішують з CsCl і поміщають в центрифужні пробірки, які заповнюють лише на три четверті

ідоливають пробірки олією. Ізопікнічні градієнти отримують при центрифугування на швидкості 36 тис. об/хв. протягом 18 годин. Бактеріофаги видаляють за допомогою шприца, солі цезію видаляють діалізом [27].

Дані методи не використовуються для промислових виробництв оскільки неможливо одночасно процентрифугувати велику кількість фаголізату, а також дані методи потребують великих затрат часу.

Іншу групу методів концентрування та очистки складають хімічні, до яких відносять різні способи: осадження метанолом; осадження в ізоелектричній точці; осадження солями та полі етиленгліколем; очищення від ліпідів ефірами [28].

При осадженні метанолом, його додають до охолодженої фаговмісної рідини при низьких температурах до концентрації 35%. Суміш залишають на 4 години при температурі $+4^{\circ}\text{C}$. Після цього розчин центрифугують при швидкості 5000 об/хв. протягом 30 хвилин [29]. Мінуси даного методу в тому, що метанол є токсичним як для людей так і для тварин, а оскільки ми виготовляємо лікарський засіб то не можемо використовувати даний метод.

Концентрування рідкого бактеріофагу може відбуватись шляхом висолювання амоній сульфатом, який додають в кількості 69% від об'єму фага. Висолювання продовжується протягом 18 годин без наступного діалізу при температурі $2-4^{\circ}\text{C}$, рН 6,9-7,0. До пастоподібної маси, що утворилася, додають у якості стабілізатора глюконат кальцію (9%). Масу наносять на касети (товщина слою 1см) і висушують під вакуумом в ліофільних сушарках до отримання залишкової вологи 2-4%. Висушену масу подрібнюють в грануляторі, контролюють на асептичність та літичну активність [28]. Даний метод застосовується для виготовлення таблетованої форми.

Ще одним з методів хімічного концентрування бактеріофагів є осадження бактеріофагів в ізоелектричній точці. Оскільки віруси мають білкову природу їх можна осадити за допомогою досягнення ізоелектричної точки. Ізоелектрична точка бактеріофагів лежить в діапазоні рН 3,5-4,0. При даному методі до фаговмісної рідини додають 1Н розчин соляної кислоти

притемпературі $+4^{\circ}\text{C}$ і доводять рН середовища до ізоелектричної точки бактеріофагу, суміш витримують на холоді декілька годин. Після цього центрифугують для осадження 20-30 хвилин при 3-4 тис. об/хв. Надосадову рідину зливають, а осад розводять в слабо лужному буфері [27].

Концентрацію бактеріофагу також можна проводити методом іонообмінної хроматографії з використанням волокнистої ДЕАЕ-целюлози. При цьому профільтований бактеріофаг розводять 1:1 стерильної дистильованою водою і пропускають через хроматографічні колонки з ДЕАЕ-целюлозою. Після цього проводять елюцію бактеріофага 0,7- 1,0 М розчином NaCl на 0,05 М фосфатному буфері (рН 7,0 – 7,4). Концентрат стерильно збирають у ємкості додаючи у якості стабілізатора 2% глюкози і піддають ліофілізації.

Основні переваги виділення та очистки за допомогою іонообмінної хроматографії:

- можливості синтезу іонообмінних сорбентів, сорбентів з різною вибірковістю і особливо зі специфічною вибірковістю по відношенню до окремих антибіотиків.
- виключається необхідність застосування токсичних і вибухонебезпечних розчинників.
- метод вигідний економічно, так як його технологія проста і не вимагає дорогого устаткування і сировини [29].

Більшість з запропонованих методів зручні для застосування в лабораторних умовах, але не використовуються в промисловості. Наприклад методи висолювання, осадження, іонообмінної хроматографії та центрифугування є ефективними способами концентрування та очищення фагів. Але за рахунок довготривалості, неможливості автоматизації, застосуванні реактивів або ж потреби особливих умов проведення очистки такі методи не можуть бути використанні у промисловому виробництві фагопрепаратів.

З вище зазначених способів можна відзначити мікрофільтрацію та ультрафільтрацію, поєднання цих двох методів може забезпечити

чистотупрепарату на 98% від бактеріальних клітин, залишків поживного середовища, ентеротоксинів, пірогенів та інше. Якщо порівнювати два запропонованих методи фільтрації то безперечно переважає двоетапний спосіб очистки препарату: мікрофільтрація на капронових фільтрах з діаметром пор 0,2 мкм та ультрафільтрація на мембранах з порогом затримання 150-200кД. Даний метод є більш економічно вигідним в порівнянні з чотирьохстаїним фільтруванням оскільки капронові фільтри на відмінну від целюлозних та фільтр-картону можна використовувати багаторазово.

5.2.3. Обладнання для очищення фагів

Для центрифугування культуральної рідини обираємо проточну центрифугу СЕРАZ 61/Z 61 GP (рис. 5.3), яка має ручний і автоматичний режим роботи і являється ефективною машиною з високим ступенем розділення. Основною особливістю є здатність центрифуги до регуляції швидкостей (до 17 тис. об/хв.), можливість регулювання температурного режимута ефективним відділенням осаду від рідини.Центрифуга СЕРАZ 61/Z 61 GPпризначена для розділення осаду від рідини, розділення білків крові, концентрування і виділення вірусів та бактерій [30]. Переваги:

- швидкий процес центрифугування;
- простота установки та роботи;
- не потрібно багато простору для установки;
- комфорт в обслуговуванні.



Рисунок 5.3 Проточна центрифуга CEPAZ 61/Z 61 GP [8]

В якості другого ступеня очистки будемо використовувати процес мікрофільтрації з використанням пористих мембран з розміром пор 0,22 мкм. Фільтри Нідерландської компанії Lenntech конструкції PLA 3M підійдуть для даної задачі. Даний фільтр забезпечує більш низькі перепади та більший строк служби, знижує загальні витрати на фільтрацію. Конструкція фільтра вироблена з поліпропілену, проте демонструє кращу фільтруючу здатність порівняно з іншими фільтрами схожої конструкції. Дані фільтри призначені для широкого спектра фармацевтичних, біофізичних та біологічних та процесів, у тому числі:

- фільтрування розчинників;
- реагентів та буферів;
- очистка вакцини;
- очистка культуральної рідини;
- системи високої чистоти DI та WFI.

Після проведення процесу мікрофільтрації для концентрування вірусу та позбавлення його від токсинів і баластних речовин використовують процес ультрафільтрації [31].

Розмір головки використовуваного штаму бактеріофага складає близько 65 нм, що дорівнює 0,065 мкм. Здійснювати ультрафільтрацію на фільтрах

зрозміром пор 0,1 мкм не доречно, оскільки вірус пройде крізь мембрану. Тому будемо використовувати фільтр з діаметром пор 0,05 мкм. [4].

Таким чином, препарат очищається від токсинів та залишків баластних речовин. Токсини проходять крізь мембрану, а вірусні часточки затримуються та концентруються на мембрані.

Фільтри з таким діаметром пор не так широко розповсюджені. Дане обладнання є у фірми Millipore типу MCE. Біологічна інертна суміш ацетату та нітриту целюлози зробила ці фільтри найбільш широко використовуваними по всьому світу для різноманітних хімічних та біологічних застосувань. Фільтри даної марки поєднують у собі високу швидкість потоку та термічну стійкість, мають низькі адсорбційні властивості. Вони чудово підходять для використання в умовах напірної фільтрації, гідрофільні, забезпечують високу швидкість потоку завдяки своїй симетричній структурі [32].

Після проведення ультрафільтрації зворотнім потоком промивають фільтр стерильним апірогенним фізіологічним розчином та подають у збірник об'ємом 300 л, доводять розчин до початкового об'єму розчином стерильного апірогенного 0,9% NaCl.

5.3 Обґрунтування допоміжних робіт для стадії виділення та очищення цільового продукту

Відповідно до вимог GMP, що висуваються до виробничих приміщень, всі поверхні повинні бути гладенькими, непроникними і непошкодженими, щоб звести до мінімуму утворення та накопичення пилу і мікроорганізмів, а також забезпечувати можливість багатократного застосування миючих і дезінфікуючих засобів. Покриття підлоги повинне бути не слизьким, стійким до стирання, мати щільну структуру. При підготовці виробничих приміщень до роботи приймають комплекс заходів, що складається з вологого прибирання, дезінфекції направлених на досягнення відповідного класу чистоти.

Препарат бактеріофагу є стерильним. Всі етапи очищення проводять у класі чистоти В.

Система вентиляції в приміщенні даного класу чистоти повинна забезпечувати ламінарний потік повітря. Вентиляційне повітря, перш ніж подається у чисте приміщення проходить грубу очистку на фільтрі класу G, далі нагрівається до потрібної температури, що буде комфортною для роботи працівників (18-24°C), зволожується, далі проходить через фільтри тонкої очистки класу F, фільтри високої ефективності H та фільтри надвисокої ефективності класу U.

Якість повітря постійно контролюється. Перевіряються такі показники:

- концентрація часточок в оснащеному та функціональному стані;
- мікробіологічна чистота;
- перепади тиску;
- температура;
- вологість.

Вода, що застосовується при виробництві бактеріофагу також повинна підлягати очистці.

Для миття обладнання та кінцевої тари використовують: під час первинного миття воду очищену, а під час кінцевого ополіскування воду для ін'єкцій. Вода очищена виготовляється такими способами, як зворотній осмос, електродеіонізація, ультрафільтрація. Вода для ін'єкцій отримується за допомогою дистиляції.

РОЗДІЛ 6. МАТЕРІАЛЬНИЙ БАЛАНС І РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ

Згідно з ТЕО потреба в препараті «Бактеріофаг стрептококовий» на рік становить $V_{нт} = 8\ 000$ л . Дану кількість препарату необхідно отримати за $T_{рд} = 70$ робочих днів.

Культивування *Streptococcus pneumoniae* для отримання бактеріофага стрептококового здійснюється на середовищі такого складу (г/л):

- Гідролізат казеїну - 10
- Триптон - 5
- Дріжджовий автолізат - 1
- КСІ - 1
- K_2HPO_4 - 15
- Глюкоза – 0,002

$$C_{\Sigma} = 32,002$$

Посівний матеріал вирощується середовищі аналогічного складу. Для подальших розрахунків приймаємо наступні початкові дані:

- час циклу роботи ферментера, $T_{ц} = 41,5$ год;
- коефіцієнт запасу (втрати культуральної рідини або посівного матеріалу від нестерильних операцій), $K_1 = 1,1$;
- коефіцієнт заповнення ферментера, частка, $K_3 = 0,6$
- коефіцієнт заповнення посівного апарата, частка, $K_{па} = 0,6$;
- коефіцієнт заповнення інокулятора, частка, $K_{ин} = 0,6$;
- коефіцієнт заповнення колб, частка, $K_{кол} = 0,2$;
- коефіцієнт заповнення збірника , частка, $K_{зб} = 0,8$;
- сумарні втрати активності при виділенні готового продукту (сума всіх втрат по стадіям виділення готового продукту), частка, $E_{св} = 0,2$;

					НУХТ БТЕК 04.01.23. ДП ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Кутрик І.В			Літ.	Арк.	Аркушів
Консультант						50	103
Керівник		Гудзенко О.В.			Кафедра БТМ 50		
Зав.кафедри		Пирог Т.П.					
РОЗДІЛ 6. МАТЕРІАЛЬНИЙ БАЛАНС ТА РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ							

- концентрація посівного матеріалу для виробничих ферментерів, частка (0,05-0,1), $X_{вф} = 0,1$;
- концентрація посівного матеріалу для посівних апаратів, частка (0,02-0,1), $X_{па} = 0,1$;
- концентрація посівного матеріалу для інокуляторів, частка, $X_{ін} = 0,1$;
- концентрація посівного матеріалу для качалочних колб, частка, $X_{кол} = 0,1$;
- втрати культуральної рідини при біосинтезі, частка, $E_{ф} = 0,15$;
- втрати посівного матеріалу при його культивуванні в посівних апаратах, частка, $E_{па} = 0,1$;
- втрати посівного матеріалу при його культивуванні в інокуляторах, частка, $E_{ін} = 0,05$;
- втрати посівного матеріалу при його культивуванні в колбах, частка, $E_{кол} = 0,02$.

6.1 Розрахунок партій продукту (виробничих циклів)

1.1 Кількість препарату за цикл, л/доба:

$$V_{ц} = V_{пт} \cdot T_{ц} / (T_{рд} \cdot 24) = 8000 \cdot 41,5 / (70 \cdot 24) = 197,6 \text{ л}$$

1.2 Визначаємо кількість виробничих циклів на рік:

$$N_{ц} = V_{пт} / V_{цк} = 8000 / 197,6 = 41 \text{ цикл,}$$

1.3 Кількість культуральної рідини за цикл, л:

$$V_{кр} = K_1 \cdot V_{ц} / (1 - E_{св}) = 1,1 \cdot 197,6 / (1 - 0,2) = 271,7 \text{ л}$$

6.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого культивування та вирощування посівного матеріалу

6.2.1. Приготування та стерилізація поживного середовищ для виробничого біосинтезу

Кількість поживного середовища (ПС) та посівного матеріалу (ПМ) в ферментері до культивування становить:

$$V_{ф} = V_{кр} / (1 - E_{ф}) = 272 / (1 - 0,1) = 302 \text{ л.}$$

Кількість поживного середовища в ферментері складе:

$$V_{\text{пс}} = V_{\text{ф}} / (1 + X_{\text{ф}}) = 302 / (1 + 0,1) = 275 \text{ л.}$$

Необхідна кількість посівного матеріалу:

$$V_{\text{пмф}} = V_{\text{ф}} - V_{\text{пс}} = 302 - 275 = 27 \text{ л}$$

При вибраному коефіцієнті заповнення ферментера $K_3 = 0,6$ його приблизний геометричний об'єм ферментера складе $V_{\text{гф}} = V_{\text{ф}} / K_3 = 302 / 0,6 = 500$ л.

Обираємо стандартний ферментер геометричним об'ємом 500 л.

