

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

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

«До захисту в ЕК»

Директор інституту(декан факультету)

Наталія ГРЕГІРЧАК

(підпис)

(ім'я та прізвище)

« ____ » червня 2022р.

«До захисту допущено»

Завідувач кафедри

Віктор СТАБНІКОВ

(підпис)

(ім'я та прізвище)

« ____ » червня 2022р.

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА**

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код та назва спеціальності)

освітньо-професійної програми «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна»

на тему: Культивування *Corynebacterium diphtheriae* для виробництва компоненту проти дифтерії вакцини АКДП

Виконав: здобувачка 4 курсу, групи БТ-4-1

СМАГОЛЬ Олена Олександрівна

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Керівник ПЕНЧУК Юрій Миколайович

(прізвище, ім'я та по батькові повністю)

(підпис)

Консультанти _____

(ім'я та прізвище)

(підпис)

(ім'я та прізвище)

(підпис)

(ім'я та прізвище)

(підпис)

Рецензент

Дідик І.І.

(ім'я та прізвище)

(підпис)

Я як здобувач(ка) Національного університету харчових технологій розумію і підтримую політику університету з академічної доброчесності. Я не надавав(-ла) і не одержував(-ла) незарядженої допомоги під час підготовки цієї роботи. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

Здобувач _____

(підпис)

Київ – 2022 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

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

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і
мікробіології

Віктор СТАБНІКОВ

“ 04 ” квітня 20 22 року

ЗАВДАННЯ

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

СМАГОЛЬ Олени Олександрівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Культивування *Corynebacterium diphtheriae* для виробництва
компоненту проти дифтерії вакцини АКДП

керівник роботи доцент, кандидат технічних наук, ПЕНЧУК Юрій
Миколайович

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

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

2. Строк подання здобувачем роботи 03.06.2022

3. Вихідні дані до роботи продуцент – *Corynebacterium diphtheriae* PW 8, об'єм
ферментеру – 10 л, коефіцієнт заповнення – 0,6

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити)

Характеристика цільового продукту. Обґрунтування вибору та характеристика
біологічного агента. Техніко-економічне обґрунтування. Обґрунтування вибору
технологічної схеми. Специфікація обладнання. Опис технологічної схеми. Контроль
виробництва.

5. Перелік графічного матеріалу

Апаратурна схема формат А1, технологічна схема формат
А1

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 04 квітня 2022 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
	Розділ 1	04.04.2022-11.04.2022	Виконано
	Розділ 2	11.04.2022-18.04.2022	Виконано
	Розділ 3	18.04.2022-25.04.2022	Виконано
	Розділ 4	25.04.2022-02.05.2022	Виконано
	Розділ 5	02.05.2022-09.05.2022	Виконано
	Розділ 6	09.05.2022-16.05.2022	Виконано
	Розділ 7	16.05.2022-23.05.2022	Виконано
	Оформлення графічної частини	23.05.2022-26.05.2022	Виконано
	Виконання графічної частини	26.05.2022-01.06.2022	

Здобувач _____
(підпис)

Олена СМАГОЛЬ
(ім'я та прізвище)

Керівник роботи _____
(підпис)

Юрій ПЕНЧУК
(ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Дипломний проект присвячений розробленню технології біосинтезу дифтерійного токсину з використанням штаму бактерій *Corynebacterium diphtheriae* PW8. На основі аналізу та порівняння потенційних продуцентів, складу поживних середовищ та умов культивування обрано штам *C. diphtheriae* PW8, який порівняно з іншими штамми такими як *C. diphtheriae* 4256, *C. diphtheriae* CN2000 характеризується вищим синтезом токсину 300 Лф/мл, модифікованим поживним середовищем наступного складу (г/л): гідролізат казеїну – 119; розчин модифікованого ростового фактору Мюллера: β -аланін – 1,15; нікотинова к-та – 1,15; пімелінова к-та – 0,075; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,4; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,15; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 225; мальтоза – 25; лактат натрію – 3,4; цистеїн гідрохлорид – 0,4; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,0001; K_2HPO_4 – 0,73; KH_2PO_4 – 0,24; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 2,7 даний штам здатний синтезувати дифтерійний токсин у кількості 300 Лф/мл за 48 год культивування.

Технологічна та апаратурна схеми біосинтезу дифтерійного токсину включає допоміжні роботи (підготовка розчину розчину хлоридної кислоти для підкислення поживного середовища, приготування та стерилізація поживних середовищ, підготовка піногасника) та технологічний процес (стадії підтримання та вирощування посівного матеріалу, біосинтез у ферментері об'ємом 10 л з коефіцієнтом заповнення 0,6). Технологія отримання дифтерійного токсину передбачає використання схемикультивування глибинним періодичним способом. Дифтерійний токсин буде використовуватися як компонент вакцини проти дифтерії, кашлюка та правцю.

Дипломний проект складається з вступу, семи розділів, списку використаних джерел та технологічної схеми та апаратурної схем (формат А1). Загальний обсяг роботи – 78 сторінок, 9 рисунків, 10 таблиць.

Ключові слова: дифтерійний токсин, *C. diphtheriae* PW8, біосинтез, вакцина.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ДТ – дифтерійний токсин

ПС – поживне середовище

БА – біологічний агент

Лф – (Lf – limit of flocculation) – одиниця флокуляції

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ.....	3
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	4
ВСТУП.....	6
РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту.....	7
1.1. Фізико-хімічні властивості цільового продукту.....	7
1.2. Механізм дії.....	8
РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента.....	10
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування.....	10
2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента...	20
2.3. Таксономічний статус біологічного агента.....	23
РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування.....	24
3.1. Потреба у цільовому продукті.....	24
3.2. Розрахунок потужності виробництва.....	25
3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів.....	28
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.....	30
РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми.....	31
4.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу....	31
4.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера.....	31
4.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря.....	34
4.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів.....	36
4.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища.....	48
РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання.....	64
РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми.....	68
РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва.....	73
7.1. Мікробіологічний контроль.....	73
7.2. Показники росту і синтезу цільового продукту.....	74
7.2.1. Концентрація біомаси.....	74
7.2.2. Визначення кількості синтезованого цільового продукту.....	74
7.2.3. Концентрація джерела вуглецю і азоту.....	76
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	81

ВСТУП

Дифтерія — це гостре інфекційне захворювання з повітряно-крапельним механізмом передавання, що характеризується місцевим фібринозним запаленням (переважно слизових оболонок ротоглотки) та явищами загальної інтоксикації з переважним ураженням серцево-судинної та нервової систем, нирок. Протягом останніх дев'яти років в Україні щорічно реєстрували поодинокі випадки дифтерії (за винятком 2017 р.). У 2010–2018 рр. загалом зареєстровано 56 хворих на дифтерію, з них 12 дітей та 44 дорослих[1]. У той час як дифтерія залишається поширеною в тропічних країнах, що розвиваються, де імунізація дифтерійним анатоксином залишається нерегулярною, дифтерія практично відсутня в промислово розвинених країнах, які продовжують підтримувати комплексну програму імунізації дифтерійним анатоксином[2]. Попередити розвиток небезпечних ускладнень можна завдяки вакцинації дітей, згідно з Календарем профілактичних щеплень, і ревакцинації дорослих кожні 10 років[1]. АКДП – адсорбована коклюшно-дифтерійно-правцева вакцина застосовується для профілактики трьох інфекційних захворювань — коклюшу, дифтерії та правцю. Препарат складається із суміші вбитих кашлюкових мікробів та очищених дифтерійного та правцевого анатоксинів, адсорбованих на гелі алюмінію гідроксиду[3].

Новизною даного проекту є вирощування штаму *C. diphteriae* PW8 на стандартному поживному середовищі за оптимізації умов культивування, а саме підвищення швидкості надходження повітря та використання холодної стерилізації, що дозволяє зберегти від руйнування термолабільні компоненти поживного середовища. Даний прийом дозволить збільшити вихід дифтерійного токсину майже в 2 рази порівняно з штамом *C. diphteriae* 4256.

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.35 КР ПЗ</i>		
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>			
<i>Розробник</i>		<i>Смаголь</i>			<i>Літера</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Керівник</i>		<i>Пенчук</i>				7	86
<i>Н. контр</i>					<i>Кафедра БТМ</i> 7		
<i>Консульт</i>							
<i>Зав. каф.</i>		<i>Стадніков</i>					
<i>ВСТУП</i>							

РОЗДІЛ 1

ХАРАКТЕРИСТИКА ДИФТЕРІЙНОГО ТОКСИНУ

1.1. Фізико-хімічні властивості цільового продукту

Гістотоксин проявляє всі властивості екзотоксинів – термолабільний, високотоксичний, імуногенний білок, який можна нейтралізувати за допомогою антитоксичної сироватки. Нестійкий у навколишньому середовищі, руйнується під дією світла, кисню та при нагріванні до 60⁰С. Активність токсину виражається в одиницях DLM; 1 ОД DLM ДТ дорівнює найменшій його концентрації, яка вбиває морську свинку масою 250 г на 4-5 добу[4].

Гістотоксин – синтезується на мембранозв'язаних рибосомах і секретується клітинами бактерій у вигляді глобулярного білка з молекулярною масою 62 кДа. Спочатку в бактеріальній клітині синтезується попередник токсину довжиною 560 амінокислот, потім відбувається його модифікація – від NH₃-кінця молекули відщеплюється послідовність з 25 амінокислот (сигнальний пептид), після цього «зрілий» токсин виходить за межі клітини. Поліпептидний токсин складається з 535 амінокислот, та до його складу входять 2 частини: фрагмент А (каталітичний центр) та фрагмент В. Фрагмент В включає 2 домена: трансмембранний домен Т і рецептор, який зв'язує домен R. Фрагмент А зв'язаний з фрагментом В за допомогою дисульфідного містка (-S-S-) та аргінінової петлі (див. рис.1.1)[5].

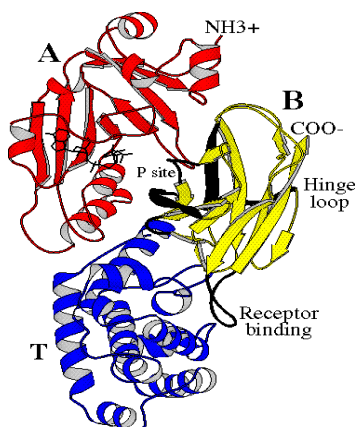


Рис.1.1. Будова молекули дифтерійного токсину[6]

					НУХТ БТЕК 04.01.35 КР ПЗ		
Зм	Арк.	№ документа	Підпис	Дата			
Розробник	Лмаголь				Літера	Аркуш	Аркушів
Керівник	Пенчук					8	87
Н. контр					Кафедра БТМ		
Консульт							
Зав. каф.	Стадніков				РОЗДІЛ 1		

1.2. Механізм дії

Початковим етапом взаємодії токсина з чутливою еукаріотичною клітиною є зв'язування фрагмента В (домена R) з поверхневими рецепторами клітини. Чутливі до токсину клітини поглинають його шляхом ендоцитозу. В кислому середовищі ендосом відбувається зміна конформації домена Т в результаті чого він стає здатним до формування в ендосомальній мембрані канали, по яких токсин проникає в цитоплазму клітини. В цитоплазмі відбувається протеоліз токсину в області аргінінової петлі внаслідок чого дисульфідні зв'язки (S-S) між фрагментами А і В розриваються, фрагмент А відщеплюється від фрагмента В. Вільний фрагмент А інактивує еукаріотичний фактор елонгації 2 (EF 2), який втрачає здатність зв'язуватися з рибосомами і брати участь у синтезі білка. Так як прокариоти використовують інший фактор елонгації EF-6, відмінний від фактору еукаріот то вони не чутливі до дії дифтерійного гістотоксину.

Отже, в організмі хазяїна молекула токсину проходить стадію активації. Фрагмент В специфічно реагує з рецептором чутливої клітини і забезпечує перенесення фрагмента А в цитоплазму клітини, де і відбувається зв'язування цього фрагмента з фактором елонгації. Основні антигенні детермінанти відповідальні за вироблення антитіл до токсину знаходяться на фрагменті В(див.рис.1.2)[5].

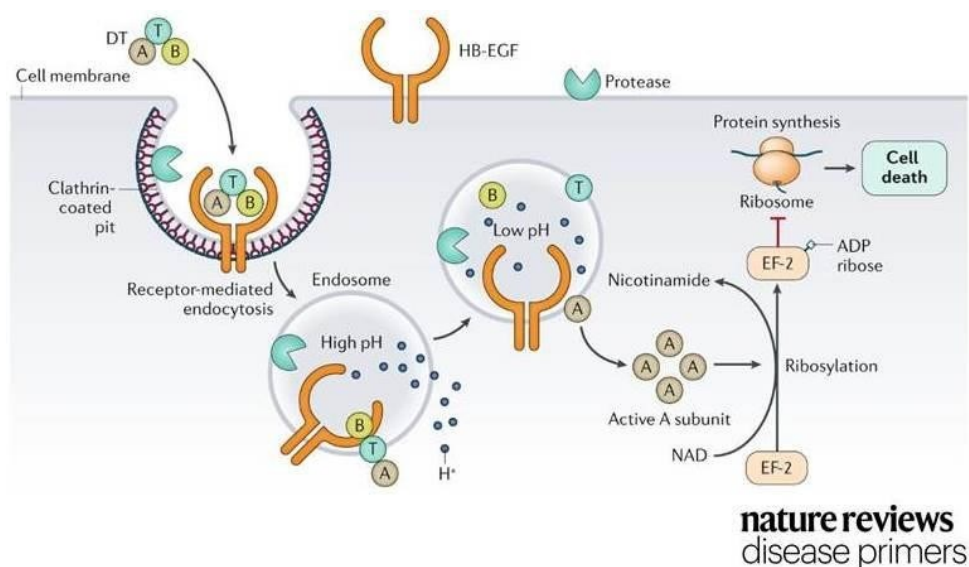


Рис.1.2. Механізм дії дифтерійного токсину на еукаріотичну клітину[6]

Дифтерійний гістотоксин проявляє свою специфічну блокуючу дію на синтез білка в органах, найінтенсивніше забезпечених кров'ю: серцево-судинна система, міокард, нирки та наднирники, ЦНС і ПНС. Результатом дії токсину на нервову тканину є демієлінізація нервових волокон, що часто призводить до паралічів і парезів[7].

РОЗДІЛ 2.

ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

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

Для отримання дифтерійного токсину використовують бактерії виду *Corynebacterium diphtheriae*. Найпоширенішим і найбільш використовуваним серед виробників вакцин є штам *Corynebacterium diphtheriae* Parke-Williams 8 (PW 8).

Для культивування *C. diphtheriae* PW 8 використовують середовище Поупа-Лінґуда, що містить білки м'яса, або ж напівсинтетичні середовища, як, наприклад, гідролізат казеїну. Щодо використання синтетичних середовищ для культивування то на них відмічається слабкий ріст та низький вихід токсину, тому їх використання не є ефективним. Все ж найкращі результати токсинування отримують при вирощуванні бактерій на напівсинтетичному ПС, в основі якого гідролізат казеїну. Таке середовище підтримує інтенсивний ріст і його компоненти можна стандартизувати. Найбільшою перевагою такого ПС є відсутність м'ясного екстракту, який ускладнює процес очистки[8].

У таблиці 2.1. наведені штами *C. diphtheriae*, які використовуються для виробництва дифтерійного токсину. Найбільшу кількість дифтерійного токсину продукує штам *C. diphtheriae* Park-Williams 8 - 239 Лф/мл на середовищі з м'ясом яловичини та 300 Лф/мл на середовищі в основі якого гідролізат казеїну, тоді як *C.diphtheriae* CN2000 – 115 Лф/мл, *C.diphtheriae gravis* 4256 – 170 Лф/мл. Середовища для культивування *C. diphtheriae* Park-Williams 8 та *C.diphtheriae* CN2000 є однаковим за складом компонентів, також ці продуценти мають однакову тривалість культивування. Штам *C.diphtheriae gravis* 4256 росте на напівсинтетичному ПС та має меншу тривалість культивування. Штам *C. diphtheriae* Park-Williams 8 також росте на напівсинтетичному ПС та має таку ж саму тривалість культивування як *C.diphtheriae* CN2000.

