

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

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

«До захисту в ЕК»

Декан факультету

Наталія ГРЕГІРЧАК

(підпис)

(ім'я та прізвище)

«\_\_» червня 2024 р.

«До захисту допущено»

Завідувач кафедри

Віктор СТАБНІКОВ

(підпис)

(ім'я та прізвище)

«\_\_» червня 2024 р.

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 одержання вакцини  
проти дифтерійної.

Виконав: здобувач IV курсу, групи 2

ТИМОФЄЄВ Даніла Геннадійович

(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)

Рецензент

(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) недозволеної допомоги під час підготовки цієї роботи. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

Здобувач \_\_\_\_\_

(підпис)

Київ – 2024 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 СТАБНИКОВ

“ 01 ” березня 2024 року

## З А В Д А Н Н Я

### НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

ТИМОФЄЄВ Даніла Геннадійович

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Культивування *Corynebacterium diphtheriae* для одержання вакцини протидифтерійної.

керівник роботи ПЕНЧУК Юрій Миколайович, гандидат технічних наук

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

затвержені наказом закладу вищої освіти від 29 березня 2024 року № 238-кс

2. Строк подання здобувачем роботи 28 травня 2024 р.

3. Вихідні дані до роботи *Corynebacterium diphtheriae*, цільовий продукт: Дифтерійний анатоксин, об'єм ферментера 50 л, коефіцієнт заповнення 0.5.

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

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема виробництва – 1 аркуш формату А1, Апаратурна схема виробництва – 1 аркуш формату А1

## 6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 01.03.2024 р.

## КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Характеристика цільового продукту	01.03.24 - 04.03.24	Виконано
2	Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	05.03.24 - 13.03.24	Виконано
3	Техніко-економічне обґрунтування	14.03.24 - 20.03.24	Виконано
4	Біосинтез цільового продукту	21.03.24 - 24.03.24	Виконано
5	Обґрунтування вибору технологічної схеми	25.03.24 - 30.03.24	Виконано
6	Специфікація обладнання	31.03.24 - 06.04.24	Виконано
7	Опис технологічної схеми	07.04.24 - 13.04.24	Виконано
8	Контроль виробництва	14.04.24 - 24.04.24	Виконано
9	Охорона довкілля	25.04.24 - 09.05.24	Виконано
10	Оформлення пояснювальної записки	10.05.24 - 19.05.24	Виконано
11	Виконання графічної частини роботи	20.05.24 - 28.05.24	Виконано

**Здобувач**

\_\_\_\_\_ (підпис)

**Керівник роботи**

\_\_\_\_\_ (підпис)

**Даніла ТИМОФЄЄВ**

\_\_\_\_\_ (ім'я та прізвище)

**Юрій ПЕНЧУК**

\_\_\_\_\_ (ім'я та прізвище)

## ЗМІСТ

РЕФЕРАТ .....	6
ВСТУП .....	8
РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту .....	9
РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента .....	11
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування .....	11
2.2. Розрахунок складу поживного середовища .....	17
2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки <i>C. diphtheriae</i> ..	19
2.4. Таксономічний статус <i>C. diphtheriae</i> .....	20
РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування .....	22
3.1. Потреба у цільовому продукті .....	22
3.2. Розрахунок потужності виробництва .....	24
3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів .....	25
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу .....	26
РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту .....	28
4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента .....	28
4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт .....	29
РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми .....	33
5.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера .....	33
5.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря .....	34
5.3. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища .....	36
5.3.1 Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках .....	37
5.3.2. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу.....	39
5.4. Обґрунтування вибору піногасника .....	41
5.5. Обґрунтування вибору речовин для регуляції рН .....	42
5.6. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів .....	43
РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання .....	54

РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми .....	56
РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва .....	62
8.1. Карта постадійного контролю .....	62
8.2. Мікробіологічний контроль .....	68
8.3. Показники росту і синтезу цільового продукту .....	69
8.3.1. Визначення концентрації дифтерійного токсину.....	69
8.3.2. Визначення концентрації джерела вуглецевого живлення .....	70
8.3.3. Визначення концентрації джерела азотного живлення .....	71
8.4. Показники якості готового продукту .....	72
РОЗДІЛ 9 Охорона довкілля .....	74
9.1. Аналіз технологічної схеми виробництва цільового продукту на місця емісії твердих, рідких та газоподібних відходів .....	74
9.2. Система знешкодження та утилізації рідких відходів .....	75
9.3. Система знешкодження газоповітряних відходів .....	79
9.4. Система знешкодження твердих відходів .....	79
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ .....	81

## РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена розробленню технологічної та апаратурної схем біосинтезу Дифтерійного токсину *Corynebacterium diphtheriae* PW8, який під час культивування синтезує 16.73 г/л даного екзотоксину. Дифтерійний токсин після інактивації використовується як компонент комплексної вакцини від дифтерії, кашлюку та правцю. Відповідно до даних Державної служби статистики України щодо захворювань населення розрахована потужність виробництва становить 3.69 л анатоксину за рік (309 л культуральної рідини).

Технологія виробництва дифтерійного анатоксину включає допоміжні роботи (підготовка стерильного аераційного повітря, приготування 6%-ного розчину соляної кислоти з метою підкислення середовища для його стерилізації, приготування та стерилізація 6%-ного розчину натрію гідроксиду для регуляції рН перед внесенням посівного матеріалу, приготування, підготовка і стерилізація поживних середовищ) та технологічний процес (виращування посівного матеріалу у колбах на качалках) та біосинтез у ферментері об'ємом 50 л із коефіцієнтом заповнення 0.5. Розроблено карту постадійного контролю доферментаційних процесів і виробничого біосинтезу.

Дипломний проєкт викладений на 85 сторінках, містить 10 таблиць, 4 рисунки, складається зі вступу, дев'яти розділів, списку використаної літератури (50 найменувань), технологічної (формат А1, 1 аркуш) та апаратурної (формат А1, 1 аркуш) схем, схеми біотрансформації ростового субстрату у цільовий продукт (формат А3, 1 аркуш).

**Ключові слова:** Дифтерія, вакцина, *Corynebacterium diphtheriae*, екзотоксин, анатоксин, інфекції дихальних шляхів, аеробне культивування

## ABSTRACT

The qualification work is devoted to the development of technological and hardware schemes for the biosynthesis of *Corynebacterium diphtheriae* PW8 diphtheria toxin, which synthesizes 16.73 g/l of this exotoxin during cultivation. Diphtheria toxin after inactivation is used as a component of a complex vaccine against diphtheria, pertussis and tetanus. According to the data of the State Statistics Service of Ukraine regarding population diseases, the calculated production capacity is 3.69 liters of anatoxin per year (309 liters of cultural liquid).

The technology for the production of diphtheria toxoid includes auxiliary work (preparation of sterile aeration air, preparation of a 6% solution of hydrochloric acid in order to acidify the medium for its sterilization, preparation and sterilization of a 6% solution of sodium hydroxide for pH regulation before inoculation, preparation, preparation and sterilization of nutrient media) and technological process (cultivation of seed material in flasks on rockers) and biosynthesis in a 50-liter fermenter with a filling factor of 0.5. A map of step-by-step control of pre-fermentation processes and production biosynthesis has been developed.

The diploma project is laid out on 85 pages, contains 10 tables, 4 figures, consists of an introduction, nine chapters, a list of used literature (50 titles), technological (A1 format, 1 sheet) and hardware (A1 format, 1 sheet) schemes, schemes of biotransformation of the growth substrate into the target product (A3 format, 1 sheet).

**Key words:** Diphtheria, vaccine, *Corynebacterium diphtheriae*, exotoxin, toxoid, respiratory tract infections, aerobic cultivation

## ВСТУП

Дифтерія – це гостре інфекційне захворювання з повітряно-крапельним шляхом передавання, що характеризується ураженням ротоглотки та дихальних шляхів, з розвитком фібринозного запалення в місці проникнення збудника, а також токсичним ураженням серцево-судинної й нервової систем, нирок.

Дифтерія – повсюдно-поширене захворювання. Останнім часом в зв'язку з систематичною імунізацією населення, у багатьох країнах рівень захворюваності знизився до поодиноких випадків. В Україні, останнім часом, поряд із спорадичними випадками часто стали виникати епідемічні спалахи. Це пов'язують із зростанням кількості людей які не були імунізовані проти дифтерії. В нещеплених колективах частіше хворіють діти віком до 6 років, однак, в останні роки, цей показник значно поширився серед більш дорослого населення. Після перенесення хвороби формується антитоксичний та антимікробний довготривалий імунітет. Вакцинація дифтерійним анатоксином забезпечує формування антитоксичного імунітету, що у більшості випадків запобігає розвитку хвороби.