6.2.2. Визначаємо кількість стадій вирощування посівного матеріалу

Для одержання 27 л посівного матеріалу кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі (з урахуванням втрат в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря) становитиме:

$$V_{\text{роб.2}} = \frac{V_{\text{пм1}}}{1 - E_{\text{ін}}} = \frac{27}{1 - 0,1} = 30 \text{ л}$$

Приймаємо інокулятор $V_{\text{сф}} = 50$ л та розраховуємо кількість поживного середовища в інокуляторі:

$$V_{\text{пс2}} = \frac{V_{\text{роб.2}}}{1 + X_{\text{ін}}} = \frac{30}{1 + 0,1} = 27 \text{ л}$$

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пс2}} = 30 - 27 = 3 \text{ л}$$

Для одержання 3 л посівного матеріалу використовують качалочні колби об'ємом 750 мл та заповненням на 150 мл. Кількість колб становитиме:

$$N_{\text{колб}} = \frac{V_{\text{пмф}}}{V_{\text{колб}} \times K_{\text{зк}}} = \frac{3000}{750 \times 0,2} = 20 \text{ шт.}$$

Отже, підготовка посівного матеріалу включатиме 2 стадії.

6.2.3

Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу в ферментері

У відповідності з прийнятим складом поживного середовища для виробничого біосинтезу загальні витрати компонентів на визначений об'єм

поживного середовища $V_{\text{пс}}$ складають:

$$G_{\text{заг}} = V_{\text{пс}} \times C_{\Sigma} = 275 \times 32,002 = 8800 \text{ г, в тому числі покомпонентно, г:}$$

$$\text{Гідролізат казеїну — } G_1 = G_{\text{заг}} (G_1 / C_{\Sigma}) = 8800 \cdot (10 / 32,002) = 2750;$$

$$\text{Триптон — } G_2 = G_{\text{заг}} (G_2 / C_{\Sigma}) = 8800 \cdot (5 / 32,002) = 1375;$$

$$\text{Дріжджовий автолізат — } G_3 = G_{\text{заг}} (G_3 / C_{\Sigma}) = 8800 \cdot (1 / 32,002) = 275;$$

$$\text{КСІ — } G_4 = G_{\text{заг}} (G_4 / C_{\Sigma}) = 8800 \cdot (1 / 32,002) = 275;$$

$$\text{K}_2\text{HPO}_4 \text{ — } G_5 = G_{\text{заг}} (G_5 / C_{\Sigma}) = 8800 \cdot (15 / 32,002) = 4124,45;$$

$$\text{Глюкоза — } G_6 = G_{\text{заг}} (G_6 / C_{\Sigma}) = 8800 \cdot (0,002 / 32,002) = 0,55;$$

Розрахунок кількості води для приготування поживного середовища для виробничого біосинтезу.

Кількість води визначають за наступною формулою:

$$V_{\text{вф}} = V_{\text{пс}} - G_{\text{заг}} - (V_{\text{пс}} \times K_{\text{кон}})$$

де $K_{\text{кон}}$ — частка конденсату загальної кількості води, що йде на приготування середовища.

В залежності від способу стерилізації та використання обладнання величина $K_{\text{кон}}$ може складати:

$K_{\text{кон}} = 0$ при стерилізації в закритих колбах або бутлях в автоклаві;

$K_{\text{кон}} = 0,1 \div 0,15$ при стерилізації компонентів реактора х-змішувача, інокуляторів або ферментерів при подачі гострої пари безпосередньо в середовище;

$K_{\text{кон}} = 0,2$ при стерилізації компонентів в УБС.

На даній стадії композиції стерилізуються в реакторі-змішувачі (*композиція А*) та ферментері (*композиція Б*), тож $K_{\text{кон}} = 0,1$.

Загальна кількість конденсату, що утворюється при стерилізації ПС гострою парою становитиме:

$$V_{\text{фк}} = V_{\text{пс}} \times K_{\text{кон}} = 275 \times 0,1 = 27,5 \text{ л.}$$

Загальна кількість води необхідної для розбавлення компонентів поживного середовища буде:

$$V_{\text{вф}} = V_{\text{пс}} - V_{\text{фк}} - G_{\text{заг}} = 275 - 27,5 - 8,8 = 238,7.$$

Для спрощення розрахунків приймаємо, що густина компонентів приблизно дорівнює густині води, тобто 1л = 1кг.

Тоді кількість води для розчинення покомпонентно становить:

$$\text{Гідролізат казеїну} \quad V_{в1} = V_{вф} \times (C_1/C_{\Sigma}) = 238,7 \times (10/32,002) = 74,6\text{л};$$

$$\text{Триптон} \quad V_{в2} = V_{вф} \times (C_1/C_{\Sigma}) = 238,7 \times (5/32,002) = 37,3 \text{ л};$$

$$\text{Дріжджовий автолізат} \quad V_{в3} = V_{вф} \times (C_1/C_{\Sigma}) = 238,7 \times (1/32,002) = 7,5 \text{ л};$$

$$\text{КСІV}_{в4} = V_{вф} \times (C_1/C_{\Sigma}) = 238,7 \times (1/32,002) = 7,5 \text{ л}$$

$$\text{K}_2\text{HPO}_4 V_{в5} = V_{вф} \times (C_1/C_{\Sigma}) = 238,7 \times (15/32,002) = 111,8 \text{ л};$$

$$\text{Глюкоза} \quad V_{в6} = V_{вф} \times (C_1/C_{\Sigma}) = 238,7 \times (0,002/32,002) = 0,015 \text{ л};$$

Розраховуємо кількість конденсату покомпонентно, л

$$\text{Гідролізат казеїну} \quad V_{1к} = V_{фк} (C_1/C_{\Sigma}) = 27,5 \times (10/32,002) = 8,6$$

$$\text{Триптон} \quad V_{2к} = V_{фк} (C_2/C_{\Sigma}) = 27,5 \times (5/32,002) = 4,3$$

$$\text{Дріжджовий автолізат} \quad V_{3к} = V_{фк} (C_3/C_{\Sigma}) = 27,5 \times (1/32,002) = 0,86$$

$$\text{КСІV}_{4к} = V_{фк} (C_4/C_{\Sigma}) = 27,5 \times (1/32,002) = 0,86$$

$$\text{K}_2\text{HPO}_4 \quad V_{5к} = V_{фк} (C_5/C_{\Sigma}) = 27,5 \times (15/32,002) = 12,9$$

$$\text{Глюкоза} \quad V_{6к} = V_{фк} (C_6/C_{\Sigma}) = 27,5 \times (0,002/32,002) = 0,0017$$

Таблиця 6.1

Склад композицій для стерилізації поживного середовища ферментера

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 275 л середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції V, л
Гідролізат казеїну	10	2,750	А	137,5
Триптон	5	1,375		
Дріжджовий автолізат	1	0,275		
Глюкоза	0,002	0,00055		
Конденсат		13,75		
Вода		119,4		
КСІ	1	0,275	Б	137,5
K ₂ HPO ₄	15	4,124		
Конденсат		13,75		
Вода		119,3		
Разом				275

6.2.4 Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті геометричним об'ємом 50 л.

$G_{\text{заг}} = V_{\text{пс}} \times C_{\Sigma} = 27 \times 32,002 = 864$ г, в тому числі покомпонентно, г:

Гідролізат казеїну —	$G_1 = G_{\text{заг}} (G_1 / C_{\Sigma}) = 864 \cdot (10 / 32,002) = 270;$
Триптон —	$G_2 = G_{\text{заг}} (G_2 / C_{\Sigma}) = 864 \cdot (5 / 32,002) = 135;$
Дріжджовий автолізат —	$G_3 = G_{\text{заг}} (G_3 / C_{\Sigma}) = 864 \cdot (1 / 32,002) = 27;$
КСІ —	$G_4 = G_{\text{заг}} (G_4 / C_{\Sigma}) = 864 \cdot (1 / 32,002) = 27;$
K_2HPO_4 —	$G_5 = G_{\text{заг}} (G_5 / C_{\Sigma}) = 864 \cdot (15 / 32,002) = 405;$
Глюкоза —	$G_6 = G_{\text{заг}} (G_6 / C_{\Sigma}) = 864 \cdot (0,002 / 32,002) = 0,05;$

Розрахунок кількості води для приготування поживного середовища для виробничого біосинтезу.

Кількість води визначають за наступною формулою:

$$V_{\text{вф}} = V_{\text{пс}} - G_{\text{заг}} - (V_{\text{пс}} \times K_{\text{кон}})$$

де $K_{\text{кон}}$ — частка конденсату загальної кількості води, що йде на приготування середовища.

В залежності від способу стерилізації та використовуваного обладнання величина $K_{\text{кон}}$ може складати:

$K_{\text{кон}} = 0$ при стерилізації в закритих колбах або бутлях в автоклаві;

$K_{\text{кон}} = 0,1 \div 0,15$ при стерилізації компонентів реактора х-змішувача, інокулятора або ферментера при подачі гострої пари безпосередньо в середовище;

$K_{\text{кон}} = 0,2$ при стерилізації компонентів в УБС.

На даній стадії композиції стерилізуються в реакторі-змішувачі (*композиція А*) та ферментері (*композиція Б*), тож $K_{\text{кон}} = 0,1$.

Загальна кількість конденсату, що утворюється при стерилізації ПС гострою парою становитиме:

$$V_{\text{фк}} = V_{\text{пс}} \times K_{\text{кон}} = 27 \times 0,1 = 2,7 \text{ л.}$$

Загальна кількість води необхідної для розбавлення компонентів поживного середовища буде:

$$V_{\text{вф}} = V_{\text{пс}} - V_{\text{фк}} - G_{\text{зар}} = 27 - 2,7 - 0,864 = 23,4.$$

Для спрощення розрахунків приймаємо, що густина компонентів приблизно дорівнює густині води, тобто 1 л = 1 кг.

Тоді кількість води для розчинення покомпонентно становить:

$$\text{Гідролізат казеїну} \quad V_{\text{в1}} = V_{\text{вф}} \times (C_1/C_{\Sigma}) = 23,4 \times (10/32,002) = 7,33 \text{ л};$$

$$\text{Триптон} \quad V_{\text{в2}} = V_{\text{вф}} \times (C_1/C_{\Sigma}) = 23,4 \times (5/32,002) = 3,65 \text{ л};$$

$$\text{Дріжджовий автолізат} \quad V_{\text{в3}} = V_{\text{вф}} \times (C_1/C_{\Sigma}) = 23,4 \times (1/32,002) = 0,73 \text{ л};$$

$$\text{КСІV}_{\text{в4}} = V_{\text{вф}} \times (C_1/C_{\Sigma}) = 23,4 \times (1/32,002) = 0,73 \text{ л}$$

$$\text{K}_2\text{HPO}_4 V_{\text{в5}} = V_{\text{вф}} \times (C_1/C_{\Sigma}) = 23,4 \times (15/32,002) = 10,96 \text{ л};$$

$$\text{Глюкоза} \quad V_{\text{в6}} = V_{\text{вф}} \times (C_1/C_{\Sigma}) = 23,4 \times (0,002/32,002) = 0,0014 \text{ л};$$

Розраховуємо кількість конденсату покомпонентно, л

$$\text{Гідролізат казеїну} \quad V_{\text{1к}} = V_{\text{фк}} (C_1/C_{\Sigma}) = 2,7 \times (10/32,002) = 0,84$$

$$\text{Триптон} \quad V_{\text{2к}} = V_{\text{фк}} (C_2/C_{\Sigma}) = 2,7 \times (5/32,002) = 0,44$$

$$\text{Дріжджовий автолізат} \quad V_{\text{3к}} = V_{\text{фк}} (C_3/C_{\Sigma}) = 2,7 \times (1/32,002) = 0,08$$

$$\text{КСІV}_{\text{4к}} = V_{\text{фк}} (C_4/C_{\Sigma}) = 2,7 \times (1/32,002) = 0,08$$

$$\text{K}_2\text{HPO}_4 \quad V_{\text{5к}} = V_{\text{фк}} (C_5/C_{\Sigma}) = 2,7 \times (15/32,002) = 1,26$$

$$\text{Глюкоза} \quad V_{\text{6к}} = V_{\text{фк}} (C_6/C_{\Sigma}) = 2,7 \times (0,002/32,002) = 0,00017$$

Таблиця 6.2

Склад композицій для стерилізації поживного середовища інокулятора 50

л

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 27 л середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції V, л
Гідролізат казеїну	10	0,270	А	13,5
Триптон	5	0,135		
Дріжджовий автолізат	1	0,027		
Глюкоза	0,002	0,00005		
Конденсат		1,36		
Вода		11,7		
КСІ	1	0,027	Б	13,5
K ₂ HPO ₄	15	0,405		
Конденсат		1,34		
Вода		11,69		
Разом				27

6.2.5. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках.

Кількість поживного середовища становить 3 л, буде 20 качалочних колб.

$$V_{\text{кол}} = \frac{V_{\text{пм}}}{1 - E_{\text{кол}}} = \frac{3}{1 - 0,02} = 3,060 \text{ л}$$

Кількість поживного середовища в колбах становить:

$$V_{\text{пск}} = \frac{V_{\text{кол}}}{1 + X_{\text{ін}}} = \frac{3,060}{1 + 0,1} = 2,78 \text{ л}$$

Необхідна кількість посівного матеріалу для засіву качалочних колб:

$$V_{\text{пм}} = V_{\text{кол}} - V_{\text{пс}} = 3,060 - 2,78 = 0,28 \text{ л}$$

Згідно з прийнятим складом загальні втрати компонентів на визначений об'єм качалочних колб становлять:

$$G_{\text{заг.к}} = V_{\text{пск}} \times C_{\Sigma} = 2,78 \times 32,002 = 89 \text{ г, в тому числі покомпонентно, г:}$$

$$\text{Гідролізат казеїну} - G_1 = G_{\text{заг.к}} (G_1 / C_{\Sigma}) = 89 \cdot (10 / 32,002) = 27,8;$$

$$\text{Триптон} - G_2 = G_{\text{заг.к}} (G_2 / C_{\Sigma}) = 89 \cdot (5 / 32,002) = 13,9;$$

$$\text{Дріжджовий автолізат} - G_3 = G_{\text{заг.к}} (G_3 / C_{\Sigma}) = 89 \cdot (1 / 32,002) = 2,78;$$

$$\text{КСІ} - G_4 = G_{\text{заг.к}} (G_4 / C_{\Sigma}) = 89 \cdot (1 / 32,002) = 2,78;$$

$$\text{K}_2\text{HPO}_4 - G_5 = G_{\text{заг.к}} (G_5 / C_{\Sigma}) = 89 \cdot (15 / 32,002) = 41,7;$$

$$\text{Глюкоза} - G_6 = G_{\text{заг.к}} (G_6 / C_{\Sigma}) = 89 \cdot (0,002 / 32,002) = 0,006;$$

Розрахунок кількості води для приготування поживного середовища.