					НУХТ БТЕК 04.01.35 КР ПЗ		
Зм	Арк.	№ документа	Підпис	Дата			
Розробник		Лмаголь			Літера	Аркуш	Аркушів
Керівник		Пенчук				11	86
Н. контр					Кафедра БТМ		
Консульт							
Зав. каф.		Лтадніков					

РОЗДІЛ 2

На наступному етапі вибору БА розрахуємо вартість ПС для культивування даних мікроорганізмів. Як видно з *табл.2.2* найдорожчим виявилось ПС для *C. diphtheriae gravis* 4256, майже однаковим по ціні для *C. diphtheriae* CN2000 та *C. diphtheriae* Park-Williams 8 на обох ПС.

Для остаточного вибору БА розрахуємо умовну вартість 1 одиниці флокуляції (*табл.2.3*). Відповідно до даних наведених у *табл. 2.3* найменша умовна вартість є для *C. diphtheriae* Park-Williams 8 при рості на напівсинтетичному ПС.

Хоча ціна умовної одиниці продукту та тривалість культивування є майже однаковими для *C. diphtheriae* CN2000 та *C. diphtheriae* Park-Williams 8 на обох ПС, обираємо штам *C. diphtheriae* Park-Williams 8 з ростом на напівсинтетичному ПС в основі якого міститься гідролізат казеїну, адже це в подальшому спростить процес очистки цільового продукту.

Отримання дифтерійного токсину на поживних середовищах

Біологічний агент	Склад поживного середовища:		Тривалість культивування, год	Концентрація ДТ Лф/мл	Особливості процесу біосинтезу	Використана література
	компонент	концентрація, г/л				
1	2	3	4	5	6	7
<i>C. diphtheriae</i> Park-Williams No. 8	М'ясо яловичини (гідрохлорид цистеїну папаїн) Дріжджовий екстракт лактат натрію MgSO ₄ ×7H ₂ O – Мальтоза Нікотинова кислота βаланін пімелінова к-та MnCl ₂ ×4H ₂ O ZnSO ₄ ×7H ₂ O CuSO ₄ ×5H ₂ O	155 0,25 1,5 0,15 0,0015 0,7 18,7 0,0021 0,0021 0,00014 0,00028 0,00074 0,00093	48	239	pH – 7.6, t – 35 ⁰ C Робочий об'єм ферментера 5л; Повітря подавали зі швидкістю 0,5-1 об /хв; швидкість мішалки 300 і 600 об / хв; для контролю піноутворення протягом всього процесу використовували силіконовий піногасник.	<i>Suwanpatcharakul, M., Pakdeecharoen, C., Visuttitewin, S., Pesirikan,</i> (2016). Process optimization for an industrial-scale production of Diphtheria toxin by <i>Corynebacterium diphtheriae</i> PW8. <i>Biologicals</i> , 44(6), 534–539. doi:10.1016/j.biologicals.2016.08.002

<p><i>C.diphtheriae</i> CN2000</p>	<p>м'ясо яловичини (обезжирене) Дріжджовий екстракт Лактат натрію мальтоза MgSO₄ × 7H₂O β-аланін нікотинова кислота пімелінова кислота CuSO₄ × 5H₂O ZnSO₄ × 7H₂O MnCl₂ × 4H₂O Папаїн Гідрохлорид цистеїну</p>	<p>15 0,15 0,6 0,5 0,62 1,75 1,75 0,11 0,75 0,60 0,22 1,3 0,25</p>	<p>48</p>	<p>115</p>	<p>Культивування у ферментері об'ємом 45 л. Потік повітря підтримувався на рівні 20-22 л/год, T=35⁰C, швидкість мішалки у перші 24 години тримали при 700 об / хв, а потім збільшили до 900 об / хв., рН становив близько 7,8, використання піногасника.</p>	<p><i>Moghadam A.T., Afsharpad K.</i> Application of fermentor technology in production of diphtheria toxin. <i>Journal of Microbiology</i> (2008); 1(1): 24-27</p>
<p><i>C.diphtheriae gravis</i> strain 4256</p>	<p>Триптоновий гідролізат казеїну Мальтоза Лактат натрію CaCl₂ KH₂PO₄ 4 K₂HPO₄ 4 гідрохлорид цистеїну MgSO₄ · 7H₂O β-аланін пімелінова кислота нікотинова кислота</p>	<p>35 25 1,025 4 0,85 2,55 0,21 225 2,3 0,15 4,6</p>	<p>40</p>	<p>170</p>	<p>Об'єм ферментера 2л; T - 35.5 °C; рівень рН автоматично регулювали додавання 20% NaOH, використання піногасника.</p>	<p>Andrey I. Tchorbanov, Jordan D. Dimitrov, Tchavdar L. Vassilev. Optimization of casein-based semisynthetic medium for growing of toxigenic <i>Corinebacterium diphtheriae</i> in a fermenter. <i>Can. J. Microbiol.</i> 50: 821–826 (2004)</p>

	CuSO4·5H2O ZnSO4·7H2O MnCl2·4H2O FeSO4	0,5 0,8 0,24 0,00028				
<i>C. diphtheriae</i> Park-Williams No. 8	Порошок гідролізату казеїну Na2HPO4 KH2PO4 CaCl2 β-аланін нікотинова к-та пімелінова к-та CuSO4·5H2O ZnSO4·7H2O MnCl2·4H2O MgSO4·7H2O Мальтоза Лактат натрію Цистеїн гідрохлорид FeSO4·7H2O K2HPO4 KH2PO4 CaCl2·2H2O	119 4,6 1,5 4,9 1,15 1,15 0.075 0,5 0,4 0,15 225 25 3,4 0,4 0,0001 0,73 0,24 2,7	48	300	Об'єм ферментера 10 л, робочий об'єм 7 л. Аерація 0,7 л / хв і перемішування 600 об / хв. Використання піногасника	Chung, Y.-J., Lee, J.-A., Jung, M.-Y., Lee, S.-M., Kim, T.-Y., Choe, Y.-K., & Kim, I.-H. (2016). Optimization of diphtheria toxin production by <i>Corynebacterium diphtheriae</i> using a casein-based medium in a fermenter. <i>Biotechnology and Bioprocess Engineering</i> , 21(4), 537–543. doi:10.1007/s12257-016-0360-9

Таблиця 2.2

Продуцент	Компонент поживного середовища	Концентрація у ПС, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації
1	2	3	4	5	6
<i>C. diphtheriae</i> CN2000	м'ясо яловичини	15	166	2,49	1
	Дріжджовий екстракт	0,15	1100	0,165	2
	Лактат натрію	0,6	70	0,042	3
	Мальтоза	0,5	47,6	0,02	4
	MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,62	8	0,005	5
	β-аланін	1,75	1091,7	1,91	6
	нікотинова кислота	1,75	249	0,436	7
	пімелінова кислота	0,11	31 208,2	3,433	8
	CuSO ₄ ×5H ₂ O	0,75	80	0,06	9
	папаїн	1,3	5215	6,78	10
	гідрохлорид цистеїну	0,25	701	0,18	11
	ZnSO ₄ ×7H ₂ O	0,60	27	0,016	12
	MnCl ₂ ×4H ₂ O	0,22	128	0,028	13
Вартість 1 л середовища – 15,6 грн					
<i>C. diphtheriae</i> Park-Williams No. 8	М'ясо яловичини	155	166	25,73	1
	Гідрохлорид цистеїну	0,25	701	0,18	11
	папаїн	1,5	5 215	7,823	10
	Дріжджовий екстракт	0.15	1100	0,165	2
	лактат натрію	0.0015	70	0,0001	3

	MgSO ₄ ×7H ₂ O	0.7	8	0,006	5
	Мальтоза	18.7	47,6	0,89	4
	Нікотинова кислота	0.0021	249	0,0005	7
	β-аланін	0.0021	1091,7	0,002	6
	пімелінова к-та	0.00014	31 208,2	0,004	8
	MnCl ₂ ×4H ₂ O	0.00028	128	0,00004	13
	ZnSO ₄ ×7H ₂ O	0.00074	27	0,00002	12
	CuSO ₄ ×5H ₂ O	0.00093	80	0,00007	9
	Вартість 1 л середовища –34,9 грн				
<i>C.diphtheriae gravis strain 4256</i>	Триптоновий гідролізат казеїну	35	9568	334,88	14
	Мальтоза	25	47,6	1,19	4
	CaCl ₂	4	7	0,028	15
	KH ₂ PO ₄	0,85	45	0,04	16
	K ₂ HPO ₄	2,55	120	0,31	17
	гідрохлорид цистеїну	0,21	701	0,11	11
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	225	8	1,8	5
	β-аланін	2,3	1091,7	2,5	6
	Пімелінова кислота	0,15	31 208,2	4,7	8
	Нікотинова кислота	4,6	249	1,1	7
	CuSO ₄ ×5H ₂ O	0,5	80	0,04	9
	ZnSO ₄ ×7H ₂ O	0,8	27	0,02	12
	MnCl ₂ ×4H ₂ O	0,24	128	0,03	13
	FeSO ₄	0,00028	6,3	0,000007	2
	Вартість 1 л середовища – 346,7 грн				
<i>C. diphtheriae Park-Williams No. 8</i>	Гідролізат казеїну	119	281	33,4	19
	Na ₂ HPO ₄	4,6	87	0,4	20
	KH ₂ PO ₄	1,74	45	0,08	16
	CaCl ₂	4,9	7	0,03	15

	β-аланін	1,15	1091,7	1,26	6
--	----------	------	--------	------	---

	нікотинова к-та	1,15	249	0,29	7
	пімелінова к-та	0,075	31 208,2	2,3	8
	CuSO4·5H2O	0,5	80	0,04	9
	ZnSO4·7H2O	0,4	27	0,01	12
	MnCl2·4H2O	0,15	128	0,02	13
	MgSO4·7H2O	225	8	1,8	5
	Мальтоза	25	47,6	1,19	4
	Лактат натрію	3,4	70	0,24	3
	Гідрохлорид цистеїну	0,4	701	0,28	11
	FeSO4·7H2O	0,0001	6,3	0,0000006	21
	K2HPO4	0,73	186	0,14	17
	CaCl2·2H2O	2,7	25	0,07	22
	Вартість 1 л середовища – 41,27				

Примітка.* - Ціни наведено станом на січень 2021 р.

1. <https://metro.zakaz.ua/uk/categories/beef-metro/>
2. <https://prom.ua/ua/p1086437845-ekstrakt-drozhzhej.html>
3. <https://prom.ua/ua/p1270090872-natrij-laktat-bochka.html?>
4. https://m.russian.alibaba.com/p-detail/Low-price-high-purity-Food-Additive-62040204564.html?spm=a2706.8168353.1998817009.15.16e028edKjPmpK&detailProductImage=%20%2F%2Fsc04.alicdn.com%2Fkf%2FHTB1zd_rMSrqK1RjSZK9760yypXaq.png_640x640.png%20
5. <https://prom.ua/ua/p746967093-magnij-sernokislyj.html?token=v2%3AgJt>
6. <https://prom.ua/ua/p761439031-aminokislota-beta-alanin.html?>
7. <https://www.systopt.com.ua/ru/item-nikotynova-kyslota>
8. https://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?term=111-16-0&interface=CAS%20No.&N=0&mode=partialmax&lang=en®ion=UA&focus=product&gclid=Cj0KCQjw0oCDBhCPARIsAII3C_GqGXrDcsq7rq7YVlStAQzIcois4MHYg_VJDURiLVrOpmx1zWwzdkUaAoHOEALw_wcB
9. <https://prom.ua/ua/p8128877-mednyj-kuporos.html?>
10. <https://marganec.prom.ua/ua/p721014218-papain.html>
11. <https://shop.hlr.ua/cistein-gidrochlorid-l-ch-98449.html>
12. <https://www.systopt.com.ua/ru/item-tsynk-sirchanokyslyj-sulfat-tsynku>
13. <https://marganec.prom.ua/ua/p277934134-marganets-hloristyj-vodnyj.html>
14. <https://prozorro.gov.ua/tender/UA-2020-11-24-015576-c>
15. <https://harkov.flagma.ua/uk/kalciy-hloristy-hlorid-kalciya-kupit-o2104499.html>
16. <https://flagma.ua/uk/kh2po4-uo44602-1.html>
17. <https://harkov.flagma.ua/uk/kaliy-fosfornokisly-2-zameshchenny-ch-o2563762.html>

18. <https://melitopol.flagma.ua/uk/kislotny-tehnicheskij-kazein-o9191694.html>
 19. <https://www.systopt.com.ua/item-natrij-fosfornokyslyj-fosfat-natriyu-odnozamisshenyj-b-v>
 20. <https://www.systopt.com.ua/item-zalizo-sirchanokysle-7-vodne>
 21. <https://flagma.ua/uk/hlorid-kalciya-so256329-1.html>

Таблиця 2.3

Умовна вартість 1 одиниці флокуляції токсину синтезованого на поживних середовищах

Біологічний агент	Концентрація токсину Лф/мл	Тривалість культивування, год	Вартість 1 л середовища, грн/л	Умовна вартість 1 Лф цільового продукту грн/г
<i>C. diphtheriae</i> CN2000	115	48	15,6	0,14
<i>C. diphtheriae</i> Park-Williams No. 8	239	48	34,9	0,15
<i>C. diphtheriae gravis</i> strain 4256	170	40	346,7	2,04
<i>C. diphtheriae</i> Park-Williams No. 8	300	48	41,27	0,13

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

Грампозитивні, нерухливі, неспороутворювальні палички, які здатні до плеоморфізму (різноманіття форм клітин) та поліморфізму (різноманіття структур клітин). Розміри клітин 3-6×0.6-0.8 мкм, тонкі, іноді мають потовщені кінці. Особливістю даних бактерій є наявність метакроматинових гранул (чи зерен волютину), які сприймають будь-який аніліновий барвник більш інтенсивно, ніж протоплазма за рахунок цього у дифтерійних бактерій спостерігається нерівномірне зафарбовування клітин(див.рис.2.1)[9].

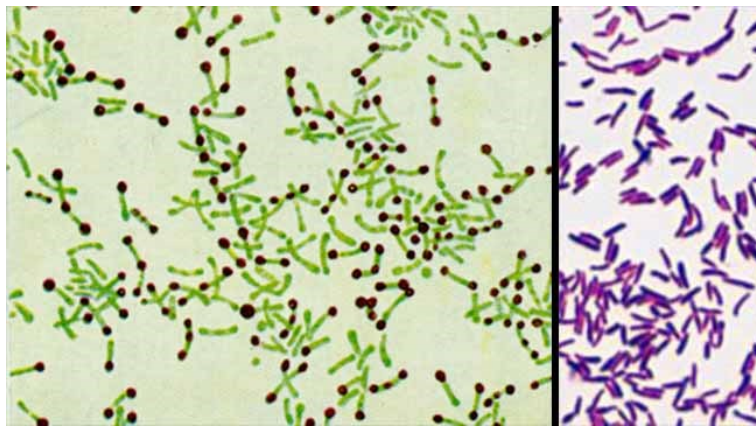


Рис.2.1. Морфологія *C.diphtheriae*

На сироватці Лефлера спостерігається характерна морфологія бактерій та швидкий ріст за 6-8 годин при температурі 37⁰С. Спочатку колонії малі, круглі, матові та білі, але при подальшій інкубації колонії стають більшими і з'являється чітко виражений жовтий відтінок (рис.3.2)[9].