Моя робота присвячена вакцині проти дифтерії, її загальній характеристиці, обґрунтуванню вибору продуцента вихідної речовини для отримання вакцини (*Corynebacterium diphtheriae* PW8, продуцента дифтерійного токсину). Також у роботі піднімаються теми вибору поживного середовища для біосинтезу, вибору оптимальних умов та матеріалів необхідних для проведення процесу, технологічна схема та методи контролю біосинтезу.

Новизною цієї роботи є вибір «rain beef digest medium» у якості поживного середовища для біосинтезу, оскільки воно є найбільш фінансово вигідним для виробничого біосинтезу дифтерійного токсину.

## РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

Цільовим продуктом біосинтезу *Corynebacterium diphtheriae* є дифтерійний токсин (ДТ), який є основним компонентом вакцини протидифтерійної.

ДТ кодується лізогенним фагом (коринефаг  $\beta$ ), але регуляція експресії токсину кодується нуклеоїдом. Бактеріальна хромосома кодує білок-репресор (DtxR), що активується іонами важких металів. В активній формі репресор здатен блокувати транскрипцію. Коли ж металів недостатньо – неактивна форма DtxR не здатна зв'язувати ДНК, що призводить до індукції токсину.

**Хімічна структура:** Позаклітинна молекула ДТ представлена у вигляді екзотоксину поліпептидної природи, що складається з 535 амінокислотних залишків. У клітині ДТ синтезується як проензим, якому необхідна специфічна активація для вираження токсичної функції. Активація базується на протеолітичному розщепленні пептидного зв'язку аргінінового залишку: Arg190, Arg192, Arg193, в результаті чого утворюється 2 поліпептиди: ДТ-А (193 залишків АК, 41 000 дальтон) та ДТ-В (342 залишки АК, 21 000 дальтон). Пептиди ковалентно пов'язані дисульфідним зв'язком між залишками цистеїну Cys186 та Cys201, та зі знищенням цього зв'язку утворюються вільні форми ДТ-А та ДТ-В, здатні інфікувати клітини.

Вважається що молекула ДТ складається з трьох унікальних ділянок – С (ділянка що відповідає за каталіз), Т (відповідає за транслокацію) та R (відповідає за зв'язування з рецепторами клітини). Фрагмент ДТ-А включає в себе С-ділянку, а ДТ-В включає, Т- та R-ділянки. Сама молекула має Y-форму, де нижньою частиною є Т-ділянка. У Y-формі активний кінець С-ділянки заблокований R-ділянкою на стику молекули, що забирає можливість взаємодіяти із субстратом. Через це ці фрагменти мають бути розділені для виявлення токсичної дії [1].

					<b>НУХТ БТЕК 04.02.54 КР ПЗ</b>			
Змн.	Лист.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Тимофеев Д.Г.			<b>РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ</b>	Літ.	Арк.	Аркушіє
Перевір.		Пенчук Ю.М.					9	85
Реценз.						<b>Кафедра БТМ</b> 9		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

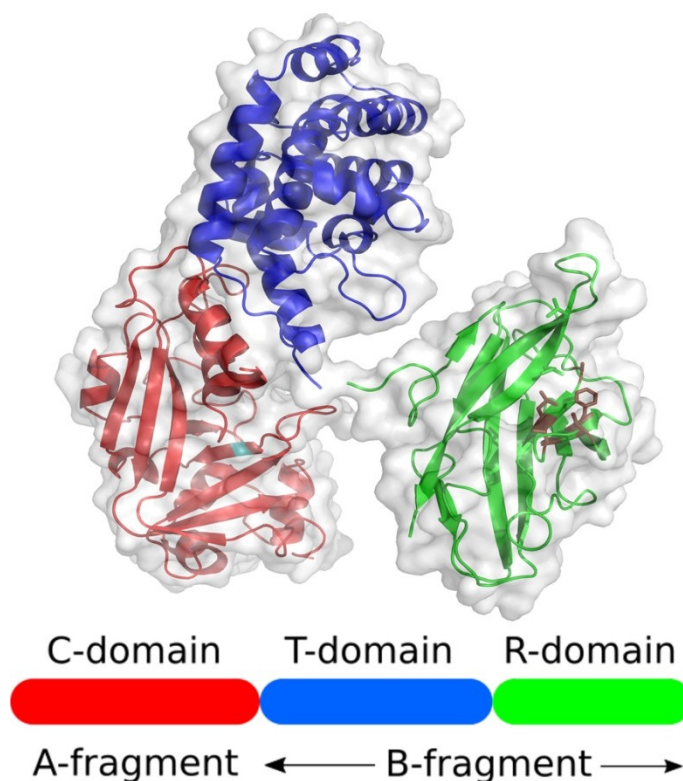


Рисунок 1.1. Структура молекули ДТ [3].