Кількість води визначають за наступною формулою:

$$V_{\text{вк}} = V_{\text{пск}} - G_{\text{заг.к}} - (V_{\text{пск}} \times K_{\text{кон}})$$

Стерилізація поживного середовища проводиться в автоклаві, тож $K_{\text{кон}}=0$ та конденсат не утворюється. Тоді кількість води необхідної для приготування композицій буде дорівнювати:

$$V_{\text{вк}} = 2780 - 89 = 2691 \text{ мл}$$

Тоді кількість води для розчинення покомпонентно становить:

$$\text{Гідролізат казеїну} \quad V_{\text{вк1}} = V_{\text{вф}} \times (C_1 / C_{\Sigma}) = 2691 \times (10 / 32,002) = 840,9 \text{ мл;}$$

$$\text{Триптон} \quad V_{\text{вк2}} = V_{\text{вф}} \times (C_2 / C_{\Sigma}) = 2691 \times (5 / 32,002) = 420,5 \text{ мл;}$$

$$\text{Дріжджовий автолізат} \quad V_{\text{вк3}} = V_{\text{вф}} \times (C_3 / C_{\Sigma}) = 2691 \times (1 / 32,002) = 84 \text{ мл;}$$

$$KClV_{BK4} = V_{вф} \times (C_1/C_{\Sigma}) = 2691 \times (1/32,002) = 84 \text{ мл}$$

$$K_2HPO_4V_{BK5} = V_{вф} \times (C_1/C_{\Sigma}) = 2691 \times (15/32,002) = 1261,4 \text{ мл};$$

$$\text{Глюкоза} \quad V_{BK6} = V_{вф} \times (C_1/C_{\Sigma}) = 2691 \times (0,002/32,002) = 0,17 \text{ мл};$$

Таблиця 6.3

Склад композицій для стерилізації поживного середовища качалочних колб

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 2,78 л середовища, г (мл)	Композиція	Об'єм композиції V, л
Гідролізат казеїну	10	27,8	А	1,390
Триптон	5	13,9		
Дріжджовий автолізат	1	2,78		
Глюкоза	0,002	0,006		
Вода		1345,6		
КСІ	1	2,78	Б	1,390
K ₂ HPO ₄	15	41,7		
Вода		1345,4		
Разом				2780

6.3. Розрахунок матеріального балансу

Таблиця 6.4

Матеріальний баланс на один цикл виробничого біосинтезу

N з/п	Використано		Отримано	
	Назва сировини і напівпродукту	Кількість, кг, дм ³	Назва кінцевого продукту, відходів та втрат	Кількість, кг, дм ³ .
1	2	3	4	5
1.	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ВИРОЩУВАННЯ ІНОКУЛЯТУ В КОЛБАХ НА КАЧАЛКАХ			
1.1	Гідролізат казеїну	0,0278	Нестерильне ПС	2,780
1.2	Триптон	0,0139		
1.3	Дріжджовий автолізат	0,00278		
1.4	КСІ	0,00278		
1.5	K ₂ HPO ₄	0,0417		
1.6	Глюкоза	0,000006		
1.7	Вода	2,691		
	Всього:	2,780	Всього:	2,780
2.	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА В АВТОКЛАВІ			
2.1	Нестерильне ПС	2,780	Стерильне ПС	2,780
	Всього:	2,780	Всього:	2,780
3.	ВИРОЩУВАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ В КОЛБАХ НА КАЧАЛКАХ			
3.1	Стерильне ПС	2,780	Посівний матеріал	3,000
3.2	Посівний матеріал	0,28		

Закінчення табл.б.4.

3.3	Втрати (частка)	0,02		0,06
	Всього:	3,060	Всього:	3,060
4.	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ВИРОЩУВАННЯ ІНОКУЛЯТУ В ФЕРМЕНТЕРІ НА 50 л			
4.1	Гідролізат казеїну	0,270	Нестерильне ПС	24,3
4.2	Триптон	0,135		
4.3	Дріжджовий автолізат	0,027		
4.4	КСІ	0,027		
4.5	K ₂ HPO ₄	0,405		
4.6	Глюкоза	0,00005		
4.10	Вода	23,39		
	Всього:	24,3	Всього:	24,3
5	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ В ІНОКУЛЯТОРІ НА 50 л			
5.1	Нестерильне ПС	24,3	Стерильне ПС	27
5.2	Конденсат	2,7	(втрат немає)	0,0
	Всього:	27	Всього:	27
6	ВИРОЩУВАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ В ІНОКУЛЯТОРІ 50 л			
6.1	Стерильне ПС	27	Посівний матеріал	27
6.2	Посівний матеріал з колб на качалках	3		
6.3	Втрати (частка)	0,1		3
	Всього:	30	Всього:	30
7.	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ В ФЕРМЕНТЕРІ НА 500 л			
7.1	Гідролізат казеїну	2,750	Нестерильне ПС	247,5
7.2	Триптон	1,375		
7.3	Дріжджовий автолізат	0,275		
7.4	КСІ	0,275		
7.5	K ₂ HPO ₄	4,124		
7.6	Глюкоза	0,00055		
7.7	Вода	238,7		
	Всього:	247,5	Всього:	247,5
8	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ В ІНОКУЛЯТОРІ НА 50 л			
8.1	Нестерильне ПС	247,5	Стерильне ПС	275
8.2	Конденсат	27,5	(втрат немає)	0,0
	Всього:	275	Всього:	275
9	ВИРОЩУВАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ В ІНОКУЛЯТОРІ 50 л			
9.1	Стерильне ПС	275	Культуральна рідина	271,7
9.2	Посівний матеріал	27		
9.3	Втрати (частка)	0,1		30,3
	Всього:	302	Всього:	302

Оскільки, кількість культуральної рідини згідно матеріального балансу (271,7 л) співпадає із кількістю культуральної рідини, розрахованої відповідно

до п. 1.4 (271,7 л) розрахунку партій продукту, вважаємо, що матеріальний баланс зроблено вірно.

6.4 Підбір та розрахунок ферментаційної апаратури

6.4.1 Уточнюючий розрахунок кількості ферментерів

Уточнюючий розрахунок проводиться на основі продуктового розрахунку та матеріального балансу з метою уточнення коефіцієнтів заповнення обладнання.

Приблизний загальний геометричний об'єм ферментерів при заданому $K_3=0.6$:

$$V_{гф} = V_{ф}/K_3 = 302/0.6 = 500 \text{ л};$$

Вибираємо з таблиці (див. Дод) найближчий за номінальним об'ємом ферментер: $V_{нф} = 500 \text{ л}$.

Кількість виробничих ферментерів при заданому K_3 :

$$N_{фр} = V_{гф}/V_{нф} = 500/500 = 1 \text{ – приймаємо } 1.$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення ферментера:

$$K_{зф} = V_{ф}/(V_{нф} \times N_{ф}) = 302/500 \times 1 = 0,6$$

Оскільки коефіцієнт заповнення не перевищує заданих меж (0,5–0,65), то вибраний нами ферментер можна вважати достовірним.

6.4.2 Уточнюючий розрахунок кількості посівних апаратів

Приблизний загальний геометричний об'єм посівного апарата при заданому $K_{па}=0.6$:

$$V_{гпа} = V_{па}/K_{па} = 30/0.6 = 50 \text{ л};$$

Вибираємо з таблиці (див. Дод. 4) найближчий за номінальним об'ємом посівний апарат: $V_{нпа} = 50 \text{ л}$.

Кількість посівних апаратів при заданому $K_{па}$:

$$N_{пар} = V_{гпа}/V_{нпа} = 50/50 = 1 \text{ – приймаємо } 1.$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення вибраних з таблиці посівних апаратів:

$$K_{зпа} = V_{па}/(V_{нпа} \times N_{пар}) = 30/(50 \times 1) = 0.6;$$

Оскільки коефіцієнт заповнення не перевищує заданих меж (0.5–0.65), то приймаємо до установки посівних апаратів $N_{\text{пар}} + 1$ запасний.

6.4.3 Уточнюючий розрахунок кількості качалочних колб

Для засівання інокулятора об'ємом 50 л, посівний матеріал (2,78л) отримують вирощуючи продуцента в колбах на качалках. Приблизний загальний необхідний об'єм качалочних колб при заданому $K_{\text{колб}} = 0,2$

$$V_{\text{Гколб}} = V_{\text{колб}} / K_{\text{колб}} = 3 / 0,2 = 15$$

$$N_{\text{колб}} = V_{\text{Гколб}} / V_{\text{нколб}} = 15 / 0,75 = 20$$

6.4.4 Розрахунок кількості реакторів-змішувачів для приготування та стерилізації ПС

Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача для приготування композиції А при $K_{зб} = 0,8$ становить:

$$V_{\text{ркА}} = V_{\text{кА}} / K_{зб} = 13,5 / 0,8 = 16,8 \text{ л.}$$

Знаходимо найближчий за номінальним об'ємом реактор-змішувач:

$$V_{\text{нркА}} = 20 \text{ л.}$$

Кількість реакторів-змішувачів при даному $K_{зр}$ становить, од:

$$N_{\text{ркА}} = V_{\text{ркА}} / V_{\text{нркА}} = 16,8 / 20 = 0,84 - \text{приймаємо } 1.$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора-змішувача:

$$K_{зр} = V_{\text{кА}} / V_{\text{нркА}} \times N_{\text{ркА}} = 13,5 / 20 \times 1 = 0,7.$$

Дане значення $K_{зр}$ знаходиться в прийнятих межах (0,7 – 0,85).

Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача для приготування композиції А на стадії виробничого біосинтезу при $K_{зб} = 0,8$ становить:

$$V_{\text{ркА}} = V_{\text{кА}} / K_{зб} = 137,5 / 0,8 = 171,8 \text{ л.}$$

Знаходимо найближчий за номінальним об'ємом реактор-змішувач:

$$V_{\text{нркА}} = 200 \text{ л.}$$

Кількість реакторів-змішувачів при даному $K_{зр}$ становить, од:

$$N_{\text{ркА}} = V_{\text{ркА}} / V_{\text{нркА}} = 171,8 / 200 = 0,85 - \text{приймаємо } 1.$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора-змішувача:

$$K_{зр} = V_{\text{кА}} / V_{\text{нркА}} \times N_{\text{ркА}} = 171,8 / 200 \times 1 = 0,85.$$

Дане значення $K_{зр}$ знаходиться в прийнятих межах (0,7 – 0,85).

Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача для приготування композиції Б на стадії виробничого біосинтезу при $K_{зб} = 0,8$ становить:

$$V_{ркБ} = V_{кБ}/K_{зб} = 137,5/0,8 = 171,8 \text{ л.}$$

Знаходимо найближчий за номінальним об'ємом реактор-змішувач:

$$V_{нркБ} = 200 \text{ л.}$$

Кількість реакторів-змішувачів при даному $K_{зр}$ становить, од:

$$N_{ркА} = V_{ркБ}/V_{нркБ} = 171,8/200 = 0,85 - \text{приймаємо } 1.$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора-змішувача:

$$K_{зр} = V_{кБ}/V_{нркБ} \times N_{ркБ} = 171,8/200 \times 1 = 0,85.$$

Дане значення $K_{зр}$ знаходиться в прийнятих межах (0,7 – 0,85).

РОЗДІЛ 7. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Специфікація обладнання зображеного на апаратурній схемі наведена у таблиці 7.1.

Таблиця 7.1

Специфікація обладнання допоміжних робіт, ділянки біосинтезу та ділянки післяферментаційних процесів

Позиція	Найменування	Кількість	Технічні характеристики, виробник
P-1	Реактор-змішувач для приготування робочого розчину «NeomoscanCPalka 160»	1	Реактор-змішувач об'ємом 250 л, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (100-450 об/хв), сталь 12X18Н10Т. Виробник: «Biotechno» (Росія) ³³
Д-2,3,9,10, 15,16	Дозатор	3	Технічні та лабораторні ваги для дозування компонентів середовищ та «NeomoscanCPalka 160» для приготування мийного засобу. Виробник: «Химтест» (Україна) ³⁴
3-4	Збірник для відновлення мийного засобу	1	Збірник об'ємом 250 л, сталь AISI 316. Виробник: «Biotechno» (Росія) ³³
H-5	Насос відцентровий	1	Насос горизонтальний відцентровий Debem MB 100. Максимальна продуктивність 1,0 м ³ /год, матеріал поліпропілен (PP/PVDF). Виробник: «Debem» (Україна) ³⁵
P-6	Резервуар з інертним газом	1	Кріогенна ємність вертикального виконання, гідравлічним об'ємом 4800 літрів, робочим тиском 18,5 бар, укомплектована всім необхідним, запірною і регулюючою арматурою, а також приладами КВП. ³⁶
Ф-7	Фільтр грубої очистки	1	Фільтр (P)–GSLN. Фільтруючий матеріал – міроскловолокно, швидкість фільтрування – 0,025 м/с, E = 95 %. Виробник: «Donaldson» (США) ³⁷
Ф-8	Фільтр тонкої очистки	1	Фільтр (P)–GSLN. Фільтруючий матеріал – міроскловолокно, швидкість фільтрування – 0,025 м/с, E = 99.9 %. Виробник: «Donaldson» (США) ³⁷

					НУХТ БТЕК 04.01.23. ДП ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.	Кутрик І.В.				Літ.	Арк.	Аркушів
Консультант						63	103
Керівник	Гудзенко О.В.				Кафедра БТМ 63		
Зав.кафедри	Пирог Т.П.						
<i>РОЗДІЛ 7. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ</i>							

Продовження табл.7.1

ІФ-11,12,17,18,21,24	Індивідуальні фільтри	6	Фільтр повітряний UltradepthIP-SRF. Фільтруючий матеріал - боросилікат, діапазон температур від -20 до 200 °С, ступінь очищення повітря фільтром становить 99,999 %.. Виробник: «Donaldson» (США) ³⁷
Р-13,14	Реактор-змішувач	2	Реактор-змішувач об'ємом 50 л, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (20-1000 об/хв), сталь 12Х18Н10Т. Виробник:«Biotechno» (Росія).
Р-19,20	Реактор-змішувач	2	Реактор-змішувач об'ємом 150 л, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (20-1000 об/хв), сталь 12Х18Н10Т. Виробник:«Biotechno» (Росія) ³³
ІН-23	Інокулятор	1	Інокулятор об'ємом 50 л, оснащений сорочкою, барботером, пробовідбірником і лопатевою мішалкою (20-300 об/хв), сталь 316L. «Biotechno» (Росія) ³³
ФР-25	Ферментер	1	Ферментер об'ємом 500 л, оснащений сорочкою, пробовідбірником і перемішувальним пристроєм (до 200 об/хв), сталь AISI 316L. Виробник:«Biotechno» (Росія) ³³
ПЗ-26	Пристрій забірний	1	Пристрій для забору повітря, оснащений металевою сіткою для видалення механічних забруднень
Ф-27	Фільтр грубої очистки	1	Панельний комірковий фільтр (G4). Фільтруючий матеріал – екологічно чистий рулонний матеріал, 100% поліестер (polyester), E = 90 %. Виробник: фірми LUXFILTER (Росія)
В-28	Вентилятор	1	Вентилятор серії МВ Продуктивність: 500 – 30000 м3/год Повний тиск: 250 – 1600 Па Виробник: «Атон Сервіс» (Україна)
ГФ-29	Теплообмінник	1	Теплообмінник для нагрівання/охолодження повітря SystemairPGK. Робочий тиск 1,6 МПа. Виробник: «Systemair» (Швеція).
Ф-30	Фільтр попередньої очистки	1	Фільтр F9. Фільтруючий матеріал – мікроскловолокно з алюмінієвими розділювачами, E = 98%. Виробник: «Generalfilter» (Італія).