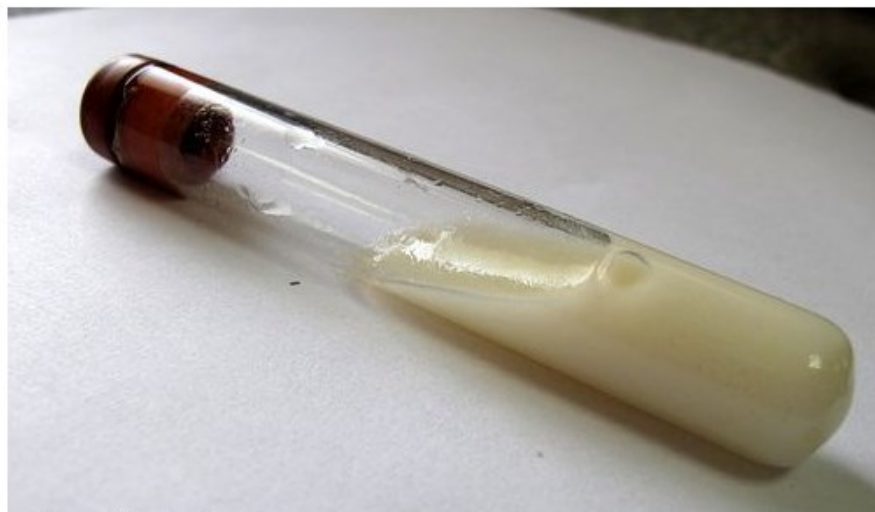


Рис.2.2. Ріст *C.diphtheriae* на сироватці Лефлера

Середовище телуритний кров'яний агар є прикладом селективного ПС, яке використовують для культивування *C.diphtheriae*. На ньому бактерії утворюють характерні чорні та сірі колонії після 48 годин інкубації. Вони відновлюють телурати до металічного телуру, який включається в колонію і надає їй чорного чи сірого забарвлення, телурати (0,04%) інгібують ріст контамінантних бактерій (рис.2.3) [10].



Рис.2.3. Ріст *C.diphtheriae* на телуровому агарі

C.diphtheriae це аеробні та факультативно анаеробні організми, найкраще ростуть в аеробних умовах за температури 37⁰С та рН 7.2-7.4.

C.diphtheriae не ростуть на простих поживних середовищах, для росту необхідне середовище, що містить амінокислоти, пуринові та піримідинові основи, до якого додають 10-15% крові тварин (барана, коня, ВРХ). Бактерії не містять спеціальних екзопротеаз для утилізації білків крові, але вони здатні використовувати ці біосубстрати як джерело ростових факторів та заліза. З цією метою у поживні середовища додають гемолізовану кров.

Для оптимального росту та продукування ДТ *C.diphtheriae* PW8 необхідним є внесення в ПС амінокислот та джерело заліза.

C.diphtheriae ферментує багато цукрів (глюкозу, галактозу, мальтозу, декстрини) продукує кислоти, але не газ. Бактерія не катаболізує лактозу, манітол, не гідролізує сечовину і не утворює фосфатазу і їй не вистачає протеолітичної активності. Здатна розщеплювати амінокислоту цистин до сірководню, за допомогою ферменту цистинази, не здатна до відновлення нітратів.

Сприйнятливість до фізичних та хімічних агентів: дифтерійна паличка гине за нагрівання при 58⁰С протягом 10 хв та за 1 хв при 100⁰С, руйнуються при дії звичайних антисептиків. Вони залишаються повністю життєздатними у пилі приміщень протягом 5 тижнів[9,10].

Чутливий до антибіотиків: пеніциліну, макролідів, азитроміцину, кларитроміцину (використовується небагатьма клініцистами), оксаліцину. Щодо еритроміцину то зараз є повідомлення серед дослідників щодо зменшення сприйнятливості бактерії до нього[11].

2.3. Таксономічний статус біологічного агента

Сучасна класифікація для *C.diphtheriae* PW8 наведена згідно другого видання Керівництва Бергі з систематики бактерій [12].

Домен – *Bacteria*.

Відділ – *Actinobacteria*.

Клас – *Actinobacteria*.

Підклас – *Actinobacteridae*.

Порядок – *Actinomycetales*.

Підпорядок – *Corynebacterineae*.

Родина – *Corynebacteriaceae*.

Рід – *Corynebacterium*.

Вид – *C. diphtheriae*.

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

3.1. Потреба у цільовому продукті

Потреби населення України у вакцині для профілактики дифтерії.

За Календарем профілактичних щеплень дітям роблять щеплення вакциною АКДП у 2, 4 та 6 місяців. У 18 місяців проводиться ревакцинація, згодом ревакцинацію проводять у 6 років вакциною АДП, наступну у 16 років – АДП-М.

АКДП – це цільноклітинна вакцина проти кашлюку, дифтерії та правцю. Таку вакцину отримують діти.

АДП – вакцина проти дифтерії та правця, без кашлюку.

АДП-М – вакцина проти дифтерії та правця зі зменшеним вмістом антигена, її застосовують для дорослих[13].

У 1 дозі (0,5 мл) вакцини для дітей (2,4,6, 18) міститься 15 флокулюючих одиниць (Лф) дифтерійного анатоксину (ДА).

У 1 дозі (0,5 мл) вакцини для дітей 6 років міститься 30 флокулюючих одиниць ДА.

У 1 дозі 0,5 мл) вакцини для осіб 16 років та для планової ревакцинації кожні 10 років міститься 5 флокулюючих одиниць[14].

Кількість новонароджених у 2020 році 293,5 тис. Згідно з календарем щеплень дітям до 18 місяців необхідні 4 дози вакцини.

На одну дитину до 18 місяців необхідно $4 \cdot 15 \text{ Лф} = 60 \text{ Лф ДА}$

На 293 500 дітей – 17 610 000 Лф

Станом на 2020 рік кількість дітей віком 6 років - 465 900.

На одну дитину 6 років необхідно 30 Лф. Отже, для того щоб забезпечити вакциною цю групу населення необхідно 13 977 000 Лф.

Станом на 2020 рік кількість осіб 16 років становить 428,965. На одну особу необхідно

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.35 КР ПЗ</i>			
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		<i>Літера</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розробник</i>		<i>Смаголь</i>			<i>РОЗДІЛ 3</i>		<i>25</i>	<i>86 25</i>
<i>Керівник</i>		<i>Пенчук</i>						
<i>Н. контр</i>								
<i>Консульт</i>								
<i>Зав. каф.</i>		<i>Стадніков</i>						
					<i>Кафедра БТМ</i>			

5 Лф. Отже, щоб забезпечити дане населення вакциною необхідно 2 144 825 Лф.

Середня тривалість життя в Україні близько 66 років.

Для планової ревакцинації чоловіків та жінок (починаючи від 16 років) необхідно 5 доз вакцини.

Кількість осіб станом на 2020 рік, яким необхідно проводити ревакцинацію становить 2 889 240. Для забезпечення ревакцинації дорослого населення необхідно 1 444 620 флокулюючих одиниць дифтерійного анатоксину[15].

Для забезпечення потреб населення України у профілактиці дифтерії необхідно:

$17\,610\,000 \text{ Лф} + 13\,977\,000 \text{ Лф} + 2\,144\,825 \text{ Лф} + 1\,444\,620 = 35\,176\,445$ одиниць флокуляції дифтерійного анатоксину.

Таблиця 3.1.

Річна потреба України у дифтерійному анатоксині – компоненту вакцини для профілактики дифтерії

Категорії хворих	Доза препарату, Лф	Курс вакцинації, кількість доз	Кількість хворих, тис	Кількість препарату на річний курс вакцинації, Лф
Діти (до 18 місяців)	15	4	293,5	17 610 000
Діти (6 років)	30	1	465,9	13 977 000
Особи 16 років	5	1	428,965	2 144 825
Дорослі	5	5	2 889 240	1 444 620
Всього:				35 176 445

3.2. Розрахунок потужності виробництва

Згідно з «Державним реєстром лікарських засобів України» в Україні зареєстровано такі вакцини для профілактики дифтерії: АД-М-Біолік, АКДП-БІОЛІК, АДП-Біолік, АДП-М-БІОЛІК, (АТ "БІОЛІК", Україна), Вакцина для профілактики дифтерії, правця та кашлюку, адсорбована, з цільноклітинним кашлюковим компонентом (СЕРУМ ІНСТИТУТ ІНДІЇ ПВТ. ЛТД., Індія), Вакцина для профілактики дифтерії та правця адсорбована (педіатрична) (СЕРУМ ІНСТИТУТ ІНДІЇ ПВТ. ЛТД., Індія), ДІФТЕТ ДТ вакцина дифтерії та правця вакцина (адсорбована) (ББ-НЦПХ Лтд., Болгарія), Вакцина для профілактики дифтерії та правця, адсорбована, із зменшеним вмістом антигену (БАЙОЛОДЖІКАЛ І. ЛІМІТЕД, Індія), Інфанрикс™ комбінована вакцина для профілактики дифтерії, правця, кашлюку ацелюлярна очищена інактивована рідка (ГлаксоСмітКляйн Біолоджікалз С.А., Бельгія), МЕНАКТРА®/МЕНАСТРА® вакцина менінгококова полісахаридна серогруп А, С, Y ТА W-135 кон'югована дифтерійним анатоксином (Санофі-Авентіс Прайвіт Ко. Лтд., США), вакцина для профілактики дифтерії, правця, кашлюку, гепатиту в та захворювань, спричинених Haemophilus influenzae Типу В, Кон'югована (Серум Інститут Індії Пвт. Лтд., Індія), Бустрикс™ комбінована вакцина для профілактики дифтерії, правця, кашлюку (ацелюлярний компонент) (адсорбована, зі зменшеним вмістом антигенів) (ГлаксоСмітКляйн Біолоджікалз С.А., Бельгія), ТЕТРАКСИМ®/TETRAХІМ вакцина для профілактики дифтерії, правця, кашлюку (ацелюлярний компонент) та поліомієліту адсорбована, інактивована, рідка (Санофі Пастер, Франція), ГЕКСАКСИМ® / НЕХАХІМ вакцина для профілактики дифтерії, правця, кашлюку (ацелюлярний компонент), гепатиту в рекомбінантна, поліомієліту інактивована та захворювань, спричинених haemophilus типу b, кон'югована, адсорбована, рідка (Санофі Пастер С.А. , Франція), ПЕНТАКСИМ® вакцина для профілактики дифтерії, правця, кашлюку (ацелюлярний компонент), поліомієліту інактивована та вакцина для профілактики інфекцій, спричинених haemophilus типу b кон'югована, адсорбована (Санофі пастер, Франція)[16].

До 2015 року МОЗ України закуповувало Пентаксим, Інфанрикс з ацелюлярним протикашлюковим компонентом та Інфанрикс ПВ у виробника ГлаксоСмітКляйн Біолоджікалз С.А., Бельгія.

Нині Україна закуповує за кошти державного бюджету вакцину проти дифтерії - в Індії. МОЗ не регулює, які вакцини і в якому обсязі постачальникам завозити на приватний ринок України, а також не впливає на наявність конкретних вакцин у приватних закладах.

За інформацією МОЗ, станом на 01.08.2018 р. було закуплено 2 млн 46 тис. 860 доз вакцини для профілактики дифтерії, правця та кашлюку, виробник – Serum Institute of India Pvt.Ltd.

У 1 дозі (0,5 мл) міститься 25 Лф ДА. У 2 046 860 доз міститься 51 171 500 Лф ДА.

Така кількість закупленої державою вакцини повністю покриває потреби країни у ній, але слід враховувати той факт, що за словами заступника міністра охорони здоров'я Ольги Стефанишиної це було вперше за 7 років і у попередні роки статистика закупівлі вакцини була не такою райдужною[17,18].

Тому задля забезпечення належного рівня імунізації населення України потрібно розробити своє власне виробництво вакцини.

Своїм виробництвом ми хочемо покрити 9% потреб населення у дифтерійному анатоксині.

Продуцент дифтерійного токсину *C.diphtheriae* PW8 синтезують 300 одиниць флокуляції токсину на мл.

Умовно приймемо, що 300 одиниць флокуляції токсину це 1 мг.

Отже, враховуючи ці дані для того, щоб забезпечити потреби населення необхідно виробляти:

35 176 445 Лф – 100%

х Лф – 9%

х = 3 165 880 одиниць флокуляції дифтерійного токсину

300 Лф – 1 мг

3 165 880 Лф – x мг

x = 10 552, 9 мг

Таку кількість ДТ можна отримати з такої кількості культуральної рідини:

300 мг - 1 л

10 552, 9 мг – x л

x = 35 176 мл = 35,2 л

Враховуючи сумарні втрати при виділенні та очистці 40% необхідно отримати таку кількість культуральної рідини:

$V_{кр.} = 35,2 \text{ л} / (1 - 0,4) = 58,7 \text{ л}$

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

Розрахуємо, скільки культуральної рідини потрібно отримати за цикл ферментації, аби розрахувати кількість стадій приготування посівного матеріалу.

Приймаємо кількість робочих трудоднів (Трд) 32, тоді кількість продукту на добу (V_d) буде становити:

$V_d = V_{гп} / \text{Трд} = 58,7 / 32 = 1,83 \text{ л}$

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

$V_{кр} = (K1 * V_d * T_{цф}) / 24 = (1,1 * 1,83 * 58) / 24 = 4,86 \text{ л}$

$T_{цф}$ = цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу (48 год) та час підготовки ферментера до роботи (10 год)

$K1$ = коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій ($K1 = 1,1 - 1,5$).

Підготовка ферментера включає: миття та огляд (2 год), перевірка на герметичність (2 год), стерилізація (2 год), охолодження (1 год), завантаження

середовища (1,5 год), засів (0,5 год), вивантаження культуральної рідини (1 год).

4,86 л культуральної рідини ($V_{цк}$) можна отримати у ферментері, геометричний об'єм якого має становити:

$$V_{Г} = V_{цк}/K_{зап} = 4,86/0,6 = 8,1 \text{ л}$$

$K_{зап} = 0,6$ – коефіцієнт заповнення ферментера

Найближчий об'єм стандартного ферментера 10 л ($V_{ф}$)

Уточнюємо коефіцієнт заповнення

$K_{зф} = V_{цк}/V_{ф} = 4,86/10 = 0,486$, що не перевищує заданого значення.

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

За виробничий цикл отримують 4,86 л культуральної рідини.

При одержанні культуральної рідини потрібно врахувати її втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 до 15%.

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом становитиме:

$$V_{роб.1} = V_{кр}/(1-E_{ф}) = 4,86/(1-0,15) = 5,72 \text{ л}$$

$E_{ф}$ – втрати культуральної рідини під час біосинтезу

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері з робочим об'ємом $V_{роб.1} = 5,72$ л

При вибраному коефіцієнті заповнення $K_{зап} = 0,55-0,6$ розраховують можливий геометричний об'єм ферментера ($V_{ф}$), що становить

$$V_{ф} = V_{роб.1}/K_{зап} = 5,72/0,6 = 9,53 \text{ л}$$

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

$$K_{зап1} = V_{роб.1}/V_{сф} = 5,72/10 = 0,57$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах, отже геометричний об'єм ферментера вибрано правильно.

Кількість посівного матеріалу (доза) для ферментера становить 10% від об'єму ПС.

Тоді кількість ПС у ферментері буде становити:

$$V_{пс1} = V_{роб.1}/(1+X_{ф}) = 5,72/(1+0,1) = 5,2 \text{ л}$$

$X_{ф}$ – доза ПМ для ферментера

$$\text{Кількість посівного матеріалу становить } V_{пм1} = V_{роб.1} - V_{пс1} = 5,72 - 5,2 = 0,52 \text{ л}$$

Таку кількість ПМ можна отримати культивуванням бактерій у колбах на качалці. Для цього використовують качалочні колби об'ємом $V_{колб} = 750$ мл та коефіцієнтом заповнення $K_{зк} = 0,2$.