**Механізм дії** токсину полягає у взаємодії з клітинами організму та порушенні нормальної роботи внутрішньоклітинних механізмів. Дифтерійний токсин викликає пошкодження внутрішньоклітинної регуляторної системи, яка відповідає за синтез білків. Токсин взаємодіє з рецепторами на поверхні клітини, після чого відбувається його поглинання всередину. Після цього фрагмент DT-B токсину відділяється від фрагмента DT-A, та залишається в мембрані клітини. Підодиниця А з'єднується з фактором елонгації 2 (EF2), що є важливим білком для процесу трансляції білків. Таке з'єднання призводить до інактивації EF2, що зупиняє процес синтезу білків у клітині та призводить до накопичення продуктів метаболізму клітини [2].

**Сфери застосування:** найбільш поширеним застосуванням для ДТ є його використання як фрагмента протидифтерійної вакцини. У таких вакцинах застосовується інактивована форма токсину, яка лиш викликає імунну відповідь організму, але не хворобу. Зазвичай протидифтерійна вакцина йде у комплексі із двома іншими вакцинами – проти кашлюку та правця.

## РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

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

У ході мого дослідження для цієї роботи я помітив що у всіх статтях/дослідженнях/патентах для біосинтезу дифтерійного токсину у промисловості використовують штам *C. Diphtheriae* PW8. Цей штам обирають насамперед через високу токсикогенність [4, 5, 6, 7].

У таблиці 2.1 наведені варіанти поживних середовищ, які використовуються для біосинтезу дифтерійного токсину.

					<b>НУХТ БТЕК 04.02.54 КР ПЗ</b>			
<b>Змн.</b>	<b>Лист.</b>	<b>№ докум.</b>	<b>Підпис</b>	<b>Дата</b>				
Розроб.	Тимофеев Д.Г.				<b>РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА</b>	<b>Літ.</b>	<b>Арк.</b>	<b>Аркушіє</b>
Перевір.	Пенчук Ю.М.						11	85
Реценз.						<b>Кафедра БТМ 11</b>		
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							

## Особливості одержання біомаси на суміші ростових субстратів

Компоненти поживного середовища:	Концентрація компонентів, г/л	Тривалість культивування, год	Концентрація ПАР, г/л	Особливості процесу біосинтезу	Використана література
1	2	3	4	5	6
-Розчин N-Z-Case Plus -Мальтоза -Натрій лактат -β-аланін -нікотинова к-та - пімелінова к-та - CuSO <sub>4</sub> •5H <sub>2</sub> O - ZnSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O - MnCl <sub>2</sub> •4H <sub>2</sub> O - MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O -L-цистин -FeSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O -K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O	40 25 3.4 0.0138 0.0138 0.9•10 <sup>-3</sup> 0.006 0.0048 0.0018 2.7 0.4 0.1 0.73 0.25 2.73	48 - 72	17.5-21	Культивация проводилась у 10 л посудинах з нержавіючої сталі (роб об'єм 7 л); посудини з трьома шестилопатевиими робочими колесами турбіни. Стерильне повітря подавалось через регулятор тиску, фільтр та витратомітр; культивация йшла 48-72 год. при 35°C; рН підтримувався на рівні 7.2 за допомогою 2 М НСІ; Швидкість перемішування та аерації в ферментері була 200 обертів на хвилину та 0,7 ~ 1,75 л/хв. До складу додали піногасник для контролю піни.	<a href="https://sci-hub.ru/https://link.springer.com/article/10.1007/s12257-016-0360-9">https://sci-hub.ru/https://link.springer.com/article/10.1007/s12257-016-0360-9</a>
- м'ясо яловичини L-цистеїн -папаїн -дріжджовий екстракт -натрію лактат -MgSO <sub>4</sub> ,7H <sub>2</sub> O -мальтоза -нікотинова кислота -бета-аланін -пімелінова кислота -MnCl <sub>2</sub> ,4H <sub>2</sub> O -ZnSO <sub>4</sub> ,7H <sub>2</sub> O -CuSO <sub>4</sub> ,5H <sub>2</sub> O	155 0.25 1.5 0.15 0.09 0,7 18,7 2,1x10 <sup>-3</sup> 2.1x10 <sup>-3</sup> 0.14x10 <sup>-3</sup> 0,28x10 <sup>-3</sup> 0,74x10 <sup>-3</sup> 0,93x10 <sup>-3</sup>	48	12.18-16.73	7,5-літровий біореактор використовували для виробництва токсину в робочому обсязі 5 л. Під час культивування рН і температуру контролювали на рівні 7,6 (з використанням 50% розчину глюкози) і 35°C відповідно. Швидкість мішалки від 300 до 600 об/хв за допомогою каскадного керування. Відсоток розчиненого кисню (% DO) контролювали за допомогою зонда DO. Використовували силіконовий піногасник (5% розчин Silicolapse®) для контролю піноутворення.	<a href="https://sci-hub.ru/https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1045105616300744">https://sci-hub.ru/https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1045105616300744</a>