Продовження табл.7.1

Ф-31	Фільтр тонкої очистки	1	Фільтр Н14. Фільтр складається з корпусу, який представляє собою алюмінієвий або оцинкований профіль, всередині якого покладений фільтруючий матеріал у вигляді гофри. Е = 99,99%. Виробник: фірми Luxfilter (Росія)
Ф-32	Фільтр ультратонкої очистки з ламінізатором	1	Фільтр U17. Фільтр складається з корпусу, який представляє собою алюмінієвий або оцинкований профіль, всередині якого покладений фільтруючий матеріал у вигляді гофри. Е = 99,999995%. Поверх фільтруючого матеріалу натягнута ламінізаційна тканина. Виробник: фірми Luxfilter (Росія)
Н-33 Н-36 Н-38 Н-40 Н-42	Насос вихровий безсальниковий з магнітною муфтою	5	Насос вихровий металлические вихревые Матеріал: нержавіюча сталь AISI 316. Продуктивність до 6 м ³ /год. Виробник: «Liverani» (Італія).
ПФ-34	Піщаний фільтр	1	Піщаний фільтр для води тип WGSF 10, Виробник: Aquina Країна виробник: Німеччина Швидкість фільтрації 10 літр/хв
ВФ-35	Вугільний фільтр	1	Фільтр ECOSOFTFPA 2162 CG125 Витрата води на регенерацію 0.8-1.9 м ³ . Країна-виробник Україна Продуктивність 10 л/ч
ІМ-37	Іонообмінний модуль	1	Двох колонна система пом'якшення води, що містить 5 кг кварцового піску та 75 л іонообмінних смол. Пом'якшувач повністю автоматичний, запускається одинарною головкою із подвійною системою керування, яка контролює виробництво пом'якшеної води та час роботи пом'якшувача. Номінальна продуктивність: 600 л/год
УЗО-39	Установка зворотнього осмосу	1	Система зворотного осмосу складається із однієї, двох та трьох колон діаметром 4 дюйми, що містять 2 осмотичні мембрани типу HIGHPOWER. Система підключена до ПК та містить вмонтований лічильник води, що дає можливість керувати та контролювати виробництво осмосу та концентрату. Номінальна продуктивність: 300-900 л/год Виробник: Тогау, Японія. Мембрана ТМН20А-430

Закінчення табл.7.1

З-41	Збірник	1	Збірник об'ємом відповідно 2 м ³ оснащений вбудованим теном для підтримування температури, сталь 12Х18Н10Т«Biotechno» (Росія). ³³
БД-43	Багатоступінчастий дистилятор	1	Багатоступінчастий дистилятор МЕСО ЗМЕ5 для отримання води для ін'єкцій Продуктивність по дистиляту 273-291 л / год
ЗБ-44	Збірник для розведення культуральної рідини з хінозолом	1	Збірник оснащений кришкою, нижнім спуском, перемішуючим пристроєм. Об'єм 300 л; н/сталь AISI 304, «Biotechno» (Росія) ³³
Н-45, Н-49	Насос відцентровий	2	Насос горизонтальний відцентровий Debet MB 100. Максимальна продуктивність 1,0 м ³ /год, матеріал поліпропілен (PP/PVDF). Виробник: «Debet» (Україна)
ЗБ-46	Збірник для хінозолу	1	Збірник оснащений кришкою, нижнім спуском, перемішуючим пристроєм. Об'єм 5 л; н/сталь AISI 304, «Biotechno» (Росія) ³³
Ц-47	Центрифуга	1	Центрифуга СЕРАZ 61/Z 61 GP Макс. швидкість – 17 тис.об/хв., продуктивність min/max л/год – 50/1500, «Biotechno» (Росія). ³³
МФ-48	Мембранно-фільтруючий модуль для мікро та ультрафільтрації	1	Установка для мікро- и ультрафільтрації УФ-401/402 Швидкість подачі – 144/284 л/хв «Biotechno» (Росія) ³³
ЗБ-50	Збірник для хлориду натрію	1	Збірник оснащений кришкою, нижнім спуском, перемішуючим пристроєм. Об'єм 300 л; н/сталь AISI 304, «Biotechno» (Росія) ³³
УМК-51	Установка для миття алюмінієвих ковпачків	1	Установка ПСК-2, виробник Росія
УМГП-52	Установка для миття гумових пробок	1	Установка IP-21, виробник Росія
УМФ-53	Установка для миття флаконів	1	Установка 574P-K із пароконденсаційним способом миття флаконів, виробник США
ФП-54	Фасувально-пакувальний апарат	1	Апарат для розливу, закупорки та фасування флаконів FPC60, виробник США

РОЗДІЛ 8. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

Технологічна схема виробництва стрептококового бактеріофагу Ср-1 *Streptococcus pneumoniae*R36A включає допоміжні роботи (санітарна підготовка виробництва, підготовка інертного газу та поживних середовищ) та технологічний процес (підготовка посівного матеріалу, біосинтез, післяферментаційні процеси).

Технологічну схему біосинтезу біомаси і післяферментаційних процесів наведено у графічній частині курсового проекту.

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

ДР 1.1. Підготовка мийних та дезінфікуючих засобів

ДР 1.1.1. Приготування миючого розчину засобу «NeomoscanCPalka 160»

Робочий розчин дезінфікуючого засобу «NeomoscanCPalka 160» концентрацією 1 % готують в збірнику. В збірник 250 л через об'ємно-ваговий, надходить 2 л засобу, який потім змішується з питною водою 198 л. Збірник оснащений сорочкою, що забезпечує підігрівання робочого розчину до оптимальної температури миття – 70-80 °С. Після 10 хвилинного перемішування отримаємо готовий підігрітий розчини для миття обладнання, що використовується на стадії ДР 1.3.1, ДР 6.1, ДР 7.1 та ДР 8.1.

ДР 1.1.2. Приготування дезінфікувального розчину «Хлорантоїн»

Кількість робочого розчину *Хлорантоїну* коцентрацією 0,2 %, для генерального прибирання становить 20,5 л. Миючий розчин готують в резервуарі об'ємом 30 л. Збірник оснащений сорочкою, що забезпечує підігрівання робочого розчину до оптимальної температури миття – 70-80 °С. Після 10 хвилинного перемішування отримаємо готовий підігрітий розчини після чого його охолоджують до оптимальної температури та використовують за призначенням на стадіях ДР 1.2.1, ДР 1.2.2.

					НУХТ БТЕК 04.01.23. ДП ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Кутрик І.В.			РОЗДІЛ 8. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	Літ.	Арк.	Аркушів
Консультант							67	103
Керівник		Гудзенко О.В.				Кафедра БТМ 67		
Зав.кафедри		Пирог Т.П.						

ДР 1.2. Підготовка виробничих приміщень

ДР 1.2.1 Щоденне прибирання виробничих приміщень

Щоденне прибирання приміщень, а саме миття підлоги, проводиться кожного дня вологим способом. При цьому із виробничої дільниці, лабораторний, побутових, підсобних приміщень видаляють готову продукцію, напівпродукти, відходи виробництва та невикористані матеріали. Відпрацьовані розчини надходять до знешкодження відходів (до ЗВ 17.1).

З метою контролю чистоти приміщення проводять мікробіологічний аналіз приміщення ($KУО < 800/см^2$).

ДР 1.2.2. Генеральне прибирання виробничих приміщень

Генеральне прибирання проводять раз на місяць або у разі потреби бактеріолога у випадку виявлення мікробної контамінації. Для обробки використовують 0,2 % робочий розчин засобу «Хлорантоїн» (від ДР 1.1.2). Для знезараження повітря після генерального прибирання вмикають бактерицидні лампи.

Після зміни миючого засобу проводять мікробіологічний контроль ($KУО < 300/см^2$), щоб пересвідчитись в його ефективності. Відпрацьовані розчини надходять до знешкодження відходів (до ЗВ 17.1).

ДР 1.3. Підготовка технологічного обладнання та комунікацій

ДР 1.3.1. Миття та ополіскування обладнання

Миття обладнання здійснюється автоматизовано, за допомогою СП-мойки, при цьому використовується мийний засіб в об'ємі 20% від геометричного об'єму обладнання. Обробку проводять 15-20 хвилин, після чого відпрацьований розчин подають на відновлення або зливають (ЗВ 17.1). Після обробки обладнання промивається питною водою таким же чином, відпрацьована вода йде на переробку.

ДР 1.3.2. Технічний огляд

Після миття та ополіскування обладнання проводиться візуальний технічний огляд з метою виявлення неущільнень в комунікаціях та запірній

апаратурі на обладнанні. Для усунення неущільнень проводять підтягування різьбових з'єднань .

ДР 1.3.3. Перевірка на герметичність

Закривають усю запірну арматуру ємнісного обладнання і подають інертний газ до рівня надлишкового тиску $P = 0,1-0,2$ МПа. Далі перекривають вентиль подачі газу і фіксують показання манометра на кришці апарата та час витримки (30-60 хв) в операційному журналі. Апарат вважається герметичним, якщо падіння тиску не перевищує 0,01 МПа. В іншому випадку здійснюють пошук неущільнень за допомогою галогенових течієпошукачів.

В апарат вносять невелику кількість легкої галогенвмісної речовини (чотирихлористий карбон – CCl_4), знову закривають усю запірну арматуру. Апарат нагрівають до температури $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ і збільшують тиск до 0,2 МПа. Пари галогенвмісної речовини проникають через неущільнення і виявляються у разі наближення щупа течієпошукача до них. Тривалість операції – 1,5-2 год. У разі виявлення неущільнень здійснюють їх ліквідацію – підтягують різьбове з'єднання або міняють ущільнюючу прокладку.

ДР 1.3.4. Стерилізація обладнання

Для проведення стерилізації апарата в сорочку подають глуху пару і нагрівають його до $80-90^{\circ}\text{C}$. Відкривають усю запірну арматуру на відкритих трубних закінченнях та підведених до апарата комунікаціях і подають насичену пару безпосередньо в апарат через нижній спуск, також відкривають вентиль виходу відпрацьованого інертного газу для видалення газу з апарату. При досягненні температури стерилізації $125-131^{\circ}\text{C}$ всю запірну арматуру, крім парової, закривають і витримують протягом 1 години. Після витримання закривають запірну арматуру подачі пари в апарат, потім подають інертний газ, а в сорочку подається холодна вода. Процес охолодження здійснюють до досягнення температури $30-40^{\circ}\text{C}$ і надлишкового тиску $P = 0,003-0,005$ МПа.

ДР 1.4. Підготовка персоналу

ДР 1.4.1 Навчання персоналу

Весь персонал, включно з людьми, зайнятими складанням і технічним обслуговуванням, має проходити систематичне навчання щодо правильного виробництва продукції в асептичних умовах, гігієни і основ мікробіології.

ДР 1.4.2 Санітарно-гігієнічна підготовка персоналу

Для миття рук, персонал використовує туалетне або господарське мило, для дезінфекції – 76% етиловий спирт.

ДР 2. Підготовка інертного газу

ДР 2.1 Попереднє очищення інертного газу

Очищення азоту який подається з резервуару на фільтр грубої та тонкої очистки, фільтруючими перегородками яких є мікроскловолокно.

ДР 2.2 Очищення інертного газу на індивідуальних фільтрах

Очищення азоту який подається в апарати на фільтр індивідуальної очистки, фільтруючою перегородкою якого є боросилікат.

ДР 3. Приготування і стерилізація поживних середовищ

ДР 3.1 Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках.

На першій стадії необхідно приготувати 1,2 л поживного середовища, вміст компонентів для даного об'єму середовища наведено в таблиці 5.1.

Таблиця 8.1

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 2,780 л середовища

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 2,78 л середовища, г (мл)	Композиція	Об'єм композиції V, л
Гідролізат казеїну	10	27,8	А	1,390
Триптон	5	13,9		
Дріжджовий автолізат	1	2,78		
Глюкоза	0,002	0,006		
Вода		1345,6		
КСІ	1	2,78	Б	1,390
K ₂ HPO ₄	15	41,7		
Вода		1345,4		
Разом				2780

ДР 3.1.1 Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 27,8 г гідролізату казеїну, 13,9 г триптону, 2,78 г дріжджового автолізату та 0,006 г глюкози. Наважку вносять в колбу об'ємом 2 л, додають 1345,6 мл питної води, перемішують, колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112°C впродовж 30 хв.

ДР 3.1.2 Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 2,78 г КСІ та 41,7 г K_2HPO_4 . Наважку вносять в колбу об'ємом 2 л, додають 1345,4 мл питної води, перемішують, колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°C впродовж 40 хв.