Кількість колб для отримання ПМ становитиме:

$$N_{колб} = V_{пм1}/(V_{колб} * K_{зк}) = 0,52/(0,75 * 0,2) = 3,47 = 4 \text{ качалочні колби.}$$

Отже для отримання ПМ необхідно 4 качалочні колби.

Для біосинтезу дифтерійного токсину необхідно встановити 1 ферментер на 10 л.

РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

4.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу

4.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Умови і спосіб культивування безпосередньо залежать від фізіолого-біохімічних особливостей продуцента.

Бактерії виду *C.diphtheriae* це аеробні організми, ростуть за температури 37⁰С та рН 7.2-7.4. Враховуючи це, можливий ризик контамінації сторонніми мезофільними і нейтрофільними мікроорганізмами. Тому необхідно забезпечити стерильні умови під час біосинтезу, які поширюються на стерилізацію обладнання і комунікацій, поживного середовища, аераційного повітря, піногасників. Культивування *C.diphtheriae* відбувається глибинним способом[19].

Біосинтез ДТ реалізують періодичним способом, оскільки синтез токсину починається під час фази експотенційного росту і продовжується після припинення експотенційної фази. Використання безперервного культивування не є доцільним у даному випадку, адже буде спостерігатися значне зменшення синтезу токсину[20].

Обґрунтування типу ферментера здійснюється залежно від особливостей процесу культивування, які визначаються фізіолого-біохімічними властивостями продуцента.

Продуцент-аероб розвивається по всій товщі середовища під час глибинного способу культивування, так як розчинність кисню у воді невелика, а мікроорганізми можуть утилізувати тільки розчинний в воді кисень, потрібно постійно збагачувати середовище киснем, задля забезпечення інтенсивного росту. У зв'язку з цим варто використовувати ферментер, оснащений барботером, для подачі стерильного повітря. Літературне джерело [20], у якому наведена інформація щодо оптимізації процесу синтезу токсину обраним БА, свідчить, що при швидкості аерації 0,7 л/хв спостерігається найвищий показник виходу токсину.

Перемішування за допомогою мішалок необхідне для посилення масообмінних процесів і кращої гомогенізації культуральної рідини. Під час перемішування

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.35 КР ПЗ</i>		
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>			
<i>Розробник</i>		<i>Лмаголь</i>			<i>Літера</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Керівник</i>		<i>Пенчук</i>				32	86 32
<i>Н. контр</i>					<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Консульт</i>							
<i>Зав. каф.</i>		<i>Стадніков</i>					

забезпечується максимальний контакт клітин з киснем повітря, поживними речовинами.

Вибір типу мішалки залежить від умов культивування, об'єму та форми ферментера.

За будовою лопатей мішалки поділяються на лопатеві, пропелерні, турбінні, спеціальні (якірні, рамні, барабанні та ін.). За розміщенням мішалки можуть бути вертикальними, бічними, донними, зануреними. Мішалка може приводитися в рух електродвигуном або пневмодвигуном. За швидкістю обертання мішалки поділяють на швидкохідні (пропелерні, турбінні, лопатеві, фрезерні) і тихохідні (не більше 1 об/сек - рамні, якірні, шнекові, спіральні, стрічкові, листові, лопатеві). Залежно від того, який потік утворюють мішалки в ємності або апаратах, їх можна розділити на мішалки, що створюють тангенціальний, радіальний, аксіальний і змішаний потік.

Перевагами лопатевих мішалок є простота конструкції, невисока ціна виготовлення, простота у використанні. Серед недоліків - слабкий осьовий потік, який не забезпечує повного перемішування всього об'єму рідини в ємності або апараті, через це мішалка в основному переміщує ті шари рідини, які розташовані поблизу лопатей. Частота обертів лопатевих мішалок коливається від 18 до 80 об/хв. Основними перевагами пропелерної мішалки є: висока інтенсивність перемішування і помірні витрати електроенергії, навіть при значному числі оборотів. Головні недоліки - мала ефективність при перемішуванні в'язкої рідини і обмежений обсяг інтенсивно перемішуваної рідини. Крім того, пропелерна мішалка має більш складну конструкцію, ніж лопатева, і значить дорожча у виготовленні. Турбінні мішалки застосовують у найрізноматніших випадках перемішування. Перевагами турбінних мішалок є швидкість перемішування і розчинення, ефективне перемішування в'язких рідин і придатність для безперервних процесів. Недоліками турбінних мішалок можна вважати порівняльну складність і високу вартість виготовлення[21].

Згідно з джерелом [20] швидкість обертів мішалки 600 об/хв забезпечує найвище значення синтезу ДТ.

Моніторинг рН є критичним у регулюванні вироблення дифтерійного токсину. Під час споживання ростового субстрату мальтози *C.diphtheriae* PW8, остання перетворюється у глюкозу, яка під час метаболізму виділяє органічні кислоти, що

спричиняє зниження рН. Підвищення рівня рН та розчиненого кисню на останньому етапі є сигналом про припинення культивування[20].

Для контролю піноутворення в ферментер додають силіконовий піногасник. Силіконові піногасники ефективні в кислому, нейтральному і слабколужному середовищі. Внаслідок високої термостабільності вони не розкладаються навіть при максимальних робочих температурах; вони хімічно індиферентні по відношенню до більшості речовин, практично нелеткі, не сповільнюють технологічний процес, не змінюють свої властивості при зберіганні, а також при нагріванні в процесі піногасіння[22].

Отже, підсумовуючи все вищенаведене – ферментер обов'язково повинен бути обладнаний датчиками температури (підтримка 37°C), зондом рН, який контролюється шляхом додавання 6% HCl, ротаметром для концентрації розчиненого O₂, датчиком для контролювання швидкості перемішування та датчиком піни, які забезпечать технологічний контроль за процесом біосинтезу.

Вибираємо ферментер BIOSTAT[®] Cplus, який відповідає затребуваним вимогам для нашого культивування.

Технічні характеристики:

- Об'єм ферментера – 10 л;
- Корпус – нержавіюча сталь AISI 304, 316L;
- Робоча температура - 0°C–150°C;
- Максимальна відносна вологість - 0°C–100%;
- Тиск (-0,5) – 2 бар;
- Потужність двигуна - від 500 до 1200 Вт;
- Швидкість обертання - 20-1500 об/хв;

Можливість вибору типу нагрівання - електричний або парою. Влаштовані датчики температури, рН, розчиненого кисню, рівня піни і культуральної рідини, стерильні фільтри і охолоджувач відпрацьованого газу. Управління та регулювання швидкості перемішування, рН, концентрації розчиненого кисню, температури, подачі субстрату і піногасника, складу газової суміші та ін.

Можливість підключення додаткових датчиків для вимірювання оптичної густини середовища і Red / Ох-потенціалу[23].



Рис.4.1. Ферментер BIOSTAT® Cplus

4.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря

Високі концентрації дифтерійного токсину у культуральній рідині досягаються за рахунок інтенсифікованої подачі повітря та процесу перемішування. При цьому необхідною умовою вирощування глибинної культури продуцента є асептичність, тому повітря, що подається на аерацію, має бути стерильним. Тому необхідно передбачити підготовку стерильного аераційного повітря.

Очищення повітря можна досягнути економічно доступним та ефективним методом за допомогою волокнистих і пористих матеріалів. Саме таким способом досягається одержати повітря зі ступенем чистоти 99,99%. Завислі в повітрі частки затримуються волокнистим матеріалом завдяки інерційному і дифузійному механізму осадження.

- Забір атмосферного повітря здійснюють за допомогою вертикальної труби повітрозабірником у найвищій точці на висоті ~30 м будівлі, де розміщене обладнання для стиснення і очищення повітря;
- Очищення повітря від пилу $d = 50$ мкм на плоских тканинних фільтрах грубого очищення;
- Стиснення повітря в компресорах або турбоповітрядувках (повітря нагрівається до температури 120-200⁰С);
- Охолодження стисненого повітря до температури «точка роси», за якої волога повітря конденсується (використовують водяні теплообмінники різного типу: кожухотрубні, «труба в трубі»);
- Видалення конденсованої вологи та парів мастила, що потрапили з компресора, у ресивері (ємність великого об'єму); також ресивер зменшує пульсації руху повітря, що можуть негативно впливати на роботу подальших фільтрів очищення повітря;
- Стабілізація показників (тиск, температура) підігріванням до температури 45-50⁰С паром у відповідних теплообмінниках;
- Очищення у головних ємністних набивних фільтрах до ступеня очищення $E=95\%$. Головні фільтри встановлюють поблизу ферментаційних відділень;
- Очищення в індивідуальних фільтрах. Повітря від головних фільтрів через трубопроводи (колектори)подається безпосередньо до індивідуальних фільтрів, встановлених на ферментері. За допомогою них повітря очищають до ступеня $E=99,99\%$ [24].

У методичних рекомендаціях FDA щодо виробництва стерильних ліків та біологічних продуктів у асептичних умовах наведені вимоги щодо повітря задля забезпечення належного рівня чистоти.

Під час виробництва стерильних імунобіологічних препаратів стиснутий газ повинен мати відповідну чистоту (наприклад, не містити олії), а його мікробіологічна якість та якість частинок після фільтрації повинні бути рівними або кращими, ніж у повітря в навколишньому середовищі у яку вводиться газ.

Мембранні фільтри можуть використовуватися для фільтрації стиснутого газу відповідно до належного стандарту високої якості.

Ці фільтри часто використовуються для виробництва стисненого стерильного газу для проведення операцій зі стерильними матеріалами, такими як компоненти та обладнання. Рекомендується використовувати стерильні мембранні фільтри для повітряних ліній автоклавів, резервуарів, що містять стерилізовані матеріали. Газові фільтри (включаючи вентиляційні) мають бути сухими. Конденсат на газовому фільтрі може спричинити забруднення під час використання або сприяти зростанню мікроорганізмів. Використання гідрофобних фільтрів, а також застосування тепла до цих фільтрів, де це необхідно, запобігає утворенню проблемних залишків вологи. Рекомендується, щоб фільтри, які служать як стерильні межі або подають стерильні гази, які можуть вплинути на продукт, перевірялися на цілісність при установці та періодично після цього (наприклад, наприкінці використання). Тести на цілісність також рекомендуються після дій, які можуть зашкодити фільтру. Несправності під час перевірки цілісності слід розслідувати, а фільтри слід замінювати через певні проміжки часу.

Можна використовувати HEPA чи ULPA фільтри. Неушкоджений фільтр HEPA повинен вловлювати щонайменше 99,97% твердих частинок діаметром понад 0,3 мкм.

Фільтр ULPA може видаляти з повітря як мінімум 99.9999% часток розміром 0.12 мкм і більше. Фільтр ULPA є близьким до фільтру HEPA, але навіть більш ефективним. Ці фільтри використовуються для фільтрації повітря, для очисних систем, для контролю рівня зважених часток в повітрі і для того, щоб зупинити поширення токсичних агентів та інфекційних захворювань. Вони видаляють пил, пилок, цвіль, бактерії і частинки в повітрі розміром більше 0.12 мкм [25].

4.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

Для санітарної обробки об'єктів підприємства допускається застосування дезінфікуючих та миючих з дезінфікуючим ефектом засобів, які в установленому порядку внесені в «Обліковий перелік дезінфекційних засобів в Україні», з метою миття або дезінфекції об'єктів фармацевтичної промисловості.

Режим прибирання та дезінфекції повинні бути обрані за результатом валідації та оцінки ризиків за допомогою екологічного моніторингу чистого приміщення.

Під час виробництва стерильних імунобіологічних препаратів необхідна надійна процедура очистки та дезінфекції задля забезпечення належної мікробіологічної чистоти у чистих приміщеннях. Наявність навіть мінімальної кількості небажаних вірусів, мікоплазм чи бактерій вважається неприйнятним.

У випадку неналежного процесу очищення приміщень є значні ризики для безпеки пацієнтів, рекламацій з боку споживачів і як результат значні фінансові втрати для компанії[26].

Дезінфікуючий засіб є однією з різноманітних хімічних речовин, які зменшують кількість присутніх мікроорганізмів (зазвичай на предметах). Існують різні «офіційні» визначення процесу дезінфекції та дезінфікуючих засобів, одне з найпростіших – із стандарту ISO з асептичної обробки (ISO 13408–11), де дезінфікуючий засіб визначається як: «хімічний чи фізичний агент, який інактивує вегетативні мікроорганізми, але не обов'язково спори з високою стійкістю».

Існує безліч різних типів дезінфікуючих засобів для використання у фармацевтичних чистих приміщеннях з різним спектром активності та способами дії. Необхідно враховувати низку різних факторів у процесі вибору, включаючи спосіб дії, а також ефективність, сумісність, вартість та з посиланням на чинні стандарти здоров'я та безпеки. Основні моменти, які слід враховувати при виборі дезінфікуючого засобу:

- Дезінфекційний засіб повинен мати широкий спектр дії. Це відноситься до здатності дезінфікуючого засобу знищувати різні типи мікроорганізмів, які знаходяться у різних фізіологічних станах.
- Якщо є вимога, що дезінфікуючий засіб був спороцидним то ця вимога впливає на тип дезінфікуючого засобу, що купується. При виборі спорицидного деззасобу, як правило, потрібен більш уважний розгляд засобу з точки зору здоров'я та безпеки. Деякі, особливо дезінфікуючі засоби на основі хлору, агресивні по відношенню до певних типів поверхонь і викликають знебарвлення та стирання.
- Дезінфікуючий засіб має діяти швидко, з ідеальним часом контакту менше десяти хвилин. Час контакту - це час, витрачений щоб дезінфікуючий засіб міг зв'язатися з мікроорганізмом, пройти через клітинну стінку та мембрану і досягати своєї конкретної цільової ділянки. Чим більший час контакту, тим довше необхідно залишити поверхню або виріб перед використанням.
- Вибрані деззасоби повинні мати різні механізми дії.
- Деякі дезінфікуючі засоби для правильного функціонування потребують певного діапазону температури і рН. Один тип дезінфікуючого засобу, наприклад, може виявитися неефективним у холодному приміщенні через нижчу температуру. Причина цього в тому, що стандарти валідації дезінфікуючих засобів вимірюють бактерицидну активність при 20 °С, і тому дезінфікуючий засіб може бути не таким ефективним за більш високих або нижчих температур.
- Перед використанням дезінфікуючих засобів важливо видалити якнайбільше бруду. Це вимагає застосування миючого засобу. Деякі дезінфікуючі засоби несумісні з певними миючими засобами. У таких випадках залишки миючого засобу можуть нейтралізувати активний інгредієнт дезінфікуючого засобу. Будь-який куплений дезінфікуючий засіб повинен бути сумісним з миючим засобом, що використовується.

- Повинен добре змиватися без залишків на поверхнях. Хоча це може означати продовження антимікробної активності, залишки також можуть призвести до липкості поверхонь та/або до інактивації інших дезінфікуючих засобів.
- Деззасіб повинен бути сумісний з оброблюваними поверхнями. Дезінфікуючі засоби не повинні пошкодити матеріал, на якому вони застосовуються (хоча відомо, що повторне нанесення протягом кількох років може спричинити деяку корозію). Після використання більш агресивних деззасобів іноді необхідно протирати водою або менш агресивним дезінфікуючим засобом, наприклад, спиртом, щоб видалити залишки. Крім деяких дезінфікуючих засобів, що спричиняють роз'їдаючу дію, інші можуть абсорбуватися тканинами, гумою і т. д., що знижує їх бактерицидні властивості.
- Дезінфікуючі засоби повинні відповідати вимогам стандартів валідації для вимірювання бактерицидної, фунгіцидної та, при необхідності, спороцидної та віруліцидної активності. Існують докладні стандарти, які описують, як слід перевіряти дезінфікуючі засоби, частина яких робиться виробником, а деякі - фармацевтичною організацією, що закупає дезінфікуючі засоби для різних поверхонь.
- Дезінфікуючі засоби мають бути відносно безпечними з погляду стандартів здоров'я та безпеки. Тут основна увага приділяється благополуччю оператора. Також розглядається вплив засобу на навколишнє середовище.
- Вартість дезінфікуючого засобу також є важливим фактором; особливо коли він використовується для великої площі.
- Якщо дезінфікуючий засіб потрібен для використання в зоні асептичного розливу, його необхідно стерильно відфільтрувати (через фільтр 0,2 мкм) або доставити у стерильному вигляді належним чином обгорнутому контейнері, який піддавався впливу гамма-випромінювання.