## Закінчення таблиці 2.1.

- м'ясо яловичини	143	40 - 48	12.6	Ферментери, що містять стерильне поживне середовище, засіяли 1% інокуляту і культивували при 35°C протягом 40-48 годин. Культуру в ферментері перемішували при 800 об/хв і аерували при 3-4 л/хв. Додавання 10 мл силіконового протипінного агента сприяло контролю піноутворення. Напівбезперервне періодичне культивування в лабораторному ферментері проводили, як описано нижче. Наприкінці першої партії утворену біомасу видаляли та асептично додавали свіже середовище. Культура, що залишилася (500 мл) була закваскою для наступної партії.	<a href="https://sci-hub.ru/https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16232962/">https://sci-hub.ru/https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16232962/</a>
-папаїн	1.144				
-дріжджовий екстракт	0.15				
-натрію лактат	0.6				
-магnezій-сульфат	0.3				
-мальтоза	20				
-нікотинова кислота	$2,1 \times 10^{-3}$				
-бета-аланін	$2,1 \times 10^{-3}$				
-пімелінова кислота	$0,14 \times 10^{-3}$				
-MnCl <sub>2</sub> ,4H <sub>2</sub> O	$0,28 \times 10^{-3}$				
-ZnSO <sub>4</sub> ,7H <sub>2</sub> O	$0,74 \times 10^{-3}$				
-CuSO <sub>4</sub> ,5H <sub>2</sub> O	$0,93 \times 10^{-3}$				