ДР 3.2 Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування в посівному апараті об'ємом 50 л

Необхідну кількість компонентів для приготування посівного матеріалу в інокуляторі ми можемо побачити в *табл. 5.2*

Склад композицій для стерилізації поживного середовища інокулятора 50 л

Таблиця 8.2

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 27 л середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції V, л
Гідролізат казеїну	10	0,270	А	13,5
Триптон	5	0,135		
Дріжджовий автолізат	1	0,027		
Глюкоза	0,002	0,00005		
Конденсат		1,36		
Вода		11,7		
КСІ	1	0,027	Б	13,5
K_2HPO_4	15	0,405		
Конденсат		1,34		
Вода		11,69		
Разом				27

ДР 3.2.1 Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 270 г гідролізату казеїну, 135 г триптону, 27 г дріжджового автолізату та 0,05 г глюкози. Наважку вносять в збірник

об'ємом 50 л, додають 11,7 л питної води, перемішують і стерилізують в збірнику при температурі 112°C впродовж 30 хв.

ДР 3.2.2 Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 27 г КСІ та 405 г КН₂РО₄. Наважку вносять в збірник об'ємом 50 л, додають 11,69 л питної води, перемішують, подають в інокулятор і стерилізують при температурі 131°C впродовж 40 хв.

ДР 3.3. Приготування і стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу.

Необхідно приготувати 275 л поживного середовища, вміст компонентів для даного об'єму середовища наведено в таблиці 5.3.

Таблиця 8.3

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 275 л середовища

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 275 л середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції V, л
Гідролізат казеїну	10	2,750	А	137,5
Триптон	5	1,375		
Дріжджовий автолізат	1	0,275		
Глюкоза	0,002	0,00055		
Конденсат		13,75		
Вода		119,4		
КСІ	1	0,275	Б	137,5
К ₂ НРО ₄	15	4,124		
Конденсат		13,75		
Вода		119,3		
Разом				275

ДР 3.3.1 Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 2750 г гідролізату казеїну, 1375 г триптону, 275 г дріжджового автолізату та 0,55 г глюкози. Наважку вносять в збірник об'ємом 150 л, додають 119,4 л питної води, перемішують, і стерилізують при температурі 112°C впродовж 30 хв.

ДР 3.3.2 Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 275 г КСІ та 4124 г КН₂РО₄. Наважку вносять в збірник об'ємом 150 л, додають 119,3 мл питної води, перемішують.

Після розчинення солі композиції Б подаються в ферментер об'ємом 500 л, де стерилізують композицію подачею гострої пари 131⁰С упродовж 40 хв.

ДР 4. Підготовка вентиляційного повітря для цеху підготовки лікарського препарату

Контроль мікробної обнасіненості повітря виробничих приміщень проводять за допомогою «Прибору для бактеріологічного аналізу повітря» системи Кротова не рідше 2-3 разу в тиждень. Вміст аерозольних часток визначають за допомогою оптичного лічильника часток 1 раз в тиждень.

ДР 4.1 Забір атмосферного повітря

При визначенні місця забору зовнішнього повітря необхідно враховувати існуючі та можливі джерела аерозольних і газоподібних забруднень (димарі, автотранспорт, газоподібні промислові викиди, квітучі рослини та ін). Забір повітря проводиться за допомогою повітрязабірника. Забір атмосферного повітря відбувається на висоті близько 5 м.

ДР 4.2 Грубе очищення повітря

На стадії попереднього очищення повітря видаляється основна маса великих частинок пилу діаметром понад 10 мкм. В якості фільтрів попереднього очищення використовують – фільтри грубої очистки G 4 , злегка змащене пружне скловолокно спеціального плетіння. Всередині фільтра розташовані дві решітки, між якими поміщають фільтруючий матеріал. Ступінь очищення становить $E = 90\%$.

ДР 4.3 Стабілізація термодинамічних показників

Повітря за допомогою вентилятора подається до кожухотрубного теплообмінника, охолоджується за допомогою хладагенту фреону або підігрівається до 17–18 °С в залежності від пори року, коли проводиться забір повітря.

ДР 4.4 Попередня фільтрація на фільтрах тонкої очистки

Попередня фільтрація відбувається на фільтрі F 9, який призначений для попередньої очистки повітря від великодисперсних часток розміром більше 5

мкм (великий пил, продукти корозії), а також для захисту більш ефективного фільтру тонкої очистки. Ступінь очищення повітря 98%.

ДР 4.5 Очищення повітря на фільтрах тонкої очистки

Очищення повітря від пилу та мікроорганізмів здійснюється на фільтрах особливо тонкої очистки Н 14. Після нього повітря направляється до приміщень класів чистоти В.

ДР 4.6 Очищення повітря на фільтрах ультратонкої очистки

Очищення повітря здійснюється на фільтрах особливо ультратонкої тонкої очистки U17. Ступінь очищення повітря 99,999995%. Після нього повітря направляється до локальної зони класу чистоти А.

ДР 5 Підготовка води очищеної та ін'єкційної

Підготовка води для виробництва лікарських засобів повинна здійснюватися у відповідності до вимог ДФУ до води очищеної. Система водопідготовки призначена для отримання води очищеної з метою подальшого її використання в технологічному процесі.

ДР 5.1 Забір води

Забір води здійснюється з міського трубопроводу за допомогою забірників, передається в систему за допомогою насоса.

ДР 5.2 Груба фільтрація

Груба фільтрація дозволяє видаляти з води частинки розміром більше SO-100 мкм. Як устаткування, для грубої фільтрації використовуються фільтри з піщаним набиванням. Вибір сорту піску залежить від результатів аналізу води з урахуванням сезонних змін. Справність фільтра контролюється різницею тиску води до і після фільтру.

ДР 5.3 Фільтрування через вугільний фільтр

Після грубої очистки відфільтровують воду на фільтрі з активованим вугіллям від найбільш шкідливих домішок, таких як вільний хлор, для подальшого пропускання її через системи зворотного осмосу.

ДР 5.4 Пом'якшення води

Пом'якшення дозволяє понизити жорсткість води за рахунок видалення іонів кальцію і магнію перед подачею води для очистки на мембранах зворотного осмосу. Як устаткування на цій стадії можуть служити автоматичні пом'якшувачі – іоннообмінні модулі, що працюють за принципом заміни іонів кальцію і магнію іонами натрію. Пом'якшувачі періодично регенеруються розчином хлориду натрію. Справність роботи пом'якшувача можна контролювати періодичним виміром жорсткості води на вході і на виході.

ДР 5.5 Одержання води очищеної на установці зворотного осмосу

Вода після попередньої очистки подається на колони зворотного осмосу, в яких відбувається очищення води від розчинених в ній солей із селективністю не менше ніж 99,00 %. Обладнання являє собою системи мембран. Мембрани мають розміри пор 0,0005–0,001 мкм. Для перебігу процесу необхідно створити надлишковий тиск (тиск, вищий за осмотичний) для примусового фільтрування води крізь мембрану, що робиться за допомогою однопотокowego насосу. Величина осмотичного тиску прямо пропорційна до концентрації розчинених речовин та абсолютної температури (температури за шкалою Кельвіна). Для прісної води, що містить солей 0,5–1,0 г/л, осмотичний тиск дорівнює 0,2–0,3 мПа. Для збільшення ефективності процесу використовується тангенціальна подача води до поверхні мембрани при рециркуляції. Контроль систем зворотного осмосу здійснюється вимірюванням питомої електричної провідності води на виході з системи.

ДР 5.6 Зберігання води

Автоматична система моніторингу стану води очищеної 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 5.7 Одержання ін'єкційної води

Воду для ін'єкцій одержують з води очищеної шляхом чотирьохступеневої дистиляції.

ДР 6. Підготовка флаконів

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 атоматичного миття флаконів типу ПСК-2. 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, 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. 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. Контроль температури здійснюється

порееструючому 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. 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. Після розтарення проводять попередній перегляд і сортування гумових пробок, відбраковуючи гумові пробки з видимими дефектами: відхиленням та зовнішнім виглядом, відтінок кольору, геометричні розміри на фасувальному столі. 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; II етап – ополіскування; III етап – силіконування; IV етап – стерилізація і сушіння.

ДР 7.1. Миття пробок

У камеру миття вручну порціями завантажують гумові. Для миття використовують миючий засіб «NeomoscanCPalka 160». Процес I етапу миття ведеться при температурі очищеної води від 44°C до 46°C 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). При температурі не вище 40°C промивні води направляють у каналізацію. Промивні води зливають протягом 10 хв.

ДР 7.2. Ополіскування пробок

Ополіскування пробок очищеною водою ведуть протягом 32 хв з переливом через зливальний карман. Температура очищеної води від 44°C до 46°C, контроль температури – за допомогою приладу реєструючого.

ДР 7.3. 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°C до 95°C. Контроль температури – за допомогою приладу реєструючого. Загальна тривалість процесу ополіскування, починаючи, з досягнення заданої температури – 24 хв.

ДР 7.4. Стерилізація і сушіння пробок

У посудину подають пару для нагрівання пробок до температури від 120°C до 124°C 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°C. 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. Ємкості попередньо обробляють розчином перекису водню (3,0%) і розчином спирту етилового (76%).

ДР 8. Підготовка алюмінієвих ковпачків

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. Брак збирають в контейнери, маркують етикетками і відправляють на утилізацію.

ДР 8.1. Миття і ополіскування ковпачків

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 «NeomoscanCPalka 160». Температура миття від 35 до 60 °С. Миття продовжується 22 хв і задається програмою. Через 22 хв включається клапан доливання очищеної води. Ополіскування проводять водою очищеною з температурою від 35 до 60 °С протягом 45 хв.

ДР 8.2. Стерилізація ковпачків

Проводяться в апараті для повітряної термообробки 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. Тривалість операції підготовки алюмінієвих ковпачків – від 7,5 до 8,0 год.

ДР 9. Приготування допоміжних розчинів

Допоміжні розчини готують з метою полегшення в подальшому технологічному процесі відділення бактеріальних клітин від цільового продукту із найменшим відсотком втрат.

ДР 9.1. Підготовка розчину хінозолу

Для приготування розчину консерванту хінозолу на технічних вагах зважують 27,17 г порошку та розводять у 2717 мл питної води в ЗБ 46.

ДР 9.2 Підготовка розчину NaCl

Для приготування розчину хлориду натрію на технічних вагах зважують 2,43 г NaCl, і розводять в 270 л очищеної води в ЗБ 50.

ТП 10. Підготовка посівного матеріалу

ТП 10.1. Підготовка колекційної культури.

Для одержання посівного матеріалу використовують вихідний штам продуцента. Культуру *S. pneumoniae*R36А зберігають на скошеному МПА. Кожні 3-4 місяця здійснюють пересіви. Завжди при роботі з колекційною культурою дотримуються правил асептики.

ТП 10.2. Одержання робочої культури на агаризованих середовищах.

Колекційну культуру *S. pneumoniae*R36А, що зберігається в пробірках з МПА, розсівають до ізольованих колоній на чашки Петрі і вирощують при температурі 37°C упродовж 24 годин.

ТП 10.3. Вирощування культури в колбах на качалках.

В колбу з композицією А (від ДР 3.1.1) в асептичних умовах вносять композицію Б (від ДР 3.1.2). Далі розливають у 20 стерильних качалочних колб (на 750 мл) по 150 мл у кожному.

У пробірку з робочою культурою *S. pneumoniae*R36А, вирощену на МПА, вносять 5 мл стерильної води та роблять змив культури. Одержану суспензію вносять у колби з стерильним поживним середовищем. Зазначимо, що для засіву однієї колби використовують суспензію одержану з однієї пробірки. Тривалість вирощування становить 48 годин, температура 37°C, частота обертання качалки – 20 об/хв. Після закінчення культивування та проведення мікробіологічного контролю культуральну рідину зливають в засівну колбу на 5 л. Також визначають концентрацію біомаси, яка повинна становити 0,5-0,6 г/л.

ТП 10.4 Вирощування культури в посівному апараті 50 л

Вміст колб асептично переноситься в посівний апарат з підготовленим поживним середовищем. Тривалість культивування складає 24 год при 30°C. Кожні 4 години з інокулятора відбирають проби культуральної рідини для мікробіологічного контролю, визначення концентрації біомаси, яка для посівного матеріалу на 24 годину культивування повинна становити 0,5 - 0,6 г/л, концентрації джерела вуглецю та азоту.

ТП 11. Підготовка посівного матеріалу бактеріофагу.

ТП 11.1 Підтримання колекційної культури бактеріофага

Штам бактеріофага СР-1 зберігається у вигляді музейної культури при температурі 4°C

ТП 11.2 Суспендування фагу

Колекційна культура бактеріофагу стрептококового СР-1 знаходиться в ліофілізованому вигляді. Для активації культури готують суспензію фагу з розведенням 10^{-3} . Для цього у пробірку з фагом додають фізіологічний розчин та ретельно перемішують для гомогенізації.

ТП 11.3 Вирощування фагу на культурі *S.pneumoniae*

На пробірки попередньо засіяні культурою *S.pneumoniae*вносять суспензію фага та культивують 2-3 год у термостаті при температурі 37°C. Контролюють відсутність сторонньої мікробіоти. Після культивування проводять змив фізіологічним розчином, утворену суспензію переливають у центрифужні стаканчики дотримуючись умов асептики.

ТП 11.4 Центрифугування

Далі проводять центрифугування на швидкості 4 тис. об/хв. Протягом 15 хвилин. Метою центрифугування є осадження обломків клітин стрептокока. Надосадову рідину відбирають для здійснення подальших маніпуляцій, лізовані клітини утилізують.

ТП 11.5 Фільтрування надосадової рідини

Після центрифугування отриману надосадову рідину фільтрують через фільтр з діаметром пор 0,2 мкм.

ТП 12. Біосинтез

ТП 12.1 Виробниче культивування

Виробниче культивування проводять у ферментері з об'ємом 500 л з робочим об'ємом – 302 л. У ферментер з композицією Б (від ДР 3.3.2) з збірника подають композицію А (від ДР 3.3.1), посівний матеріал від інокулятора, та посівний матеріал бактеріофагу (від ТП 11.5). Ферментер обладнаний датчиком для відстежування рівня рН.

Тривалість культивування складає 35 год при 37°C та за постійної подачі інертного газу. Кожні 4 год з ферментера відбирають проби культуральної рідини для мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси. В кінці культивування в лізаті бактерій визначають кількість бактеріофага (БУО/мл).

ТП 13. Попередня обробка культуральної рідини

Попередню обробку культуральної рідини проводять з метою спрощення виділення бактеріофагів. Тому культуральну рідину попередньо обробляють розчином хінозолу для остаточного лізису клітин *S.pneumoniae*, які не були лізовані під час біосинтезу. Також хінозол виступає як консервант.