Після вибору та покупки дезрозчину необхідно забезпечити правильне його використання. Будь-який дезінфікуючий засіб буде ефективним тільки в тому випадку, якщо він використовується в правильній концентрації, буде наноситися на відносно чисті поверхні за допомогою мопів або серветок для відповідного класу приміщень і залишатися на правильний час контакту.

На додаток до поверхневих дезінфікуючих засобів також потрібні дезінфікуючі засоби для рук (щоб персонал чистих приміщень міг наносити їх або на шкіру або на руки в рукавичках) в рамках комплексної програми дезінфекції.

Види дезінфікуючих засобів

Дезінфікуючі засоби розрізняються за спектром дії, способом дії та ефективністю.

Дезінфікуючі засоби по-різному діють на мікробну клітину через їхнє хімічне розмаїття. Різні дезінфікуючі засоби націлені на різні ділянки клітини. До них відносяться клітинна стінка, цитоплазматична мембрана (де матриця фосфоліпідів та ферментів забезпечують різні мішені) та цитоплазма.

Деякі дезінфікуючі засоби, потрапляють в клітину порушуючи мембрану або за допомогою дифузії, потім продовжують діяти на внутрішньоклітинні компоненти.

Існують різні підходи до категоризації та підрозділу дезінфікуючих засобів, включаючи угруповання за хімічною природою, способом дії або за бактеріостатичним та бактерицидним впливом на мікроорганізми.

Бактеріостатичні деззасоби – перешкоджають зростанню бактеріальної популяції. Такий дезінфікуючий засіб може викликати селективні та оборотні зміни клітини шляхом взаємодії з нуклеїновими кислотами, пригнічення ферментів або проникнення в клітинну стінку. Після того, як дезінфікуючий засіб буде видалено від контакту з клітинами бактерій, популяція бактерій, що вижила потенційно може зростати.

Бактерицидні деззасоби – руйнують бактеріальні клітини за допомогою різних механізмів, включаючи структурне пошкодження клітини; автоліз; лізис клітин та витік або коагуляція цитоплазми.

У межах цього групування спектр активності варіює: одні дезінфікуючі засоби ефективні лише проти вегетативних грампозитивних та грамнегативних мікроорганізмів, тоді як інші ефективні проти грибів. Деякі дезінфікуючі засоби мають спороцидну дію, оскільки вони можуть викликати руйнування бактерій, що утворюють ендоспори (це найбільш складні форми мікроорганізмів, які важко усунути з поверхонь чистих приміщень)

Є кілька різних типів дезінфекційних засобів:

Неокислювальні дезінфікуючі засоби

Більшість дезінфекційних засобів цієї групи мають специфічні способи дії проти мікроорганізмів, але зазвичай вони мають вузький спектр дії порівняно з окислюючими дезінфікуючими засобами. До цієї групи входять:

- спирти (порушують мембрану бактеріальної клітини),
- альдегіди (які мають неспецифічний ефект при денатурації білків бактеріальних клітин і можуть викликати коагуляцію клітинного білка),
- амфотери (які мають як аніонний, так і катіонний характер і мають відносно широкий спектр дії),
- фенольні сполуки (деякі феноли викликають ушкодження бактеріальних клітин через порушення рушійної сили протона, тоді як інші атакують клітинну стінку та викликають витікання клітинних компонентів та денатурація білка)
- четвертинні амонієві сполуки (ЧАС), які є одними з найбільш часто використовуваних деззасобів у фармацевтичній промисловості. Механізм дії ЧАС на клітинну мембрану призводить до витоку цитоплазми та коагуляції цитоплазми за рахунок взаємодії з фосфоліпідами.

Окиснювальні дезінфікуючі засоби

Ці деззасоби зазвичай мають неспецифічну дію проти мікроорганізмів. Вони мають більш широкий спектр дії, ніж неокислюючі дезінфікуючі засоби, при цьому більшість типів здатні ушкоджувати ендоспори, але вони можуть становити більший ризик для здоров'я людини і, отже, потребують суворого контролю. До цієї групи входять галогени, такі як йод, та окислювачі, такі як пероцтова кислота, пероксид водню.

Дезінфікуючі засоби для рук

Існує безліч наявних у продажу дезінфікуючих засобів для рук, з яких найчастіше використовуються гелі на спиртовій основі або спиртові засоби для розтирання рук. При використанні дезінфікуючих засобів для рук найбільш важливим фактором є техніка втирання, так як засоби, що дезінфікують, найбільш ефективні за рахунок рівномірного розподілення, втираючи дезінфікуючий засіб.

Ротація дезінфікуючого засобу

При виборі деззасобів багато виробників фармацевтичної продукції вважають за краще мати два дезінфікуючі засоби, які використовуються в процесі експлуатації, а іноді і третій дезінфікуючий засіб як резерв на випадок серйозного зараження, такого як накопичення біонавантаження, яке здається стійким або важко усунути, використовуючи зазвичай використовуваний деззасіб. Це вимога EU GMP "Там, де використовуються дезінфікуючі засоби, слід використовувати більше одного типу" (Додаток 1). Резервний дезінфікуючий засіб часто буває сильнішим і спороцидним, наприклад окиснювач, рутинне використання якого обмежене через ймовірне пошкодження обладнання та приміщення. Таку процедуру здійснюють з метою уникнення розвитку резистентності мікроорганізмів.

При використанні дезінфікуючих засобів з різними механізмами дії найчастіше один із вибраних дезінфікуючих засобів є спороцидним. Що стосується частоти зміни деззасобу це, як правило, засноване по даних екологічного моніторингу.

Обґрунтування вибору методу та способу дезінфекції

Найбільш ефективний процес очищення та дезінфекції виконується вручну з використанням техніки протирання (механічний спосіб). Деякі установи використовують методи фумігації чи туманоутворення. Ці методи ефективні, коли поверхні чисті і дезінфікуючий засіб може потрапити на всі поверхні чистих приміщень.

При прибиранні приміщень вручну використовуване обладнання (швабри та відра) повинно мати конструкцію, що відповідає класу чистих приміщень. Процедури очистки вимагають суворого режиму. Чищення і дезінфекція з використанням ганчірок і насадок для швабри (мопів) в ідеалі виконується шляхом просочування ганчірки або мопа і протирання області за допомогою серії паралельних перекриваючих рухів з перекриттям приблизно на одну четверту. Ніколи не слід використовувати кругові рухи. Напрямок очищення повинен бути у напрямку оператора (зверху-вниз, ззаду-вперед). Дезінфікуючий або миючий засіб слід наносити лише один раз, щоб уникнути надмірної концентрації. Очищення та дезінфекцію слід починати спочатку з візуально чистої зони, а потім – з найбруднішої[27,28].

Обґрунтувати вибір дезінфікуючого засобу для оброблювальних об'єктів

Вибрані дезінфікуючі засоби вибрані згідно основних вимог наведених вище, також всі вибрані деззасоби мають миючий ефект і вони добре очищають поверхню об'єкта, посилюють дію основної речовини та знижують поверхневий натяг, що забезпечує краще їх проникнення до об'єкта дезінфекції, до того ж відомо, що деякі миючі засоби можуть нейтралізувати активний інгредієнт дезінфікуючого засобу, тому вибір такого типу деззасобу це унеможливило. Всі вибрані деззасоби не містять у своєму складі альдегідів (які є сильними алергенами, викликають опіки при попаданні на шкіру та є низько стабільними при зберіганні, використанні, транспортуванні), хлору (виражені сенсibiliзуючі, гепатотоксичні властивості, руйнують поверхні будь-яких

матеріалів, спричиняють корозію металів і металевих покриттів і підлягають обов'язковому змиву з поверхні обробки), фенолів, важких металів.

До того ж вибрані деззасоби не потребують змиву після використання.

Аніосепт актив – діючі речовини: перкарбонат натрію - 42,3-51,7 %; тетраацетилетилендіамін - 22,5-27,5 %; четвертинні амонієві сполуки (ЧАС) - 2,1 -2,6 % ; дезінфікуючий засіб робочі розчини якого мають гарні миючі властивості, не викликають корозії виробів з нержавіючої сталі. Засіб біологічно розпадається. Знезараження поверхонь в приміщеннях, контамінованих спороутворюючими бактеріями, в т. ч. на підприємствах фармацевтичної, мікробіологічної та біотехнологічної промисловості; використовується для поточної, профілактичної та заключної дезінфекції. Має широкий спектр дії (*бактерицидні, спороцидні, туберкулоцидні, фунгіцидні, вірулецидні властивості*). При введенні в шлунок відноситься до 3 класу помірно небезпечних речовин, при нанесенні на шкіру - до малонебезпечних речовин (4 клас безпеки). Робочі розчини засобу АНІОСЕПТ АКТИВ UA класифікуються як безпечні для здоров'я людей і навколишнього середовища.

Концентрат засобу стабільний при температурі від + 5 ° C до + 30 ° C[29].

АНІОЗИМ ДД1 UA - діючі речовини: N,N-дидецил-Nметилполі(оксіетил)амоній пропіонат - 5,67- 6,93%; полі(гексаметиленбігуанід) гідрохлорид - 0,816-1,104%; комплекс ферментів (протеаза, амілаза, ліпаза) - 0,07-0,08%); дезінфікуючий засіб з гарними миючими властивостями, завдяки синергічній дії детергентів та комплексу ферментів. Ензимний комплекс включає протеазу, ліпазу та амілазу, завдяки чому відбувається інтенсивний гідроліз білків, жирів та вуглеводів до простих білків, моногліцеридів та глюкози, що дозволяє ефективно та швидко видалити органічні забруднення. Водні розчини прозорі практично без запаху. Робочі розчини засобу не містять окиснювачів, не викликають корозії, засіб добре змивається з поверхонь, не утворює нальоту, не фіксує органічні забруднення. Має широкий спектр дії: бактерії (в т.ч. синьогнійна паличка, золотистий стафілокок, збудники туберкульозу та ін.), Дріжджові гриби, віруси (в т.ч.

гепатит В і С, ВІЛ, герпес тип 1 і ін)Швидка дія: 5 - 15 хв. Концентрат засобу стабільний при температурі від +5°C до +35°C. Аніозим ДД1 UA біологічно розпадається[30].

Пероксін плюс - д.р.: полігексаметиленгуанідин гідрохлорид – 2,5%, перекис водню – 10,0% – **повний спектр антимікробної активності** (бактерицидний, фунгіцидний, віруліцидний, спороцидний, овоцидний), виражені миючі властивості, висока проникаюча здатність, помірна корозійна активність, 100% біодеградацію і екологічна безпека. Не містить токсичних компонентів (спиртів, альдегідів, фенолу і його похідних), не створює небезпечних випарів у повітрі закритих приміщень, робочий розчин без запаху[31].

Даний деззасіб вибрано як резервний у випадку серйозного забруднення, біонавантаження, у складі даного деззасобу міститься пероксид водню тому щоденне використання обмежене у зв'язку з можливістю пошкодження поверхонь.

Для дезінфекції рук персоналу вибираємо Фамідез® Дезодерм – готовий до використання спиртовий розчин для дезінфекції шкіри тіла та рук шляхом оприскування чи протирання. Завдяки діючим компонентам придатний для проблемної шкіри, містить високоякісні компоненти, що зволожують шкіру та захищають її ліпідний шар. Сумісний з усіма миючими засобами, не містить альдегідів, фенолів, амонієвих сполук. Має бактерицидну, фунгіцидну, віруліцидну дію[32].

Виробництво дифтерійного токсину здійснюється протягом 32 днів. Оптимальна площа виробничого приміщення, в якій встановлено ферментер (10л), автоклав, колби на качалці встановлені на столі становить 20 м² (5*4). Висота стін – 2,5 м. Загальна площа стін становить $((5*2,5)+(4*2,5))*2 = 45$ м². Площа підлоги – 20м².

Загальна площа поверхонь для дезінфекції при поточному прибиранні визначається шляхом додавання площі підлоги в приміщеннях і площі поверхонь обладнання та меблів:

$$S = S_{\text{підл}} + S_{\text{меб}}$$

$$S = 20 \text{ м}^2 + 20 \text{ м}^2 = 40 \text{ м}^2$$

При розрахунку площі, що підлягає дезінфекції під час генерального прибирання, враховують не тільки площу підлоги приміщень, але і площу стін, меблів, обладнання та устаткування, а також санітарно-технічного обладнання.

$$S = 20 \text{ м}^2 + 20 \text{ м}^2 + 45 \text{ м}^2 = 85 \text{ м}^2$$

Генеральне прибирання проводять перед початком виробничого процесу тобто перед виробничим циклом: всього 12 циклів за 32 трудовні, а щоденне – перед кожною робочою зміною – 1 раз на добу.

Потреба в дезінфікуючому засобі для обробки поверхонь визначається за формулою:

$$\text{Одз} = 0,01 \cdot N \cdot K \cdot S \cdot \text{КОд} \cdot \text{Д} \cdot \text{Одз}$$

де: Одз (л) – загальний об'єм концентрату дезінфікуючого засобу (ДЗ) в літрах, необхідна для знезараження поверхонь приміщень [л]; N – норма витрати дезінфікуючого розчину в літрах на 1 м² (згідно з інструкціями щодо застосування конкретних препаратів при обробці методом протирання/зрошення) [л м²]; K – коефіцієнт, що дорівнює величині концентрації дезінфікуючого розчину по препарату [%]; S – площа оброблюваних поверхонь [м²]; КОд – кратність обробки на добу; Д – кількість днів в розрахунковому періоді (місяць, квартал, півріччя, рік).

Аніосепт:

$$\text{Одз} = 0,01 * 0,1 * 0,1 * 40 * 1 * 1 = 0,004 \text{ кг}$$

$$\text{Одз} = 0,01 * 0,1 * 0,1 * 85 * 1 * 1 = 0,0085 \text{ кг}$$

АНИОЗИМ ДД1 UA:

$$\text{Одз} = 0,01 * 0,1 * 0,5 * 40 * 1 * 1 = 0,02 \text{ л}$$

$$\text{Одз} = 0,01 * 0,1 * 0,5 * 85 * 1 * 1 = 0,043 \text{ л}$$

Пероксін плюс:

$$\text{Одз} = 0,01 * 0,1 * 1 * 40 * 1 * 1 = 0,04 \text{ л}$$

$$\text{Одз} = 0,01 * 0,1 * 1 * 85 * 1 * 1 = 0,085 \text{ л}$$

Таблиця 4.2

Орієнтовний розрахунок потреби в дезінфекційних засобах для дезінфекції поверхонь у приміщеннях, обладнання тощо на 2021 рік

№ з/п	Найменування підрозділів об'єкта	Кількість підрозділів	Площа, що підлягає дезінфекції, кв.м.		Дезінфікуючий засіб			Кратність обробок		Потреби в деззасобах, л (кг)		
			При поточному прибиранні	При генеральному прибиранні	Назва	Концентрація робочого розчину, %	Норма витрати робочого розчину на 1 кв. м	На добу	На місяць	На одну обробку		На місяць
										При поточному прибиранні	При генеральному прибиранні	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
	Приміщення виробничого біосинтезу	1	40 м ²	85 м ²	Аніосепт актив	0,1	0,1 г порошку	1	30	0,004 кг	0,0085 кг	
	Приміщення виробничого біосинтезу	1	40 м ²	85 м ²	АНІОЗИМ ДД1 UA	0,5	0,1 л	1	30	0,02 л	0,043 л	0,6 л
	Приміщення виробничого біосинтезу	1	40 м ²	85 м ²	Пероксін плюс	1	0,1 л	1	30	0,04 л	0,085 л	1,2 л

4.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Максимальний синтез дифтерійного токсину (300 Лф/мл за 48 год) досягається за умов росту штаму *C. diptheriae* PW 8 на середовищі такого складу (г/л):

- Гідролізат казеїну – 119;
- Розчин модифікованого ростового фактору Мюллера:
 - β-аланін – 1,15;
 - нікотинова к-та – 1,15;
 - пімелінова к-та – 0,075;
 - CuSO₄·5H₂O – 0,5;
 - ZnSO₄·7H₂O – 0,4;
 - MnCl₂·4H₂O – 0,15;
 - MgSO₄·7H₂O – 225;
- Мальтоза – 25;
- Лактат натрію – 3,4;
- Цистеїн гідрохлорид – 0,4;
- FeSO₄·7H₂O – 0,0001;
- K₂HPO₄ – 0,73;
- KH₂PO₄ – 0,24;
- CaCl₂·2H₂O – 2,7

Згідно з розрахунків, наведених у розділі 1, виробничий біосинтез дифтерійного токсину здійснюється у ферментері об'ємом 10 л, що містить 5,2 л поживного середовища. Одержання інокуляту відбувається у один етап у колбах на качалці.