## Вартість поживних середовищ для культивування продуцентів ПАР

№ поживного середовища	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
1	Розчин N-Z-Case Plus	40	4270	170.8	<a href="https://www.sigmaaldrich.com/UA/en/product/sial/n4642">https://www.sigmaaldrich.com/UA/en/product/sial/n4642</a>
	Мальтоза	25	124	3.1	<a href="https://flagma.ua/uk/maltodekstrin-de-18-20-roquette-india-1-kg-o13627694.html">https://flagma.ua/uk/maltodekstrin-de-18-20-roquette-india-1-kg-o13627694.html</a>
	Натрій лактат	3.4	269	0.9146	<a href="https://klebrig.com.ua/ua/p1824313614-laktat-natriya-klebrig.html?source=merchant_center&amp;utm_source=google&amp;utm_medium=cpc&amp;utm_campaign=Perf_Max-Turboweb&amp;gclid=CjwKCAjwjMiiBhA4EiwAZe6jQ3tUrqOwrFwbwz2C8r-ltFSMq5Omau20s16yxaMOgyKY4BPnIHDiGRoChfMQAvD_BwE">https://klebrig.com.ua/ua/p1824313614-laktat-natriya-klebrig.html?source=merchant_center&amp;utm_source=google&amp;utm_medium=cpc&amp;utm_campaign=Perf_Max-Turboweb&amp;gclid=CjwKCAjwjMiiBhA4EiwAZe6jQ3tUrqOwrFwbwz2C8r-ltFSMq5Omau20s16yxaMOgyKY4BPnIHDiGRoChfMQAvD_BwE</a>
	β-аланін	0.0138	825	0.011385	<a href="https://prom.ua/ua/p1237667976-beta-alanin-substantsiya.html?utm_source=google_pmax&amp;utm_medium=cpc&amp;utm_content=pmax&amp;utm_ca">https://prom.ua/ua/p1237667976-beta-alanin-substantsiya.html?utm_source=google_pmax&amp;utm_medium=cpc&amp;utm_content=pmax&amp;utm_ca</a>
	пімелінова кислота	0.0138	1300	0.01794	<a href="https://www.alibaba.com/product-detail/Factory-Supply-Pimelic-Acid-Price-CAS_1600658411252.html?spm=a2700.7724857.0.0.24d2be2a7ueTTG&amp;s=p">https://www.alibaba.com/product-detail/Factory-Supply-Pimelic-Acid-Price-CAS_1600658411252.html?spm=a2700.7724857.0.0.24d2be2a7ueTTG&amp;s=p</a>
	нікотинова кислота	0.9*10 <sup>-3</sup>	660	0.000594	<a href="https://prom.ua/ua/p738006496-vitamin-nikotinovaya-kislota.html?srltid=AR57-fBJuxd1502xQGEz7QAfe7IH1tzovA3bErbEcXn5u9xyDZRSf8Ue5cE">https://prom.ua/ua/p738006496-vitamin-nikotinovaya-kislota.html?srltid=AR57-fBJuxd1502xQGEz7QAfe7IH1tzovA3bErbEcXn5u9xyDZRSf8Ue5cE</a>
	CuSO <sub>4</sub> •5H <sub>2</sub> O	0.006	123	0.000738	<a href="https://www.systopt.com.ua/ru/item-mid-sirchanokysla-5-vodna-sulfat-midi-midnyj-kuporos">https://www.systopt.com.ua/ru/item-mid-sirchanokysla-5-vodna-sulfat-midi-midnyj-kuporos</a>
	ZnSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	0.0048	87	0.0004176	<a href="https://klebrig.com.ua/ua/p1481084526-sulfat-tsinka-vodnyj.html?source=merchant_center&amp;utm_source=google&amp;utm_medium=cpc&amp;utm_campaign=Perf_Max-Turboweb&amp;gclid=CjwKCAjw3ueiBhBmEiwA4BhspNc2epoVCXgkIvyesSi8jKB7r5k2RKxeU3Z5xLBOjApEh_tVEDfYABoCwkoQAvD_BwE">https://klebrig.com.ua/ua/p1481084526-sulfat-tsinka-vodnyj.html?source=merchant_center&amp;utm_source=google&amp;utm_medium=cpc&amp;utm_campaign=Perf_Max-Turboweb&amp;gclid=CjwKCAjw3ueiBhBmEiwA4BhspNc2epoVCXgkIvyesSi8jKB7r5k2RKxeU3Z5xLBOjApEh_tVEDfYABoCwkoQAvD_BwE</a>
	MnCl <sub>2</sub> •4H <sub>2</sub> O	0.0018	206	0.3708	<a href="https://prom.ua/ua/p277934134-marganets-hloristyj-vodnyj.html?utm_source=google_pmax&amp;utm_medium=cpc&amp;utm_content=pmax&amp;utm_campaign=Pmax_cpa_1_50_b2b&amp;gclid=CjwKCAjw3ueiBhBmEiwA4BhspKkSg_9n1iAguAc_k1KxHVGE8HCi2_S5gwOLJnFuLpMx0cVVuT5ebRoCuhQQAvD_BwE">https://prom.ua/ua/p277934134-marganets-hloristyj-vodnyj.html?utm_source=google_pmax&amp;utm_medium=cpc&amp;utm_content=pmax&amp;utm_campaign=Pmax_cpa_1_50_b2b&amp;gclid=CjwKCAjw3ueiBhBmEiwA4BhspKkSg_9n1iAguAc_k1KxHVGE8HCi2_S5gwOLJnFuLpMx0cVVuT5ebRoCuhQQAvD_BwE</a>
MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	2.7	8	0.0216	<a href="https://selitra.biz/uk/p616273124-magniju-sulphat-7-vodnij.html?srltid=AR57-fDQWAPAyMW83AifN4IbHPEjmWswK8k3ebvbAaTGCCgr1as">https://selitra.biz/uk/p616273124-magniju-sulphat-7-vodnij.html?srltid=AR57-fDQWAPAyMW83AifN4IbHPEjmWswK8k3ebvbAaTGCCgr1as</a>	