ТП 13.1. Обробка культуральної рідини розчином хінозолу.

Біомасу (271,7 л) з ферментера об'ємом 500 л подають до збірника (ЗБ-44) об'ємом 300 л. За допомогою об'ємно-вагового дозатора подають 2717 мл розчину хінозолу, та витримують 15-30 хвилин при постійному перемішуванні.

ТП 14. Відділення біомаси фагів

ТП 14.1. Центрифугування культуральної рідини

Культуральна рідина з збірника (ЗБ-44) подається у центрифугу (Ц-47), де відбувається центрифугування при 5000 об/хв, тривалість обробки становить 15 хв. Фугат, що утворився після закінчення процесу передають на фільтрацію до ТП 6.1

ТП 15. Концентрування та очищення бактеріофагів

ТП 15.1. Мікрофільтрація

Центрифугат від Ц-47 подається до стандартизованої мікрофільтраційної установки (МФ-48). Під час мікрофільтрації розчин проходить через фільтр з діаметром пор 0,22 мкм, очищується від клітинного дебрису що не був відділений під час центрифугування, а також від залишків поживного середовища.

ТП 15.2. Ультрафільтрація

За допомогою вмонтованих в ультрафільтраційну установку насосів відфільтрована попередньо рідина надходить до наступного фільтруультрафільтраційного модуля. Ультрафільтрація проводиться на мембранах з діаметром пор 0,05 мкм, що дозволяє затримати білкові сполуки, що не були затримані при мікрофільтрації і на виході отримати розчин фаголізату.

ТП 16. Пакування, маркування, відвантаження

Пакування, маркування та відвантажування здійснюється в (ФП-54). На цій стадії, препарат розливається у скляні флакони по 20 мл, які закриваються гумовими пробками та опломбовуються металевими кришками, наліплюються етикетки, пакуються в коробки в які вкладаються інструкції до застосування. Готовий продукт відвантажується на склад.

ЗВ 17. Знешкодження та переробка відходів.

ЗВ 17.1. Знешкодження рідких відходів.

Оскільки виробництво не є великотоннажним, відходи складають не великі об'єми, а також не є токсичними як з мікробіологічної точки зору (передбачена обробка дезінфікуючим розчином), так і з хімічної (не використовуються агресивні речовини), тому проводити знешкодження рідких відходів немає необхідності.

ЗВ 17.2. Знешкодження твердих відходів.

Тверді відходи від подаються на утилізацію.

РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

9.1. Постадійний контроль виробництва бактеріофагу стрептококового

Постадійний контроль виробництва цільового продукту наведено в таблиці 9.1.

Таблиця 9.1

Карта постадійного контролю біосинтезу *Streptococcus pneumoniae*R36A з метою одержання стрептококового бактеріофагу

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю та показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та відбору проб	Нормативні значення показника
1	2	3	4	5
Кх 1.1.1 Приготування робочого розчину «Вімолу»	Концентрація засобу «Вімол»	Хімічний метод	Після приготування розчину	C=1%
Кх 1.1.2 Приготування робочого розчину Хлорантоїну	Концентрація Хлорантоїну	Хімічний метод	Після приготування розчину	C=0,2%
Км 1.2.1 Щоденне прибирання виробничих приміщень	Підлога, обладнання. Чистота	Візуальний огляд	Після прибирання	Відсутність бруду та пилу, КУО <800/см ²
Км 1.2.2. Генеральне прибирання виробничих приміщень	Підлога, стіни, вікна, двері, обладнання. Чистота	Візуальний огляд, мікробіологічний контроль	Після прибирання	Відсутність бруду та пилу, КУО <300/см ²
Кт 1.3.1 Миття та ополіскування обладнання	Концентрація мийного розчину, час миття, температура, чистота	Термометр технічний, годинник	Під час операції	C=2%, t=45°C, τ=1 год, чисте обладнання

НУХТ БТЕК 04.01.23. ДП ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.	Кутрик І.В			
Консультант				
Керівник	Гудзенко О.В.			
Зав.кафедри	Пирог Т.П.			
РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА			Літ.	Арк.
				84
			Кафедра БТМ 84	

Кт 1.3.2 Технічний огляд	Міцність з'єднань	Перевірка на міцність з'єднань	Перед перевіркою на герметичність	Відсутність послаблення між частинами на обладнанні
Кт 1.3.3 Перевірка на герметичність	Герметичність обладнання, час перевірки	Манометр технічний, годинник	Тиск визначається безперервно протягом перевірки	$P=0,1-0,2$ МПа, $\tau=30-60$ хв
Кт 1.3.4 Стерилізація обладнання	Температура стерилізації, тиск під час стерилізації, тривалість	Технічний манометр, годинник	Тиск визначається протягом стерилізації	$t=110^{\circ}\text{C}$, $P=0,2$ МПа, $\tau=30-60$ хв
Кт 2.1 Попереднє очищення інертного газу	Очищене газу, ступінь очищення газу на виході з фільтра, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеню очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки у фільтрі тонкого очищення	$E=95\%$, тиск згідно паспорту
Кт 2.2 Очищення інертного газу на індивідуальних фільтрах	Очищений газ, ступінь очищення інертного газу	Перевірка ступеню очищення інертного газу згідно паспорту фільтра	Під час очищення інертного газу на індивідуальних фільтрах	$E=99,999\%$
Кт, Км 3.1.1, 3.2.1, 3.3.1 Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А Тиск, температура, час, відсутність мікробіоти	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t=112^{\circ}\text{C}$, $\tau=30$ хв, $P=0,05$ МПа, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.1.2, 3.2.2, 3.3.2 Приготування і стерилізація композиції Б	Композиція Б Тиск, температура, час, відсутність мікробіоти	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t=131^{\circ}\text{C}$, $\tau=40$ хв, $P=0,15$ МПа, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1 Підтримання колекційної культури	Колекційна культура, температура, мікробіологічна чистота культури	Холодильник	Мікробіологічний контроль	$t=4^{\circ}\text{C}$, відсутність сторонньої мікробіоти
Км, Кт 4.2 Вирощування культури в пробірках на МПА	Робоча культура <i>S.pneumoniae</i> , тривалість культивування, температура, мікробіологічна чистота	Датчик температури, таймер, мікроскопіювання, метод Коха	Температура контролюється під час культивування, мікробіологічний контроль після культивування	$t=37\pm 2^{\circ}\text{C}$, $\tau=24$ год, Відсутність сторонньої мікробіоти

Кт, Км 4.3 Вирощування культури в колбах на качалках	Посівний матеріал , тривалість вирощування, температура, частота обертів качалки, мікробіологічна чистота культури, концентрація біомаси	Годинник, термометр технічний, технічний тахометр, мікробіологічний контроль	Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування, мікроскопіювання – кожні 8 годин	$t = 37 \pm 2 \text{ } ^\circ\text{C}$, $\tau = 48 \text{ год}$, $\omega = 20 \text{ об/хв}$, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 4.4 Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 12 л	Посівний матеріал , тривалість вирощування, температура, мікробіологічна чистота культури, концентрація біомаси	Мікробіологічний контроль, термометр технічний, годинник	Температура контролюється і підтримуються автоматично весь час вирощування, мікроскопіювання – кожні 8 годин, концентрація біомаси в кінці культивування	$t = 37 \pm 2 \text{ } ^\circ\text{C}$, $\tau = 24 \text{ год}$, відсутність сторонньої мікробіоти $C_{\text{біом.}} = 0,5 - 0,6 \text{ г/л}$
Км, Кт 5.2 Суспендування фагу	Робоча культура бактеріофагу, мікробіологічна чистота	Мікроскопіювання, визначення титру фага	Мікробіологічний контроль та визначення титру після суспендування	Відсутність сторонньої мікробіоти, розведення – 10^{-3}
Кт 5.4 Центрифугування	Тривалість процесу, швидкість центрифуги	Тахометр, годинник	Під час центрифугування	$t = 15 \text{ хв}$ $w = 4 \text{ тис. об./хв.}$
Кт, Кх, Км 6.1 Виробниче культивування у ферментері об'ємом 500 л	Культуральна рідина , тривалість культивування, температура, частота обертів мішалки, надлишковий тиск, мікробіологічна чистота культури, концентрація клітин <i>Streptococcus pneumoniae</i> R36A джерела вуглецю та азоту, концентрація БУО	Датчик рН годинник, термометр технічний, тахометр, манометр, мікроскоп, колонка для газової хроматографії, спектрофотометр, випарна установка	рН визначають в останні години культивування; температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування; мікроскопіювання та визначення концентрації джерела вуглецю та азоту – кожні 8 годин,	$t = 30 \pm 2 \text{ } ^\circ\text{C}$, $\tau = 72 \text{ год}$, $\omega = 300 - 400 \text{ об/хв}$, $P_{\text{надл.}} = 0,02 \text{ МПа}$, $\text{pH} = 6,8 - 7$ відсутність сторонньої мікробіоти $C_{\text{біом.}} = 1,0 - 1,2 \text{ г/л}$,
Кт 1.1 Забір атмосферного повітря	Висота забору атмосферного повітря	Висота забору згідно паспорту повітрязбірника	Безперервно під час процесу	$h = 5 \text{ м}$

Кт 1.2 Грубе очищення повітря	Повітря на виході з фільтра грубої очистки, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр технічний, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення	E = 80 %, тиск згідно паспорту
Кт 1.3 Стабілізація термодинамічних показників	Температура повітря	Термометр технічний	Безперервно під час процесу	t = 17-18°C
Кт 1.4 Попередня фільтрація на фільтрах тонкої очистки	Повітря на виході з попереднього фільтра тонкої очистки, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр технічний, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у попередньому фільтрі тонкого очищення	E = 98 %, тиск згідно паспорту
Кт 1.5 Фільтрація на фільтрах тонкої очистки	Повітря на виході з фільтра тонкої очистки, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр технічний, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі тонкого очищення	E = 99,5 %, тиск згідно паспорту
Кт 1.5 Фільтрація на фільтрах ультратонкої очистки	Повітря на виході з фільтра ультратонкої очистки, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр технічний, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі ультратонкого очищення	E = 99,9999 %, тиск згідно паспорту
Кт 2.2 Груба фільтрація води	Вода на виході з фільтра грубої фільтрації	Манометр технічний, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки води на грубому фільтрі	d = 100 мкм
Кт 2.5 Одержання води очищеної на установці зворотного осмосу	Вода на виході з установки зворотного осмосу	Перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки води на установці зворотного осмосу	d = 0,0005-0,001 мкм
Км 2.6 Зберігання води	Наявність сторонньої мікробіоти в збірнику для зберігання води	Метод посіву на поживне середовище	Кожні 8 годин	Відсутність сторонньої мікробіоти
Км 2.7 Одержання ін'єкційної води	Вода на виході з дистилляторів	Термометр технічний, посів на поживне середовище	Кожні 8 годин	Відсутність сторонньої мікробіоти t = -18°C

Закінчення таблиці 9.1

Кх 3.1 Підготовка розчину NeomoscanCPalk a 160	Концентрація розчину NeomoscanCPalk 160	Хімічний метод	Після приготування розчину	$C = 1\%$
Кх 3.2 Підготовка розчину хлорантоїну	Концентрація розчину хлорантоїну	Хімічний метод	Після приготування розчину	$C = 0,2\%$
Кх 7.1 Підготовка розчину хінозолу	Концентрація розчину хінозолу	Хімічний метод	Після приготування розчину	$C = 0,0001$ г/мл
Кт 8.1 Обробка культуральної рідини розчином хінозолу	Частота обертів барабана, час	Візуально на дисплеї збірника, годинник	Під час проведення процесу перемішування	$\tau = 15-30$ хв, $w=30$ об/хв
Кт 9.1 Центрифугування культуральної рідини	Частота обертів барабана, час	Візуально на дисплеї центрифуги, годинник	Визначається під час центрифугування	$w=3000$ об/хв; $\tau = 15$ хв,
Кт 10.1 Мікрофільтрація	Тиск	Манометр технічний	Під час проведення процесу мікрофільтрації	$P=0,1-0,2$ МПа
Кт 10.2 Ультрафільтрація	Тиск	Манометр технічний	Під час проведення процесу ультрафільтрації	$P=0,1$ МПа
Кт 11.1 Наповнення та закупорка флаконів	Повнота наповнення флаконів, якість запайки флаконів	Об'ємно ваговий дозатор	Кожну операцію	$V = 20$ мл, флакони мають бути герметично закупорені

9.2 Мікробіологічний контроль виробництва

Мікробіологічний контроль здійснюється розсівом на агаризоване середовище та мікроскопіюванням лише для культури *S.pneumoniae*.

Після поверхневого культивування штаму *S.pneumoniae* на кров'яному агарі отримали світло-жовті, блискучі, куполоподібні, гладкі, колонії. На зображенні під світловим мікроскопом можна спостерігати нерухомі, ланцетоподібні або овальні диплококи [38].

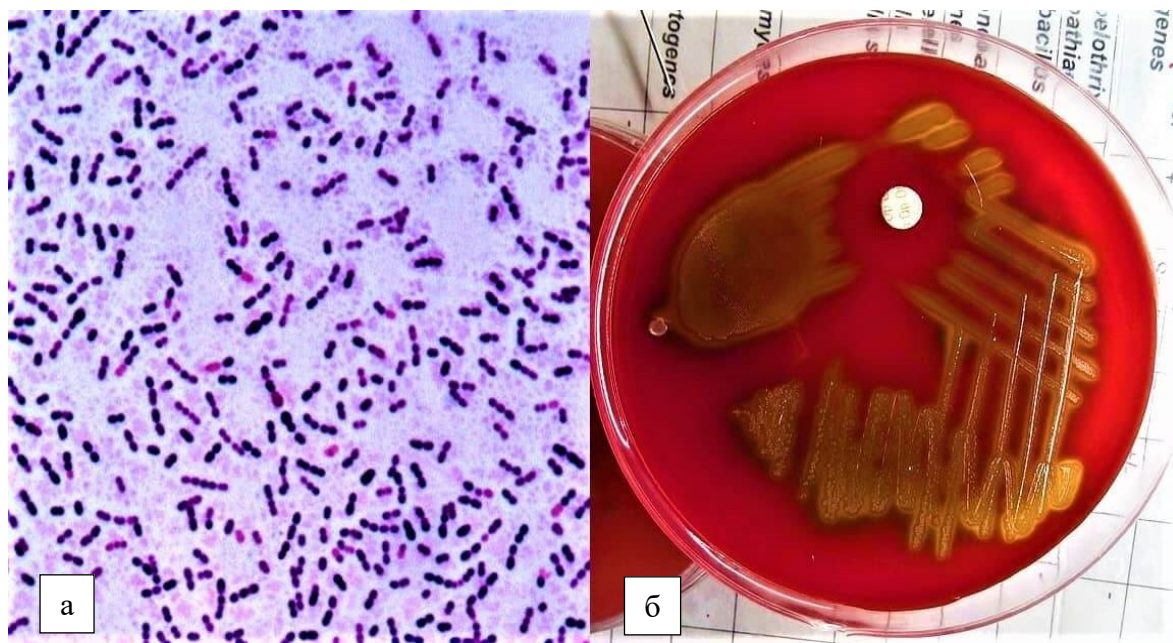


Рис 9.1 Колонії *S. pneumoniae*: а – зображення під світловим мікроскопом [16]; б – на кров'яному агарі [38].