Приготування 7% розчину HCl

Для підтримання оптимального рН середовища необхідно приготувати стерильний розчин HCl.

Приготування розчину FeSO₄·7H₂O

У складі поживного середовища сіль FeSO₄·7H₂O міститься у малій кількості, яку складно зважити на технічних вагах, тому доцільно приготувати концентрований розчин. Готують 100 мл 1% розчину. Даний концентрований розчин буде використовуватися для двох ПС для вирощування інокуляту та виробничого біосинтезу та буде стерилізуватися методом холодної стерилізації разом з іншими компонентами композиції А.

Приготування розчину ростового фактору Мюллера

Необхідно приготувати 0,5 л розчину ростового фактору для двох ПС. Приготований розчин будуть стерилізувати мембранною фільтрацією з використанням системи Stericup.

- Для вирощування посівного матеріалу у колбах необхідно 0,52 л поживного середовища.

Композиція А: гідролізат казеїну, лактат натрію, цистеїн гідрохлорид, K₂HPO₄, KH₂PO₄, CaCl₂·2H₂O (стерилізація фільтрацією).

Композиція Б: мальтоза (режим стерилізації: протягом 30 хв за температури 112 °C і при значенні тиску 0,05 МПа).

Композицію А будуть стерилізувати за допомогою мембранної фільтрації з використанням системи вакуумної фільтрації Stericup™ Filter Unit, яка об'єднує блок вакуумної фільтрації Steritor з колбою-приймачем для обробки і зберігання об'ємів від 150 мл до 1000 мл. Даний пристрій підійде для стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту об'ємом 520 мл.

Даний метод стерилізації застосовується до речовин, які не витримують термічної обробки (розчини білків, вуглеводів, вітамінів, антибіотиків, вуглеводні, сироватки). Спосіб полягає в пропусканні рідин і газів через

спеціальні дрібнопористі фільтри, діаметр пор яких менше розмірів найдрібніших клітин або вірусів. Фільтри затримують мікроорганізми завдяки поровій структурі їх матриксу. Для пропускання розчину через фільтр потрібен вакуум або тиск.

Існують два основних типи фільтрів – глибинні та мембранні. Глибинні складаються з волокнистих або гранульованих матеріалів, які спресовані або пов'язані в лабіринт проточних каналів. Частинки затримуються в них в результаті адсорбції і механічного захоплення в матриці фільтра. Мембранні фільтри мають неперериваючу структуру, і захоплення ними частинок визначається розміром пор. Фільтри виготовляють з різних природних (каолін, азбест, целюлоза) або синтетичних (похідні целюлози) матеріалів. Розрізняють фільтри: мембранні, одержувані на основі нітроцелюлози; азбестові, або фільтри Зейтца, одержувані на основі суміші азбесту і целюлози; порцелянові, або свічки Шамберлана, одержувані з суміші кварцового піску і каоліну, сплавлених між собою; скляні, одержувані зі скла «Пірекс»[33].

У приготуванні поживних середовищ широко використовуються мембранні фільтри з порами 0,22 мкм. Для видалення бактерій зазвичай застосовують фільтри з порами 0,22 мкм під тиском не менше 30 фунтів / кв. Дюйм, тоді як для затримки вірусів і мікоплазм рекомендуються мембранні фільтри з порами в 0,01 - 0,1 мкм. Перед початком стерилізації фільтр слід попередньо змочити стерильною водою для того, щоб мінімізувати втрати за рахунок прилипання частинок до фільтру. Фільтраційні установки багаторазового застосування стерилізуються збірно або окремими вузлами, в автоклаві при 121°C на 15 хвилин. При необхідності асептичну збірку можна проводити в ламінарним шафі після обробки в автоклаві. Для оцінки ефективності процесу стерилізації використовують фізичні (по температурі і тиску пари), хімічні (по температурі плавлення або зміни кольору), мікробіологічні (з висівом на стандартні середовища), біоіндикаторні (з використанням *Bacillus stearothermophilus*) методи [34].

Фірма Millipore® - виробляє великий асортимент стерилізуючих фільтрів для будь-яких цілей від підготовки культуральних середовищ до стерилізації лікарських препаратів. Діапазон стерилізуючих приладів від 1 мл до 20 л, які працюють від тиском або вакуумом.

Пристрій Steripak™ для фільтрації під тиском, діаметр пор 0,22 мкм, тип мембрани Millipore Express® (поліестер), максимальним об'єм для фільтрації 10 та 20 л – підійде для стерилізації ПС для вирощування інокуляту у колбах та виробничого біосинтезу[35].



Рис.4.1. Система Stericup™ Filter Unit

Такий спосіб фільтрації у даному випадку надає наступні переваги, а саме: унеможливлення утворення осадів фосфатів та сульфатів, відповідно не потрібно створювати додаткові композиції для розділення солей, які взаємодіють між собою та готувати хлоридну кислоту для зниження рН, у випадку сумісної стерилізації солей.

- Для виробничого ферментера об'єм середовища становить 5,2 л.

Композиція А: гідролізат казеїну, лактат натрію, цистеїн гідрохлорид, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (стерилізація фільтрацією).

Композиція Б: мальтоза (стерилізація в автоклаві протягом 30 хв за температури 112 °С і при значенні тиску 0,05 МПа).

Стерилізація композиції А буде здійснюватися за допомогою пристрою Steripak™ для фільтрації під тиском, діаметр пор 0,22 мкм, тип мембрани Millipore Express® (поліефірсульфону), виробляється у 2 варіантах в залежності від об'єма на 10 та 20 л – підійде для стерилізації ПС для виробничого біосинтезу



Рис.4.2. Пристрій для холодної стерилізації Steripak™

Автоклави залежно від сфери застосування та призначення розрізняються за конструкцією, обладнанням, ємністю апарату, створенням температурного режиму. Виробляються найрізноманітніші моделі автоклавів для різних галузей промисловості, проте за основними принципами функціонування вони мало чим відрізняються один від одного.

Стерилізацію розчину мальтози будуть проводити у лабораторному автоклаві [Tuttnauer](#) 2540ML об'ємом 23 л з горизонтальним завантаженням.

У наведеному автоклаві розширені та покращені параметри для рідких завантажень, а саме: гнучкий датчик температури, який міститься в еталонному посуді, гарантуючи, що задана температура стерилізації дійсно досягається, коли починається стерилізація. Стерилізація запускається лише тоді, коли датчик навантаження досягає заданої необхідної температури. Таким чином можна уникнути тривалого контакту поживного середовища і високих температур і як можливу причину погіршення якості ПС.

Після завершення стерилізації дверці автоклава не можна відкрити відразу, а тільки після того, як рідина добре охолоне. Такий метод охолодження запобігає різкому падінню тиску в камері, яке може спричинити википання рідини.

Скорочений час циклу за рахунок швидкого охолодження. Швидке охолодження зазвичай скорочує час охолодження на 75%. Після завершення стерилізації стиснене повітря проходить через мікробіологічний фільтр у камеру автоклава. Таким чином запобігає падінню тиску. Підвищення тиску запобігає деформації завантаженого матеріалу, тріщин або розливу. Завдяки додатковому радіальному вентилятору, який циркулює гаряче повітря всередині камери, передаючи тепло охолоджуваним стінкам камери або охолоджувальним змішувачам загальна температура камери та завантаженого матеріалу швидко знижується.

У цього автоклава покращена сушка у вакуумі. Фаза сушіння після вакуумування, в кінці циклу стерилізації, забезпечує покращене сушіння пористих матеріалів та порожніх інструментів, таких як наконечники піпеток. Низький тиск у камері автоклава, викликаний вакуумом, знижує температуру кипіння, що призводить до швидкого випаровування вологи. Гаряча пара всмоктується з камери автоклава за допомогою вакууму і матеріали висихають.

Після етапу вакуумування камеру вводиться сухе повітря через повітряний фільтр[36].

Підготовка піногасника

Для контролю піноутворення протягом усього періоду ферментації буде використовуватися силіконовий піногасник (5% розчин Silicolapse®).

Переваги силіконових засобів контролю піноутворення порівняно з іншими органічними піногасниками:

- дуже низьке дозування для високої ефективності та стійкості;
- підвищене піногасіння за рахунок нижчого поверхневого натягу;
- краща стійкість до нагрівання та хімічних речовин;

- хімічно інертний, не реагує з іншими речовинами;
- безпечний для людини та екології;
- відмінні характеристики деаерації;
- підвищення продуктивності та якості процесу[37].

Отже, технологічна схема, окрім стадій підготовки поживного середовища, включає такі додаткові стадії:

- приготування розчину ростового фактору Мюллера для використання на двох стадіях підготовки посівного матеріалу;
- приготування концентрованого розчину $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$;
- приготування 7% розчину хлоридної кислоти для підтримання значення рН на оптимальному для біосинтезу рівні.

РОЗДІЛ 5 СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу дифтерійного токсину

Таблиця 5.1

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика(виробник)
1	2	3	4
ПЗ-1	Повітрязбірний пристрій	1	Повітрязбірник А1И 020.000-01 Фірма: «НПЦ Вектор-Кондвент». Прилад обладнаний металевою сіткою для видалення механічних забруднень.Робочий тиск: до 0,6 МПа (6 кгс/см ²) та до 1,2 МПа (12 кгс/см ²) .Габарити(В*Ш*Д),мм: 219*560*460 [1]
Ф-2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтр МАІСО. 507х166х50. Утримання великих частинок пилу, піску, бруду та інших подібних домішок розміром від 10 мкм. Клас G4 Утримує до 90% пилу Матеріал: пінополіуретан [2]
К-3	Компресор	1	Компресор Inversys 5 Plus з прямим приводом. Продуктивність: 0.91 м ³ /хв. Максимальний робочий тиск 0,75 МПа. Виробник: «Dalgakiran» (Туреччина) Габарити(В*Ш*Д),мм: 950*650*1100 [3]

	Т 4		Теплообмінник		1	Охолоджувач повітря СВК 050-2,5			
Зм	Арк.	№ документа	Підпис	Дата		(Systemair). Максимальний робочий тиск	Літера	Аркцил	Аркцилв
Розробник	Смаголь		ОХЛОДЖУВАН			1,6 МПа (16 бар), вихідна температура		65	86
Керівник	Пенчук								
Н. контр									
Консульт									
Заб. каф.	Стадніков								

РОЗДІЛ 5

Кафедра БТМ

65

			повітря 17-18 ⁰ С.Виробник: «Systemair». Габарити(В*Ш*Д):405*486*356 [4]
P-5	Ресивер	1	Ресивер серії РВ 230/10 фірми «В-compressor» (Росія), об'єм 230 л, робочий тиск до 1,6 МПа, продуктивність 1200 л/хв.Габарити(В*Ш*Д).мм: 2000*800*800 [5]
T-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Повітрянагрівач водяний VBC 315-2 (Systemair). Вихідна температура 35-40 ⁰ С.Максимальний робочий тиск 1,6 МПа (16 бар), робоча температура 150 ⁰ С. Виробник: «Systemair» (Швеція).Габарити(В*Ш*Д).мм: 403*460*315 [4].
Ф-7	Головний фільтр очистки повітря	1	Панельний осередковий фільтр класу F9. Фільтруючий матеріал мікроскловолокно. Максимальна робоча температура: 80 ⁰ С.Продуктивність: 3400 м ³ /год Ступінь очищення становить 90- 99 % .Габарити(В*Ш),мм: 592*592[6]
	Індивідуальний фільтр очистки повітря		Фільтр UltraAlu 150 Видаляє до 99,9999 % забруднень Фільтроматеріал із скловолокна із сепараторами Hot-Melt (система minipleat) в алюмінієвому корпусі із захисними сітками по обидва боки.[7]
	Установка стерилізуючої фільтрації Stericup		Вакуумна фільтрація Матеріали пристрою – полістирол Метод стерилізації пристрою - гама-опромінення площа фільтрації – 40 см ² Об'єм процесу від 150 до 1000 мл

			Максимальна робоча температура – 45 °С [8]
	Автоклав		Автоклав Tuttnauer 2540ML Особливість конструкції – горизонтальний Робочий тиск – 3-6 атм Діапазое температур – 100-134 ⁰ С Місткість – 23л [9]
	Реактор-змішувач для приготування поживного середовища для виробничого біосинтезу		Реактор об'ємом 5 л. 50-500 об/хв (частотно-регульований привод). Оснщений сорочкою та перемішуючим пристроєм. Матеріал боросилікатне скло.
	Насос перистальтичний		Перистальтичний насос ETATRON D.S.1201. Продуктивність 12 л/год.
	Установка стерилізуючої фільтрації Steripak		Фільтрація під тиском Блоки фільтрів бувають двох розмірів: менший блок може фільтрувати до 10 л, а більший – до 20 л. Максимальна робоча температура – 45 °С Розмір пор 0,22 мкм, поліефірсульфонова мембрана, 4 шари, стерилізовані гамма-випромінюванням[12].
	Ферментер	1	Ферментер об'ємом 10 л,) Можливість вибору типу нагрівання - електрична або пором. датчики температури, рН, розчиненого кисню, рівня піни та культуральної рідини, необслуговуваний привод мішалки, барботер, стерильні фільтри та охолоджувач вихідного відпрацьованого газу., нержавіюча сталь 316L. Робочий тиск : (0,5) – 2 бар; (Ш × В × Г): 1900 × 1020 × 750 мм

--	--	--	--

1. <http://condvent.ru/vozduhosborniki.html>
2. <https://shop.alterair.ua/ru/product/smennyy-filbtr-maico-g4-507x166x50/#scrollDescription>
3. <http://www.dalgakiran.com.ua>
4. <http://www.systemair-ukraine.com/pdf/accessories.pdf>
5. <https://b-compressor.ru/resiver-rv-230-10>
6. <https://ventfilter.kiev.ua/>
7. <http://ultramare.com/en/produkt/ultraalu-150-en/>
8. <https://www.medicalexpo.ru/prod/merck-millipore/product-70876-442512.html>
9. <https://www.laboratorii.com/oborudovanie-dlja-laboratorij/avtoklavy/avtoklav-2540ML/>
10. https://www.etatron.com.ua/pumps/peristaltic_pumps/b-per/
11. <https://vilitex.ru/products/khimicheskie-reaktory-fermentery-i-komplektuyushchie-dlya-nikh/standartnye-borosilikatnye-reaktory-5-100-litrov/>
12. https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/Steripak-GP-Pressure-Filter-Unit,MM_NF-SPGPM20RJ?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F&bd=1
13. Ферментер стерилизуемый BIOSTAT® Cplus. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://www.gluvelab.com/catalog/fermentery-bioreaktory/fermenter-sterilizuemyy-biostat-cplus/>

РОЗДІЛ 6

ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ ДИФТЕРІЙНОГО ТОКСИНУ

Технологічна схема одержання дифтерійного токсину за допомогою *C. diphtheriae* PW 8 включає: допоміжні роботи (підготовка повітря, приготування допоміжних розчинів, підготовка і стерилізація поживних середовищ та піногасника) та технологічний процес (підготовка посівного матеріалу та біосинтез дифтерійного токсину). Технологічну схему одержання дифтерійного токсину за допомогою *C. diphtheriae* PW 8 наведено у графічній частині курсової роботи.