					vf4RtnE4
	L-цистин	0.4	1,188	0.04752	<a href="https://www.bulksupplements.com/products/l-cysteine-powder?variant=32133420417135">https://www.bulksupplements.com/products/l-cysteine-powder?variant=32133420417135</a>
	FeSO4•7H2O	0.1	1 466	0.1466	<a href="https://shop.hlr.ua/jeleza-ii-sulfat-7-mi-vodnyy-gr-100-g-232582.html">https://shop.hlr.ua/jeleza-ii-sulfat-7-mi-vodnyy-gr-100-g-232582.html</a>
	K2HPO4	0.73	85	0.06205	<a href="https://prom.ua/ua/p1267047719-ortofosfat-kaliya.html?utm_source=google_product&amp;utm_medium=cpc&amp;utm_content=pla&amp;utm_campaign=KT_cpc_1&amp;gclid=CjwKCAjwjMiiBhA4EiwAZe6jQ1LW_Y9_0_Q7-7xks4FKcMJNE10voFsPdXY41PCE2sXaNCNuA8ES0hoC_ScQAvD_BwE">https://prom.ua/ua/p1267047719-ortofosfat-kaliya.html?utm_source=google_product&amp;utm_medium=cpc&amp;utm_content=pla&amp;utm_campaign=KT_cpc_1&amp;gclid=CjwKCAjwjMiiBhA4EiwAZe6jQ1LW_Y9_0_Q7-7xks4FKcMJNE10voFsPdXY41PCE2sXaNCNuA8ES0hoC_ScQAvD_BwE</a>
	KH2PO4	0.25	146	0.0365	<a href="https://prom.ua/ua/p1129763817-digidroortofosfat-kaliya-meshok.html?srsId=AR57-fDuRL16LX8a1-6fR9z9KnrRgEIP5mJPiDE1YpsUdJCP--R9xvm0CfE">https://prom.ua/ua/p1129763817-digidroortofosfat-kaliya-meshok.html?srsId=AR57-fDuRL16LX8a1-6fR9z9KnrRgEIP5mJPiDE1YpsUdJCP--R9xvm0CfE</a>
	CaCl2•2H2O	2.73	68	0.18564	<a href="https://klebrig.com.ua/ua/p1179966495-kaltsij-hloristyj-klebrig.html?source=merchant_center&amp;utm_source=google&amp;utm_medium=cpc&amp;utm_campaign=Perf_Max-Turboweb&amp;gclid=CjwKCAjw3ueiBhBmEiwA4BhspD2hbNwLD_oBdHF4nHx5LwIVwQvlj_8JSuAbOAN9FqLqGHvqQxSABoCXIAQAvD_BwE">https://klebrig.com.ua/ua/p1179966495-kaltsij-hloristyj-klebrig.html?source=merchant_center&amp;utm_source=google&amp;utm_medium=cpc&amp;utm_campaign=Perf_Max-Turboweb&amp;gclid=CjwKCAjw3ueiBhBmEiwA4BhspD2hbNwLD_oBdHF4nHx5LwIVwQvlj_8JSuAbOAN9FqLqGHvqQxSABoCXIAQAvD_BwE</a>
<b>Вартість 1 л середовища: 175.70 грн</b>					
2	м'ясо яловичини	155	85	13.175	<a href="https://ukrmyso.all.biz/uk/yalovychyna-ii-klas-ohl-ukrayina-g13380766">https://ukrmyso.all.biz/uk/yalovychyna-ii-klas-ohl-ukrayina-g13380766</a>
	L-цистеїн	0.25	1 452	0.363	<a href="https://prom.ua/ua/p1791285419-tsistein-gidrohlorid.html?utm_source=google_product&amp;utm_medium=cpc&amp;utm_content=pla&amp;utm_campaign=KT_cpc_1&amp;gclid=CjwKCAjwjMiiBhA4EiwAZe6jQyJT30NBeWAAjdEQ02X7UDmYVx5VOWpcqnau3cl140xuAWIpljCKUBoCkh4QAvD_BwE">https://prom.ua/ua/p1791285419-tsistein-gidrohlorid.html?utm_source=google_product&amp;utm_medium=cpc&amp;utm_content=pla&amp;utm_campaign=KT_cpc_1&amp;gclid=CjwKCAjwjMiiBhA4EiwAZe6jQyJT30NBeWAAjdEQ02X7UDmYVx5VOWpcqnau3cl140xuAWIpljCKUBoCkh4QAvD_BwE</a>
	папаїн	1.5	8500	12.75	<a href="https://prom.ua/ua/p1695232437-papain-enzim-800.html?utm_source=google_pmax&amp;utm_medium=cpc&amp;utm_content=pmax&amp;utm_campaign=Pmax_cpa_war_medikamenty_medtovary&amp;gclid=CjwKCAjwjMiiBhA4EiwAZe6jQ6gRMEh16vwwT9y71A9nyOnhviTUDUk9MhIdXZS4IVsqDXHkYKE4hoCaAcQAvD_BwE">https://prom.ua/ua/p1695232437-papain-enzim-800.html?utm_source=google_pmax&amp;utm_medium=cpc&amp;utm_content=pmax&amp;utm_campaign=Pmax_cpa_war_medikamenty_medtovary&amp;gclid=CjwKCAjwjMiiBhA4EiwAZe6jQ6gRMEh16vwwT9y71A9nyOnhviTUDUk9MhIdXZS4IVsqDXHkYKE4hoCaAcQAvD_BwE</a>
	дріжджовий екстракт	0.15	1100	0.165	<a href="https://prom.ua/ua/p1086437845-ekstrakt-drozhzhej.html">https://prom.ua/ua/p1086437845-ekstrakt-drozhzhej.html</a>
	натрію лактат	0.09	269	0.02421	<a href="https://klebrig.com.ua/ua/p1824313614-laktat-natriya-klebrig.html?source=merchant_center&amp;utm_source=google&amp;utm_medium=cpc&amp;utm_campaign=Perf_Max-Turboweb&amp;gclid=CjwKCAjwjMiiBhA4EiwAZe6jQ3tUrqOwFwbwz2C8r-ltFSMq5Omau20s16yxaMOgyKY4BPnIHDiGRoChfMQAvD_BwE">https://klebrig.com.ua/ua/p1824313614-laktat-natriya-klebrig.html?source=merchant_center&amp;utm_source=google&amp;utm_medium=cpc&amp;utm_campaign=Perf_Max-Turboweb&amp;gclid=CjwKCAjwjMiiBhA4EiwAZe6jQ3tUrqOwFwbwz2C8r-ltFSMq5Omau20s16yxaMOgyKY4BPnIHDiGRoChfMQAvD_BwE</a>
	пімелінова кислота	0.14x10 <sup>-3</sup>	1292	0.00018088	<a href="https://www.alibaba.com/product-detail/Factory-Supply-Pimelic-Acid-Price-CAS_1600658411252.html?spm=a2700.7724857.0.0.24d2be2a7u">https://www.alibaba.com/product-detail/Factory-Supply-Pimelic-Acid-Price-CAS_1600658411252.html?spm=a2700.7724857.0.0.24d2be2a7u</a>