Для виявлення сторонньої мікрофлори здійснюють наступні посіви культуральної рідини:

- для виявлення бактерій розсівають до ізольованих колоній на чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром (МПА), інкубують при температурі 37°C;
- для виявлення грибів та дріжджів – на чашки Петрі з сусло-агаром (СА), інкубують при температурі 30°C;

Після інкубації чашки розглядають на наявність сторонньої мікрофлори.

Для мікроскопіювання використовують препарат «роздавлена крапля». Препарат «роздавлена крапля» готують на знежиреному предметному склі, на

яке наносять маленьку краплю культуральної рідини, накривають накривним скельцем і розглядають з об'єктивом 8x для бактерій.

Для мікробіологічного контролю бактеріофагів проводять мікроспопівання на електронному мікроскопі.

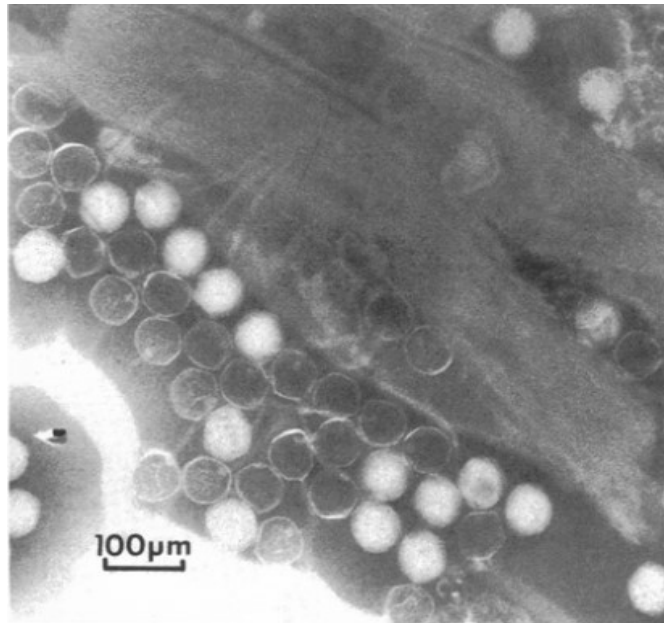


Рис 9.2. Клітина *S. pneumoniae* заражена бактеріофагом Cp-1 під електронним мікроскопом [4].

9.3 Показники росту і синтезу цільового продукту

9.3.1. Концентрація біомаси

Концентрацію мікробних клітин визначають за оптичною густиною стафілоkokів на фотоелектроколориметрі або спектрофотометрі за допомогою побудови калібрувального графіка. Оптична густина має досягати позначки близько 0,6 одиниць.[39].

9.3.2. Концентрація цільового продукту

Визначення активності бактеріофага проводять за методом Аппельмана – схематичне зображення *рисунок 9.3*.

Метод полягає у визначенні літичної активності бактеріофага на рідких середовищах шляхом встановлення його максимального розведення, що викликає повний лізис бульонної культури бактерій.

В ряд стерильних пробірок з однаковим діаметром наливають по 4,5 мл поживного середовища. В першу пробірку ряду вносять 0,5 мл випробуваного

фага, який в подальшому послідовно розводять, переносячи з пробірки в пробірку по 0,5 мл (кожен раз окремою стерильною градуйованою піпеткою). Зазвичай готують 10 розведень фага. З останньої (10-ї) пробірки зайві 0,5 мл виливають. Потім в усі пробірки вносять 1-2 краплі 18-годинної бульонної культури. В якості контролю служать додаткові пробірки - 11 і 12; в одній з них знаходиться рідке поживне середовище і культура (без фага), в іншій - поживне середовище (контроль стерильності). Всі пробірки інкубують в термостаті при t 37° протягом 18 год. Літичну активність фага, виражену в титрі, встановлюють за останньою пробіркою, в якій відсутня мутність або осад. При обліку результатів досвіду пробірки слід струсити. Таким чином, титр бактеріофага, по Аппельману, виражається максимальним розведенням фага, при якому стався повний лізис відповідної культури.[40]

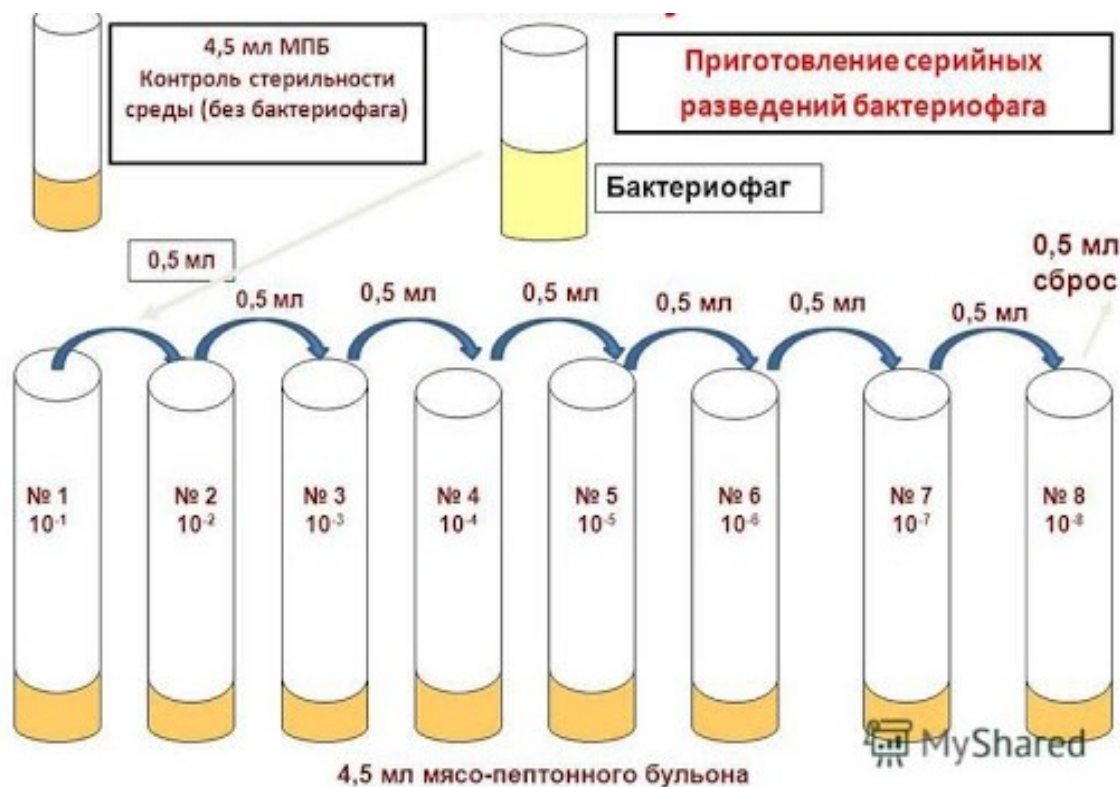


Рис. 9.1. Визначення активності бактеріофага методом Аппельмана [40]
Визначення титру фага. Метод агарових шарів за Грація (титрування фага на твердому поживному середовищі)

Хід роботи:

1. 1,5% агар заливають в чашки Петрі по 15-20 мл, висушують (10 чашок).

2. Досліджуваний фаг титрують методом 10-кратних розведень (в 12 пробірок вносять 4,5 мл фіз.розчину та додають 0,5 мл фага в першу пробірку).

3. У пробірки наливають 2-3 мл розплавленого 0,7%-ного агару та охолоджують до 45°C потім додають 1 мл бактеріофагу (попередньо розведеного) і 0,2 мл бактеріальної культури. Вміст пробірки ретельно перемішують та виливають в чашки Петрі на нижній агар. Нумерація чашок Петрі з нижнім і пробірок з верхнім агаром відповідає нумерації розведень фага. Ті ж самі висіви проводять із контрольних пробірок на ч. Петрі, які позначають як контроль на ріст бактерій.

4. Після того як верхній шар застиг, чашки Петрі ставлять на інкубацію (в термостат на 18-20 годин при 37°C).

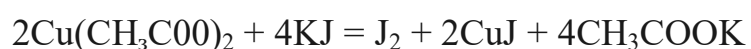
Через 18 годин враховують результати. Присутність фагів визначається його здатністю утворювати прозорі негативні колонії [41].

9.3.3. Концентрація джерела вуглецю і азоту

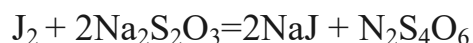
Визначення концентрації амінного азоту. В середовищі для культивування *S.pneumoniae* джерелом азоту виступає триптон.

Визначення амінного азоту проводять йодометричним методом по Попу і Стівенсу (мідним способом) [42]. В основі методу лежить здатність амінокислот утворювати розчинні з'єднання з міддю, кількість якої визначають йодометричним титруванням. Суть методу полягає в тому, що до слабо лужного розчину амінокислот додають надлишок суспензії ортофосфату міді $Cu_3(PO_4)_2$ у боратному буферному розчині. При цьому утворюються розчинні мідні з'єднання. Для їхнього відділення від нерозчинного ортофосфату міді суміш фільтрують. Потім до фільтрату прибавляють оцтову кислоту, яка відщеплює мідь від комплексного з'єднання і перетворюється в ацетат міді/

Для визначення кількості міді, яка брала участь в реакції, до розчину добавляють йодид калію:



В результаті реакції виділяється йод в кількості, еквівалентній кількості міді, а відповідно, і азоту амінокислот, який відтитрують розчином тіосульфату натрію:



Техніка аналізу. В мірну колбу місткістю 50 см³ піпеткою вносять 5 см³ дослідного розчину, додають 3-4 краплини індикатору тімолфталеїну і по краплям розчин гідроксиду натрію концентрацією 0,1 моль/дм³ до появи блідно-блакитного забарвлення. До слабо лужного розчину із циліндра при перемішуванні порціями обережно приливають 30 см³ суспензії ортофосфату міді, вміст колби доводять дистильованою водою до мітки, перемішують і фільтрують через паперовий фільтр. Фільтрат повинен бути прозорим. 10 см³ абсолютно прозорого фільтрату піпеткою переносять в фарфорову чашку або конічну колбу, добавляють 0,5 см³ 80%-ї оцтової кислоти (підкислюють) і 10 см³ розчину йодату калію. Після перемішування йод, що виділився, титрують із мікробюретки розчином тіосульфату натрію концентрацією 0,01 моль/дм³. В кінці титрування до розчину додають 1-2 краплини розчину крохмалю. Кінець титрування визначають по зникненню синього забарвлення від однієї краплі тіосульфату натрію.

При прийнятому розбавленні кількість амінного азоту в 10 см³ фільтрату отримують множенням маси тіосульфату натрію, витраченого на титрування, на 0,28. З урахуванням розчинення це відповідає 1 см³ поживного середовища. Вміст амінного азоту X розраховують за рівнянням:

$$X = \frac{a \times 0,28 \times 6 \times 10 \times 100}{50}, \text{ мг в } 100 \text{ см}^3 \text{ поживного середовища,}$$

де а – кількість розчину тіосульфату натрію концентрацією 0,01 моль/дм³, витраченого на титрування, см³; б – об'єм дослідної рідини, взятий на аналіз, см³.

Концентрація гідролізату казеїну. Оскільки джерело вуглецю має невизначений склад, а саме продукти розпаду білків, то будемо вважати, що компоненти взяті в надлишку.

РОЗДІЛ 10. АВТОМАТИЗАЦІЯ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЦТВА

Найважливішою рисою автоматизації виробництва є поява інформаційної техніки, що спирається на найновіші комп'ютери та системи зв'язку. Ця техніка проникає в усі сфери суспільного життя, науку, освіту, виробництво, виховання тощо. В автоматизованому виробництві робота устаткування, агрегатів, апаратів, установок відбувається автоматично за заданою програмою. Роль працівника зводиться до здійснення контролю і нагляду за їх роботою, усунення від заданого процесу, налагодження автоматизованого устаткування. Розрізняють часткову і комплексну автоматизацію.

При частковій автоматизації працівник повністю звільнений від робіт, пов'язаних з виконанням технологічних процесів. В умовах комплексно-автоматизованого виробництва технологічний процес виготовлення продукції, управління цим процесом, транспортування виробів, контрольні операції, видалення відходів виробництва виконуються без участі людини, але обслуговування устаткування відбувається ручним способом.

Основним елементом автоматизованого виробництва є автоматична потокова лінія - комплекс розміщеного в технологічній послідовності виконання операцій автоматичного устаткування, пов'язаний з автоматичною транспортною системою і системою автоматичного управління, який забезпечує автоматичне перетворення вихідних матеріалів (заготовок) на готовий виріб. На АПЛ працівник виконує функції налагодження, контролю і нагляду за роботою устаткування, а також завантажує лінію заготовками.

					НУХТ БТЕК 04.01.23. ДП ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Кутрик І.В.			РОЗДІЛ 10. АВТОМАТИЗАЦІЯ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЦТВА	Літ.	Арк.	Аркушів
Консультант							94	103
Керівник		Гудзенко О.В.				Кафедра БТМ 94		
Зав.кафедри		Пирог Т.П.						

АНАЛІЗ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ ВИРОБНИЧОЇ ДІЛЯНКИ З ФОРМУВАННЯМ ЗАВДАННЯ НА РОЗРОБКУ СИСТЕМИ АВТОМАТИЗАЦІЇ

У відповідності з отриманим завданням у роботі пропонується розробити систему автоматизації для технологічної ділянки мікро та ультрафільтраційного модуля.