ДР 3. Приготування та стерилізація поживних середовищ

ДР 3.1. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках

Для вирощування посівного матеріалу необхідно приготувати 520 мл поживного середовища (10% від об'єму середовища). Вміст компонентів для приготування 520 мл середовища наведено в *табл. 4.1*.

Таблиця 6.1

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 520 мл середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 520 мл середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, мл
гідролізат казеїну	40	20,8		
цистеїн	0,4	0,21		
лактат натрію	3,4	1,77		
K ₂ HPO ₄	0,73	0,38		
KH ₂ PO ₄	0,24	0,12		
			<i>НУХТ БТЕК 04.01.35</i>	<i>КР ПЗ</i>
<i>Зм</i>	<i>А</i>	<i>В</i>	<i>Г</i>	<i>Д</i>
<i>Розробник</i>	<i>Лмагаль</i>			<i>Літера</i>
<i>Керівник</i>	<i>Пенчук</i>			<i>Аркуш</i>
<i>Н. контр</i>				<i>Аркушів</i>
<i>Консульт</i>				
<i>Зав. каф.</i>	<i>Стадніков</i>			

РОЗДІЛ 6

Кафедра БТМ

вода	-	480		500
мальтоза	25	13	Б	20
вода	-	20		

ДР 3.1.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах у бюксах зважують 20,8 г гідролізату казеїну, 0,21 г цистеїну, 1,77 г лактату натрію, 0,38 г K_2HPO_4 , 0,12 г KH_2PO_4 , 1,42 г $CaCl_2 \cdot 2H_2O$. Наважки переносять у колбу місткістю 1 л, за допомогою піпеток додають 0,1 мл розчину $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (від ДР 2.2) та доводять мірним циліндром на 500 мл до мітки 500 мл водою питною, перемішують колбу закривають поліетиленовою пробкою. Стерилізують холодною фільтрацією з використанням фільтрів фірми «Міліпор» діаметром 0,22 мкм.

Приготований розчин подають до стадії ТП 5.3.

ДР 3.1.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах у бюксі зважують 13 г мальтози, наважку переносять у колбу місткістю 100 мл, додають за допомогою мірного циліндра на 50 мл воду питну до мітки, розчин перемішують, закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують у автоклаві протягом 15 хв за температури 121 °С і при значенні тиску 0,05 МПа.

Приготований розчин подають до стадії ТП 5.3.

ДР 3.2. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування культури у ферментері об'ємом 10 л

Для виробничого біосинтезу необхідно приготувати 5,2 л поживного середовища.

Враховуючи, що для засіву ферментера використовують рідкий посівний матеріал, об'єм якого становить 520 мл (10% від загального об'єму середовища). Для приготування поживного середовища використовуємо водопровідну воду, як додаткове джерело кальцію і мікроелементів. Вміст компонентів наведений в *табл. 4.2*.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 5,2 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Кількість для приготування 5,2 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, мл
гідролізат казеїну	40	208	А	4420
цистеїн	0,4	2,1		
лактат натрію	3,4	17,7		
K ₂ HPO ₄	0,73	3,8		
KH ₂ PO ₄	0,24	1,25		
CaCl ₂ ·2H ₂ O	2,7	14		
вода	-	4300		
мальтоза	25	130	Б	200
вода	-	200		

ДР 3.2.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах у бюксах зважують 208 г гідролізату казеїну, 2,1 г цистеїну, 17,7 г лактату натрію, 3,8 г K₂HPO₄, 1,25 г KH₂PO₄, 14 г CaCl₂·2H₂O. Наважки переносять у реактор-змішувач місткістю 5 л, за допомогою піпетки додають 1 мл розчину FeSO₄·7H₂O (від ДР 3.1.2.), по трубопроводу через витратомір подають 4300 мл води питної, перемішують. Розчин перекачують із збірника перистальтичним насосом на установку мембранної фільтрації Steripak за допомогою якої проводять стерилізацію (з використанням фільтрів фірми

«Міліпор» діаметром пор 0,22 мкм) потім розчин перекачують у попередньо простерилізований ферментер.

Приготований розчин подають до стадії ТП 6.1.

ДР 3.2.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах у бюксі зважують 130 г мальтози, наважку переносять у колбу місткістю 1л, додають 200 мл води питної, розчин перемішують, закривають ватне-марлевою пробкою та стерилізують у автоклаві при 121⁰С протягом 15 хвилин.

Приготований розчин подають до стадії ТП 6.1.

ТП 4. Підготовка посівного матеріалу

ТП 4.1. Підтримання колекційної культури

Колекційну культуру зберігають у ліофілізованому стані у флаконах при температурі 4-5⁰С. Всі роботи з колекційною культурою проводять строго в асептичних умовах.

ТП 4.2. Одержання робочої культури

Ліофілізовану культуру перетворюють у суспензію відразу після відкриття флаконів, для цього додають у кожен флакон по 0,5 мл стерильного рідкого середовища Лофлера. Суспензію у флаконах добре перемішують і переносять у пробірки з 5 мл рідкого середовища Лофлера. Після ретельного перемішування пробірок, відбирають 0,2 мл суспензії і наносять на скошене агаризоване середовище Лофлера, для отримання ізольованих колоній, інкубують при 35⁰С протягом 48 годин.

ТП 4.3. Вирощування культури в колбі

В асептичних умовах у колбу об'ємом 1 л з стерильною композицією А (від ДР 3.1.3) переливають простерилізовану композицію Б (від ДР 3.1.4), перемішують і розливають по 150 мл у качалочні колби об'ємом 750 мл.

В стерильних умовах вносять посівну культуру (від ТП 4.2.). Бактерії вирощують у колбі на качалці упродовж 24 годин при температурі 35 °С, 160 об/хв.

Періодично кожні 8 год відбирають пробу культуральної рідини для мікробіологічного контролю.

ТП.5. Виробничий біосинтез

ТП.5.1 Виробничий біосинтез у ферментері 10 л

У попередньо простерилізований в ферментер вносять 4,48 л композиції А, 200 мл композиції Б. В процесі культивування проводять контроль рН, його підтримують на рівні 7,2 шляхом додавання хлоридної кислоти (від ДР 2.1), рівень рН 7,2 контролюється на рН-метрі, після чого, в асептичних умовах, вносять підготовлений посівний матеріал (від ТП 5.3.), в обсязі 10% у ферментер. На стадії виробничого культивування проводиться контроль температури, яка має становити 35 °С. Тривалість культивування штаму *C. diphtheriae* становить 48 годин. Культивують з частотою обертів перемішуючого пристрою 600 об/хв і постійною аерацією 0,7 л /хв. Сигналом для припинення процесу культивування є швидке підвищення рН, що свідчить про споживання ростового субстрату мальтози, яка не перетворюється у глюкозу, а остання у органічні кислоти [38]

Для контролю піноутворення додають стерильний силіконовий піногасник (від ДР 2).

Періодично проводиться відбір проб для мікробіологічного контролю (кожні 8 год) та визначення концентрації дифтерійного токсину (30-48) год культивування).

Після культивування культуральна рідина подається за допомогою труби перетискування до збірника культуральної рідини.

РОЗДІЛ 7

КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА ДИФТЕРІЙНОГО ТОКСИНУ

7.1. Мікробіологічний контроль

Культивування бактерій *Corynebacterium diphtheriae* PW8 з метою одержання дифтерійного токсину проводиться в асептичних умовах тому необхідно проводити мікробіологічний контроль на усіх етапах, для того щоб впевнитись у відсутності контамінації.

Мікробіологічний контроль здійснюється двома шляхами: прямий висів на агаризовані поживні середовища і мікроскопіювання. Прямий висів здійснюється посівом культуральної рідини до ізольованих колоній на чашки Петрі з м'ясо–пептонним агаром (МПА) для виявлення бактерій, та глюкозо–картопляним агаром (ГКА) або сусло–агаром (СА) – грибів та дріжджів. Чашки з посівами завертають у папір та поміщають у термостат для інкубації при температурі 32-34 °С протягом 1-2 діб для МПА та при температурі 24-26 °С протягом 3-5 діб для СА [39].

За відсутності у зразку сторонньої мікробіоти під час мікроскопіювання можна побачити клітини *C.diphtheriae* PW 8. Бактерії тонкі, прямі, іноді злегка вигнуті, з заокругленими краями. Довжина коливається від 2 до 5 мкм, товщина від 0,3 до 0,6 мкм. Палички нерухливі, спор не утворюють, джгутиків та капсул не мають[39].



Рис. 7.1. Клітини *C.diphtheriae* PW 8 під світловим мікроскопом (1000 ×)[39]

					НУХТ БТЕК 04.01.35 КР ПЗ		
Зм	Арк.	№ документа	Підпис	Дата			
Розробник		Лмаголь			Літера	Аркуш	Аркушів
Керівник		Пенчук				74	86
Н. контр					Кафедра БТМ		
Консульт							
Зав. каф.		Лтадніков					

РОЗДІЛ 7

74

7.2. Показники росту і синтезу цільового продукту

7.2.1. Концентрація біомаси

Біомасу визначають за оптичною густиною клітинної суспензії з наступним перерахунком на суху біомасу за допомогою калібрувального графіка (непрямий метод).

Беруть зразок культуральної рідини об'ємом 5мл, потім його центрифугують при 5000 обертах протягом 15 хвилин. У результаті центрифугування утворюється осад, який містить бактеріальні клітини, а супернатант – поживне середовище. Супернатант видаляють, а в пробірку з осадом додають 5 мл фізіологічного розчину. Розчин додатково розбавляють в десять разів, взявши 0,4 мл змішаного зразка фізіологічного розчину разом з 3,6 мл нормального фізіологічного розчину. Спектрофотометр стандартизують додаванням фізіологічного розчину. Потім зразки переносять в кювету спектрофотометра і вимірюють оптичну густина при 540 нм[40].

7.2.2. Визначення кількості синтезованого цільового продукту

Кількісне визначення концентрації токсину чи анатоксину здійснюється за допомогою методу Рамона.

Принцип методу. Імунологічно зв'язуючий аналіз, який проходить у розчині і полягає у виявленні комплексу сформованому між антигеном і антитілом. Цей аналіз, відомий як аналіз Рамона, заснований на спостереженні неозброєним оком за макроскопічними флокуляційним комплексом. Час, необхідний для утворення цього комплексу, залежить від співвідношення анатоксину та специфічного антитоксину. Час в хвилинах, за якого відбудеться перша флокуляція позначається Kf. Kf залежить як від концентрації антигену, так і від концентрації антитоксина, і передбачається, що якість антигену також впливає на Kf. При низьких концентраціях або при використанні антигену низької якості значення Kf високе. Перша пробірка, в якій з'являється флокуляція, використовується для визначення значення Lf зразка. «Межа флокуляції»(Limit

of Flocculation) визначається як вміст антигену, що становить співвідношення 1:1 по відношенню до 1 одиниці антитоксина[41].

Опис проведення. Пробу культуральної рідини об'ємом 10 мл центрифугуюють при 13000 обертах протягом 10 хв, з отриманим після центрифугування зразком супернатанту проводять визначення[42].

У пробірки у яких міститься однакова кількість супернатанту (супернатант містить токсин) 1 мл додають у збільшуваних концентраціях антитоксин (див. табл.1), вміст кожної пробірки доводять до рівного об'єму 0,1 М розчином NaCl. Кожну пробірку перемішують за допомогою струшування, потім інкубують на водяній бані при температурі між +30 - +50 °С. Пробірки перевіряють через певні регулярні проміжки часу для виявлення флокуляції. Відмічають перші три пробірки у яких відбулася флокуляція.

Потім розраховується значення Lf (межа флокуляції) досліджуваного дифтерійного токсину з концентрації дифтерійного антитоксину, присутнього у ініційній пробірці (пробірка у якій відбулася перша флокуляція)

Таблиця 7.1

Приготування пробірок, що містять збільшені кількості антитоксина з фіксованою кількістю тестового зразка дифтерійного токсину

Реагент	Пробірки							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Токсин (мл)	1	1	1	1	1	1	1	1
Антитоксин (Lfeq.)	30	40	50	60	70	80	90	100
Антитоксин (мл)	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1
NaCl (мл)	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	0

В таблиці 7.1 наведений приклад розрахунку концентрації токсину у зразку. У наведеному прикладі у пробірці номер 3 відбулася першою флокуляція, значення Лф досліджуваної розбавленої проби становить 50 Лф/мл. Для того, щоб отримати значення Лф тестованого нерозбавленого продукту необхідно враховувати фактор розбавлення. У цьому прикладі, якщо анатоксин був розбавлений на 1/10 перед реакцією, його кінцеве значення Лф становить 500 Лф/мл.

Перша пробірка з флокуляцією - це та, яка містить кількість антитоксину, найбільш близьку за еквівалентом кількості антигену в зразку. Вміст антитоксина в цій пробірці можна використовувати для розрахунку Lf зразка. Якщо у двох пробірках одночасно відбулася флокуляція, середнє значення результатів отримане для двох пробірок дається як результат[41].

7.2.3. Визначення концентрація джерела вуглецю і азоту

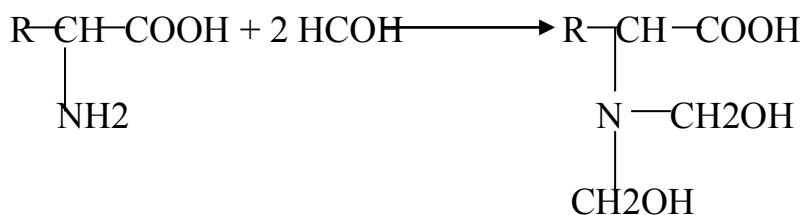
Джерелом азоту в середовищі для культивування *Corynebacterium diphtheriae* PW8 є гідролізат казеїну, а карбону – мальтоза. Вміст амінного азоту визначають методом Соренсена (формольне титрування)[43].

Пробопідготовка: пробірки з культуральною рідиною загальним об'ємом 10 мл центрифугують на протязі 10 хв., при 13000 обертах для відділення біомаси. Визначення проводять з отриманим супернатантом.

Принцип методу: аміним називають азот вільних аміногруп амінокислот і пептидів. Амінокислоти в молекулі білка з'єднані між собою за допомогою пептидних зв'язків. Ці зв'язки можна розщепити при високій температурі за допомогою ферментів або під дією концентрованих кислот або лугів. При цьому відбувається гідроліз білка, тобто розщеплення його на амінокислоти. Гідроліз супроводжується збільшенням рівної кількості вільних аміно- і карбоксильних груп. Оскільки амінокислоти, що мають карбоксильну групу і аміногрупу, виявляють у водних розчинах амфотерні властивості, то титрувати

безпосередньо аміно- або карбоксильні групи не можна. Але це можна зробити, якщо заблокувати одну з цих груп.

Визначення амінного азоту формольним титруванням ґрунтується на блокуванні NH₂-груп формальдегідом:



дигідроксиметилпохідне амінокислоти

Утворювані дигідроксиметилпохідні амінокислот володіють кислими властивостями і можуть бути нейтралізовані лугом. За кількістю витраченої луґу обчислюють кількість амінного азоту, беручи до уваги, що 1 см³ 0,1 М розчину

NaOH відповідає 2,8 мг азоту[44].