В результаті аналізу технологічного процесу зроблені висновки, що автоматизація цього технологічного процесу повинна забезпечувати:

1. Контроль і регулювання рівня культуральної рідини в збірнику.
2. Контроль потоку культуральної рідини у апараті шляхом зміни параметрів роботи насоса.
3. Контроль рівня розчину хлориду натрію в збірнику.
4. Контроль концентрації NaCl в збірнику.

Відповідно до переліку розглянутих задач системи керування заповнена *таблиця 1*. При цьому будемо притримуватись рішення, що у роботі буде розглянута система автоматизація у якій центральним управляючим пристроєм є мікропроцесорний контролер, а спостереження за ходом виконання технологічним процесом і у разі необхідності втручання в управління ним буде відбуватись за допомогою автоматизованого робочого місця (АРМ) оператора технолога з використанням спеціально розробленого людино-машинного інтерфейсу

Завдання на розробку системи автоматизації

Таблиця 10.1

Машина, агрегат, установка	Параметр, місце відбору сигналу	Припустиме значення параметру	Вид автоматизації	Характер контролю управління	Засоби контролю та управління, реалізація управляючої дії
Збірник культуральної рідини	Рівень рідини в апараті	271,7 л	Контроль	Відображення	Контроль рівня в апараті
			Регулювання	Захист від переповнення збірника	
Насос подачі культуральної рідини з збірника 1	Стан насосу відкачки рідини із збірника на фільтраційний модуль	Включення/Виключення	Управління	Забезпечення подачі культуральної рідини до апарату	Пуск, зупинка з АРМа оператора і кнопка «стоп» по місцю
Мікро та ультрафільтраційний модуль	Параметр тиску до та після фільтра	до 52 psi	Контроль	Контроль цілісності фільтрувального матеріалу	Контроль параметрів тиску
Насос подачі хлориду натрію	Стан насосу відкачки рідини із збірника на фільтраційний модуль	Включення/Виключення	Управління	Забезпечення подачі розчину хлориду натрію до фільтраційного модуля	Пуск, зупинка з АРМа оператора і кнопка «стоп» по місцю
Збірник розчину NaCl	Рівень розчину в збірнику	270 л	Контроль	Відображення	Контроль рівня в збірнику
	Концентрація розчиненої речовини в збірнику	0,9% NaCl	Контроль	Відображення	Контроль розчиненої речовини в збірнику

ОПИС ФУНКЦІОНАЛЬНОЇ СХЕМИ АВТОМАТИЗАЦІЇ

У першому контурі автоматичного контролю, в збірнику контролюється рівень рідини з сигналізацією досягнення верхнього та нижнього допустимого рівня, який має регламентовані значення 75 та 80%. Контролюється рівень рідини датчиком рівня (поз. 1а). Сигнал від датчика подається на сигналізатор рівня (поз. 1б). Сигналізація про досягнення верхнього та нижнього рівня передбачається на АРМі оператора-технолога.

У другому контурі автоматичного контролю і управління, необхідно контролювати і регулювати витрату культуральної рідини з збірника в фільтраційний модуль, яка має регламентоване значення 144 л/год. Спостереження за зміною передбачається на АРМі оператора-технолога з відображенням на контролері. Регулювання культуральної рідини відбувається за рахунок зміни її витрати клапаном на даному трубопроводі.

У третьому контурі при натисканні кнопки «Пуск» на моторі М 1 (поз. КМ1) відбувається подача культуральної рідини в фільтраційний модуль із заданою частотою обертів. Керування можна здійснювати як по місцю за допомогою ключа керування так і на щиті (панель дистанційного ручного керування).

У четвертому та п'ятому контурах автоматичного контролю і управління, необхідно контролювати різницю тисків до та після фільтрувального матеріалу. Спостереження за зміною передбачається на АРМі оператора-технолога зі збереженням (реєстрація) цих змін в його архіві.

У шостому та сьомому контурах відбувається подача готового препарату (КМ 2) та розчину натрію хлориду (КМ 3) відповідно при натисканні на моторах кнопки «Пуск», із заданою частотою обертів. Керування можна здійснювати як по місцю за допомогою ключа керування так і на щиті (панель дистанційного ручного керування).

У восьмому контурі автоматичного контролю, в збірнику контролюється рівень розчину NaCl з сигналізацією досягнення верхнього та нижнього допустимого рівня, який має регламентовані значення 75 та

80%. Контролюється рівень рідини датчиком рівня (поз. ба). Сигнал від датчика подається на сигналізатор рівня (поз. бб). Сигналізація про досягнення верхнього та нижнього рівня передбачається на АРМі оператора-технолога.

СПЕЦИФІКАЦІЯ ЗАСОБІВ АВТОМАТИЗАЦІЇ

Таблиця 10.2

Номер позиції	Найменування і технічна характеристика засобу	Тип, модель	Виробник
1а	Поплавковий датчик рівня, матеріал: нержавіюча сталь; діапазон вимірювань 300-6000мм, максимальна допустима температура +130 ⁰ С, аналоговий вихід [44]	NM	Kobold
1в	Електропневматичний перетворювач, вхідний сигнал 4...20мА, вихідний сигнал 20...100кПа [45]	РС-28G/A	Aplisens
1г	Регулюючий пневматичний клапан, управляючий сигнал 10-40 Па [46]	3241	Samson
КМ1	Магнітний пускач, робочий струм 12А, управляючий сигнал 220В[47]	ПМ 1-12-10	АСКО-УКРЕМ
3а, 3б	Диференційний перетворювач тиску, матеріал виготовлення– нержавіюча сталь, під'єднання 1/2NPT, клас точності 0,075, вихідний сигнал аналоговий	PAD	Kobold
КМ2	Магнітний пускач, робочий струм 12А, управляючий сигнал 220В[47]	ПМ 1-12-10	АСКО-УКРЕМ
КМ3	Магнітний пускач, робочий струм 12А, управляючий сигнал 220В[47]	ПМ 1-12-10	АСКО-УКРЕМ
ба	Поплавковий датчик рівня, матеріал: нержавіюча сталь; діапазон вимірювань 300-6000мм, максимальна допустима температура +130 ⁰ С, аналоговий вихід	NM	Kobold

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Мачуський О., Ковтун В.* Фаги замість антибіотиків//Наше Птахівництво – 2014. - № 5. – С. 27.
2. *Шевченко Т.П., Будзанівська І.Г., Поліщук В.П.* Віруси мікроорганізмів. Курс лекцій: Навчальний посібник. –К.: ДП «Видавничий дім «Персонал», 2013. -150 с.
3. Безопасные антибактериальные препараты. [Електронний ресурс]: Бактериофаги. Режим доступу: <http://www.bacteriophage.ru/>
4. *Concepcion Ronda, Rubenslopez, Ernesto Garcia.* Isolation and Characterization of a New Bacteriophage, Cp-1, Infecting *Streptococcus pneumoniae* // *Journal of virology*, -2007, - p. 551-559
5. Бактериофаг стрептококковий. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: https://www.piluli.ru/product/Bakteriophage_streptokokkovyyj
6. Пат.№96122514 RU.Способ выделения бактериофагов /Ф.А. Байгузина Н.Л. Киняпина А.Г. Исрафилов А.Г. Лютов. – Опубл. 20.10.2015.
7. *A.M. Mitchell T.J. Mitchell* *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors and variation // [Clinical Microbiology and Infection](http://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com). – 2010. – vol.16. - №5. – p. 411-418
8. *Streptococcus pneumoniae* [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://studfiles.net/preview/6442989/>
9. *Streptococcus pneumoniae* [Електронний ресурс] // Режим доступу: <http://pulmonolog.com/content/streptococcus-pneumoniae>
10. *Цимбаліста О.М.* Проблема резистентності мікроорганізмів до антибіотиків. – 2017. – Т.2 - №84. – С. 52-56
11. *Вовк О.О., Бойченко М.С., Матвєєва І.В. та ін.* Бактеріофаги: нова парадигма та переваги перед антибіотиками у лікувально-профілактичних цілях // Наукоємні технології. – 2017. – Т.34 - №2. – С. 150-155
12. *Є. Воробей, О. Воронкова, О. Сірокваша.* / Лікувально-профілактичні препарати бактериофагів // Вісник Львівського університету. Серія біологічна. – 2014. – №64. – С. 52–66.

13. *Шеремет М.П., Калюжная О.С, Стрелец О.П.* / Перспективи створення лікарських засобів з бактеріофагами // Національний фармацевтичний університет, - Харків. – 2014
14. Бактеріофаги – альтернатива антибіотикам. [Електронний ресурс]: // Режим доступу: <http://www.remedium.ru/upload/iblock/8ef/Bakteriofagi%20Tab%203.pdf>
15. *Гречушкіна Н.В.* Аналіз стану надання хірургічної допомоги в Україні протягом останнього десятиріччя // Соціальна медицина, організація охорони здоров'я. – 2015. - № 477. – С. 497-501
16. Хлоронтоин – дезинфекционное средство. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://farmakos.ua/hlor.html>
17. *NeomoscанCPalka 160.* [Електронний ресурс]. – Режим доступу: https://dws-g.com/wp-content/uploads/2018/06/CP-alka-160_RU.pdf
18. *NeomoscанCPacid 300.* [Електронний ресурс]. – Режим доступу: https://dws-g.com/wp-content/uploads/2018/06/CP-acid-300_RU.pdf
19. Хлорантоин методические рекомендации (инструкция по применению). [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://dezmed.com.ua/ru/instrukcii/765-khlorantoin-metodicheskie-rekomendacii-instrukciya-po-primeneniyu>
20. Дезинфицирующее средство «ГЕМБАР®» [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://biocide.com.ua/p10341693-dezinfitsiruyushee-sredstvo-gembar.html>
21. *Д.А. Новиков* Выделение и очистка продуктов биотехнологии. - 2014. – 256 с.
22. Пат.2109055. Способ выделения бактериофагов /*Байгузина Ф.А* – Оpubл. 20.04.1998
23. *Данилов І. П.* Апарати мікробіологічної промисловості: Навч. посібник. – Харків, 2008. – 272 с.
24. Пат. 2525141. Способ получения бактериофага / *Киселева И.А* – Оpubл. 06.07.2017

25. Пат. 2573934. Способ получения штамма бактериофага, специфических штаммов бактериофагов и их применение/ Дзядек Я. А и др. – Оpubл 03.05. 2016
26. Пат. 2016897. Способ концентрации и очистки вирусов/ Гириh В.Н и др. – Оpubл. 04.03.2013
27. Вирусология. Методы: Пер.с англ./Под. ред.. Б.Мей – В52 хи. – М.: Мир, 1988. – 344.
28. *Золотухин С.Н.* Создание и разрабока схем преминания диагностических биопрепаратов на основе выделенных и изученных бактериофагов энтеробактерий: автореф. дис. ...д-ра биологических наук: 03.00.23, 03.00.07 / С.Н. Золотухин. – Ульяновск, 2007. – 39с.
29. *Тихоненко Т.И.* Бактериофаг: получение, очистка и свойства компонентов : автореферат дис. ... кандидата биологических наук / Тихоненко Т.И.; [Место защиты: Институт радиационной и физико-химической биологии АН СССР]. - Москва, 1962. - 22 с.
30. Пилотная проточная центрифуга CEPAZ 61/Z 61 GP [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://biotechno.ru/catalog/ceparatsiya/pilotnaya-protchnaya-tsentrifuga-cepa-z-61/>
31. ProcessTechnologiesMarkets [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://multimedia.3m.com/mws/media/4936270/3m-biopharmaceutical-catalog.pdf>
32. Milliporemembrane [Электронный ресурс] // Режим доступа: http://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/MF-Millipore-Membrane-Filter-mixed-cellulose-esters,MM_NF-VMWP02500?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com.ua%2F&bd=1
33. Инжиниринг и комплексные поставки биотехнологического оборудования [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://biotechno.ru>
34. Вагове обладнання [электронный ресурс] Режим доступа: https://chemtest.com.ua/ua/vesovoe_oborudovanie-ua

35. Химические насосы DEBEM [Электронный ресурс] // Режим доступа: www.debem.com.ua
36. Криогенные ёмкости [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://cryo-tm.com.ua/ru/oborudovanie-dlya-khraneniya-kriogennykh-produktov/548-kriogennye-yomkosti.html>
37. [Donaldson – фільтри для повітря](http://www.emea.donaldson.com) [Электронный ресурс] // Режим доступа: <http://www.emea.donaldson.com>
38. *MageeAllegrucci, KarinSauer.* Characterization of Colony Morphology Variants Isolated from *Streptococcus pneumoniae* Biofilms // *Journal of bacteriology*, - 2007, - p. 2030–2038
39. Методичні рекомендації до спецпрактикуму «Віруси мікроорганізмів» для студентів денної форми навчання ННЦ «Інститут біології» / Київський національний університет імені Тараса Шевченка. - Київ – Упорядники: *О.М. Андрійчук, Т.П. Шевченко, А.В. Харіна, В.П. Поліщук* - 2011. - 45 с
40. *Степанова О.А.* Методические подходы к изучению процесса взаимодействия бактерий и вирусов / В.Г. Шайда // *Экология моря*. – 1999.-вып. 48.-С. 96-99
41. Методичні рекомендації до спецпрактикуму «Віруси мікроорганізмів» для студентів денної форми навчання ННЦ «Інститут біології» / Київський національний університет імені Тараса Шевченка. - Київ – Упорядники: *О.М. Андрійчук, Т.П. Шевченко, А.В. Харіна, В.П. Поліщук* - 2011. - 45 с
42. Современные проблемы и методы биотехнологии [Электронный ресурс]: лаб. практикум / *Н.А. Войнов, Т.Г. Волова, Н.В. Зобова и др.* – Электрон. дан.– Красноярск: ИПК СФУ, 2009.
43. Скалка В.В, Савчук О.М, Остапченко Л.І. Визначення різних форм казеїну методом диск-електрофорезу // *Фізика живого*, - 2010, - с.36-38
44. Датчик уровня NM [Электронный ресурс] // Режим доступа: <http://www.pkimpex.ru/opisanie/datchik-urovnya-nm>

45. Перетворювачі тиску і вимірювальна апаратура [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://aplisens.com.ua/>

46. Контрольно-вимірювальна апаратура [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://zapadpribor.com/ua/category/kontrolno-vymiryuvalna-aparatura/>

47. АСКО-УКРЕМ [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://www.acko.ua/>