Методика проведення: До точного об'єму випробуваного зразка додають воду до об'єму 20 мл. При необхідності розчин нейтралізують потенціометрично до рН 7,0, шляхом додавання 0,1М розчину натрію гідроксиду або хлористоводневої кислоти розчину 0,1 М. Після закінчення нейтралізації додають від 2 до 10 мл 35% розчину формальдегіду, нейтралізованого в день аналізу натрію гідроксиду розчином 10% до рН 7,0, перемішують і титрують 0,1 М розчином натрію гідроксиду до значення рН 9,1, що не змінюється при перемішуванні протягом 2 хв, або до появи слабо-рожевого забарвлення (індикатор - 1% розчин фенолфталеїну) [45].

Визначення мальтози

Визначення мальтози у культуральній рідині можна провести за допомогою біосенсора.

У літературному джерелі [46] вимірювання мальтози у культуральній рідині проводили за допомогою амперометричного біосенсора.

Проте амперометричного біосенсори мають деякі недоліки, порівняно з датчиками кондуктометричного типу:

- вимірювання з використанням високого потенціалу, який призводить до помилок через наявність інших компонентів електроокиснення, наприклад аскорбінова кислота
- потрібен технічно складний та дорогий електроди порівняння.
- робота з високою напругою, що спричиняє фарадеївські процеси на електродах
- крім того, амперометричні біосенсори дорожчі, ніж кондуктометричні.

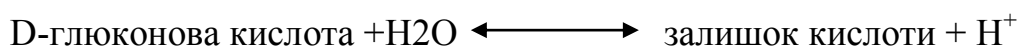
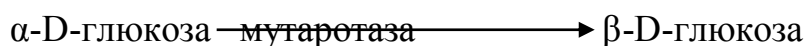
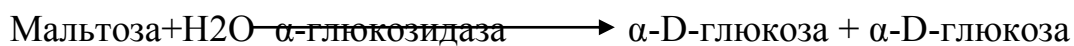
Тому у даній роботі для визначення мальтози буде використовуватися кондуктометричний біосенсор.

Пробопідготовка: відділення біомаси проводять центрифугуванням при 10 хв, 3500 об/хв[47].

Принцип методу.

В основі кондуктометричного методу лежить реєстрація зміни провідності аналізованого розчину. Ця зміна провідності може залежати від самої ферментативної реакції, від характеристик розчину, де відбувається ця реакція.

Каскад ферментативних реакцій лежить в основі кондуктометричної біосенсорної системи визначення мальтозу:



α -глюкозидаза, мутаротаза та глюकोкодоксидаза поступово розщеплюють мальтозу на пероксид водню та D-глюконолактону. Останній, у свою чергу,

спонтанно гідролізується до глюконової кислоти, яка дисоціює на кислотний залишок та протон, при цьому змінюється провідність розчину, яку й можна реєструвати за допомогою кондуктометричного перетворювача.

Матеріали та методи.

Ліофілізовані препарати глюкозооксидази з *Penicillium vitale* з активністю 130 Од/мг, мутаротаза з активністю 100 Од/мг, α -глюкозидаза з *Bacillus stearothermophilus* з активністю 109 Од/мг, бичачий сироватковий альбумін (БСА) (фракція V) та 50% водний розчин глутарового альдегіду. Як субстрат використовують мальтозу, як буферний розчин – калій-фосфатний розчин ($\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$). Інші неорганічні сполуки мають ступінь чистоти «х.ч.» і «ч.д.а».

Використовуються кондуктометричні перетворювачі. Вони складаються з двох однакових пар золотих зустрічно-штирьових електродів, отриманих вакуумним напиленням золота на керамізовану пластину 5x40 мм. Чутлива поверхня кожної пари становила близько 1,0 мм x 1,5 мм, відстань між сусідніми точками, як і ширина цифр 20 мм.

Методика вимірювання.

Вимірювання здійснюють у калій-фосфатному буферному розчині різної молярності та різного значення рН за кімнатної температури у відкритій комірці з інтенсивним перемішуванням. Спочатку сенсор розміщували у комірці для вимірювання об'ємом 2 мл, заповнений фосфатним буферним розчином. Для отримання стабільного початкового сигналу (базової лінії) сенсор протягом деякого часу вимочували у буферному розчині. Щоб одержати сигнал на субстрат необхідної концентрації, у комірку додають певну аліквоту стандартного концентрованого розчину зразка.

Неспецифічні зміни вихідного сигналу, пов'язані з коливаннями температури, рН середовища та напруги, компенсувалися використанням диференціального

режиму, тобто вимірювання різниці між сигналами від двох пар електродів з активною і неактивною мембранами, розміщені на одному перетворювачі[46].

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Дифтерія. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://phc.org.ua/kontrol-zakhvoryuvan/inshi-infekciynzakhvoryuvannya/difteriya>
2. Parveen, S., Bishai, W. R., & Murphy, J. R. (2019). Corynebacterium diphtheriae: Diphtheria Toxin, the tox Operon, and Its Regulation by Fe²⁺ Activation of apoDtxR. *Gram-Positive Pathogens*, 1154–1164. doi:10.1128/9781683670131.ch69
3. АКДП-БІОЛІК. [Електронний ресурс]. Режим доступу: [http://likicontrol.com.ua/%D1%96%D0%BD%D1%81%D1%82%D1%80%D1%83%D0%BA%D1%86%D1%96%D1%8F/\[27037](http://likicontrol.com.ua/%D1%96%D0%BD%D1%81%D1%82%D1%80%D1%83%D0%BA%D1%86%D1%96%D1%8F/[27037)
4. Медична мікробіологія, вірусологія та імунологія: підручник для студ. вищ. мед. навч. заклад/ За редакцією В.П. Широкобокова / Видання 2-е: Вінниця. Нова Книга, 2011 – 952с.
5. Мазурова И.К., Столярова Л.Г., Комбарова С.Ю., Сафонова Т.Б., Тараненко Л.А., Мельников В.Г. Дифтерия (биологические свойства, выделение и идентификация возбудителя дифтерийной инфекции): учебное пособие/ И.К.Мазурова, Л.Г.Столярова, С.Ю.Комбарова, Т.Б.Сафонова, Л.А.Тараненко, В.Г. Мельников; ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования». – М.: ГБОУ ДПО РМАПО, 2015. - 77 с. ISBN 978-5-7249-2423-8
6. Diphtheria toxin: The nuts and bolts. [Електронний ресурс].Режим доступу: <https://thenativeantigencompany.com/diphtheria-toxin-the-nuts-and-bolts/>
7. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология: Учебник для студентов медицинских вузов / Под. ред. А. А. Воробьева. — 2-е изд., испр. и доп.— М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2012. — 704 с.
8. Tchurbanov, A. I., Dimitrov, J. D., & Vassilev, T. L. (2004). Optimization of casein- based semisynthetic medium for growing of toxigenic Corinebacterium diphtheriae in a fermenter. *Canadian Journal of Microbiology*, 50(10), 821–826. doi:10.1139/w04-061
9. Subhash C.P. Textbook of microbiology and immunology. Elsevier Publishing. 2009. 669 p.

10. Мазурова И.К., Столярова Л.Г., Комбарова С.Ю., Сафонова Т.Б., Тараненко Л.А., Мельников В.Г. Дифтерия (биологические свойства, выделение и идентификация возбудителя дифтерийной инфекции): учебное пособие/ И.К.Мазурова, Л.Г.Столярова, С.Ю.Комбарова,Т.Б.Сафонова, Л.А Тараненко, В.Г. Мельников; ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования». – М.: ГБОУ ДПО РМАПО, 2015. - 77 с. ISBN 978-5-7249-2423-8
11. Husada, D., Soegianto, S. D. P., Kurniawati, I. S., Hendrata, A. P., Irawan, E., Kartina, L. Ismoedijanto. (2019). First-line antibiotic susceptibility pattern of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* in Indonesia. BMC Infectious Diseases, 19(1). doi:10.1186/s12879-019-4675-y
12. Пирог, Т.П. Загальна мікробіологія: підручник, 2-е вид., доп. і перероб. / Т.П. Пирог. – К. :НУХТ, 2010. – 632 с.
13. Вакцинація. [Електронний ресурс]. Доступ: <https://moz.gov.ua/article/immunization/kalendar-profilaktichnih-sheplen>
14. АКДП-Біолік. [Електронний ресурс]. Доступ: <https://likicontrol.com.ua/%d1%96%d0%bd%d1%81%d1%82%d1%80%d1%83%d0%ba%d1%86%d1%96%d1%8f/?%5b27037%5d>
15. Вікова структура населення (1989-2021). [Електронний ресурс]. Доступ: <http://www.lv.ukrstat.gov.ua/dem/piramid/all.php>
16. Державний реєстр лікарських засобів України. [Електронний ресурс]. Доступ: <http://www.drlz.com.ua/ibp/ddsite.nsf/all/shlist?opendocument&sklad=%E4%E8%F4%F2%E5%F0%B3%E9%ED%E8%E9%20%E0%ED%E0%F2%EE%EA%F1%E8%ED>
17. Вакцинація. [Електронний ресурс]. Доступ: <https://moz.gov.ua/article/immunization/chomu-v-aptekah-i-privatnih-klinikah-mozhe-ne-but-i-vakcin-ta-de-zrobiti-sheplennja-bezoplatno>
18. Вакцина АКДП — ацелюлярна або цілюклітинна? [Електронний ресурс]. Доступ: <https://www.apteka.ua/article/474528>
19. Guilhen, F. B., Trezena, A. G., Prado, S. M. A., Higashi, H. G., & Sonobe, M. H. (2014). Characterization of production processes for tetanus and diphtheria anatoxins. *Biologicals*, 42(2), 91–100. doi:10.1016/j.biologicals.2013.11.010
20. Chung, Y.-J., Lee, J.-A., Jung, M.-Y., Lee, S.-M., Kim, T.-Y., Choe, Y.-K., & Kim, I.-H. (2016). Optimization of diphtheria toxin production by *Corynebacterium*

- diphtheriae using a casein-based medium in a fermenter. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 21(4), 537–543. doi:10.1007/s12257-016-0360-9
21. Перемешивающие устройства для лабораторий и производства. [Электронный ресурс]. Доступ: <https://cosmetic-industry.com/peremeshivayushhie-ustrojstva-dlya-laboratorij-i-proizvodstva.html>
 22. Гельфман М.И., Ковалевич О.В., Юстратов В.П. Коллоидная химия. – СПб.: Издательство «Лань», 2003. – 336 с.
 23. Ферментер стерилизуемый BIOSTAT® Cplus. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://www.gluvelab.com/catalog/fermentery-bioreaktory/fermenter-sterilizuemyy-biostat-cplus/>
 24. Поводзинський В.М. Конспект лекцій для студентів спеціальності 6.092.900 та 7.092.901 "Основи проектування біотехнологічних виробництв" напряму 0929 "Біотехнологія" денної форми та заочної форми навчання. К.: НУХТ, 2006 -210 с.
 25. Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing — Current Good Manufacturing Practice. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/sterile-drug-products-produced-aseptic-processing-current-good-manufacturing-practice>
 26. Sandle T. (2012). ‘Application of Disinfectants and Detergents in the Pharmaceutical Sector’. In Sandle, T. (2012). *The CDC Handbook: A Guide to Cleaning and Disinfecting Cleanrooms*, Grosvenor House Publishing: Surrey, UK, pp168-197
 27. Sanitization of Pharmaceutical Facilities. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://www.ivtnetwork.com/article/sanitization-pharmaceutical-facilities>
 28. Tim Sandle. Selecting of Cleanroom Disinfectants. *La Vague* #42, Juin 2014.
 29. АНІОСЕПТ АКТИВ УА. ІНСТРУКЦІЯ. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://dezmed.com.ua/instruktsiia/item/aniosept-aktiv-ua-instruktsiya/>
 30. Аниозим ДД1 УА. [Электронный ресурс] Режим доступа: https://dezplus.com.ua/catalogue/disinfection/pre-sterilized-cleansing/pre-sterilized-cleansing_47.html
 31. Пероксін плюс. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://lavernamarket.com.ua/ua/p52159085-peroksin-plyus-dezinfektsiya.html>
 32. Фамідез® Дезодерм. [Электронный ресурс] Режим доступа:

<https://famidez.ua/index.php/produksiya/dezinfektsiya/shkira-ruk-i-tila/dezoderm>

33. Лысак В. В. Микробиология. Практикум : пособие / В. В. Лысак, Р. А. Желдакова, О. В. Фомина. – Минск : БГУ, 2015. – 115 с.
34. Merck Microbiology Manual 12th Edition 685
35. Sterile Filtration. [Электронный ресурс] Доступ: <https://www.merckmillipore.com/INTL/en/ps-learning-centers/sterile-filtration-learning-center/HSGb.qB.xwkAAAFaKzsQWRzh.nav>
36. Автоклав 2540 ML. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://www.laboratorii.com/oborudovanie-dlja-laboratorii/avtoklavy/avtoklav-2540ML/>
37. Silicone antifoams and defoamers. [Электронный ресурс] Режим доступа: https://content.elkem.com/Brochure-art-of-foam-control?utm_source=inbound%20marketing&utm_medium=website&utm_campaign=WEBSITE%20-%20Content%20Marketing
38. M. Ghoshal, D. Rakshit, N. Gupt. Evaluating the replacement of papain meat digest by nz amine in pope and lingwood medium for diphtheria toxin. Vol 4, Issue 09, 2015.
39. Красінько В.О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобув. Освіт. Ступ. «бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» освіт.-проф. 44 програми «Біотехнологія» ден. і заоч. форм навч. / В.О. Красінько. – К.: НУХТ, 2019. – 252 с
39. Sethuvel D., Subramanian N., Pragasam A. et al. Insights to the diphtheria toxin encoding prophages among clinical isolates of Corynebacterium diphtheriae from India. India journal of medical microbiology 2019, 37(3), 423-425; doi: 10.4103/ijmm. IJMM 19469
40. Mrinalini Ghoshal, Dr.Partha Rakshit, Dr. Naveen Gupt. Evaluating the replacement of papain meat digest by nz amine in pope and lingwood medium for diphtheria toxin. Vol 4, Issue 09, 2015.
41. World Health Organization. Manual for Quality Control of Diphtheria, Tetanus and Pertussis Vaccines. 2013; 73-75.
42. Suwanpatcharakul, M., Pakdeecharoen, C., Visuttitewin, S., Pesirikan, N., Chauvatcharin, S., & Pongtharangkul, T. (2016). Process optimization for an

industrial-scale production of Diphtheria toxin by *Corynebacterium diphtheriae* PW8.

Biologicals, 44(6), 534–539. doi:10.1016/j.biologicals.2016.08.002

43. Preethi S., Sndaran B., Sekar B. Diphtheria toxin production in pilot scale using casein based media. *Int J Pharma Bio Sci* 2018 Oct; 9(4): (B) 228-237

44. Шлейкин А.Г., Скворцова Н.Н., Бландов А.Н. Биохимия. Лабораторный практикум. Часть 2. Белки. Ферменты. Витамины: Учеб. пособие. – СПб.: Университет ИТМО, 2015. – 106 с.

45. Определение аминного азота методами формольного и йодометрического титрования. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-2-3-0022-15-opredelenie-aminnogo-azota-metodami-formolnogo-i-jodometricheskogo-titrovaniya/>

46. Váradí, M., Adányi, N., Nagy, G., & Rezessy-Szabó, J. (1993). Studying the bienzyme reaction with amperometric detection for measuring maltose.. *Biosensors and Bioelectronics*, 8(6), 339–345. doi:10.1016/0956-5663(93)85015-g

47. Pyeshkova, V. M., Saiapina, O. Y., Soldatkin, O. O., & Dzyadevych, S. V. (2009). Enzyme conductometric biosensor for maltose determination. *Biopolymers and cell*, 25(4), 272-278.