					eTTG&s=p
	нікотинова кислота	2,1x10 <sup>-3</sup>	660	0.001386	<a href="https://prom.ua/ua/p738006496-vitamin-nikotinovaya-kislota.html?srltid=AR57-fBJuxdl502xQGEz7QAfE7IH1tzovA3bErbEcXn5u9xyDZRSf8Ue5cE">https://prom.ua/ua/p738006496-vitamin-nikotinovaya-kislota.html?srltid=AR57-fBJuxdl502xQGEz7QAfE7IH1tzovA3bErbEcXn5u9xyDZRSf8Ue5cE</a>
	мальтоза	18,7	124	2.3188	<a href="https://flagma.ua/uk/maltodekstrin-de-18-20-roquette-india-1-kg-o13627694.html">https://flagma.ua/uk/maltodekstrin-de-18-20-roquette-india-1-kg-o13627694.html</a>
	Бета-аланін	2.1x10 <sup>-3</sup>	825	0.0017325	<a href="https://prom.ua/ua/p1237667976-beta-alanin-substantsiya.html?utm_source=google_e_pmax&amp;utm_medium=cpc&amp;utm_content=pmax&amp;utm_campaign=Pmax_cpa_war_medikamenty_medtovary&amp;gclid=CjwKC-AjwjM-iiBhA4EiwAZe6jQ-M0vEWgRm1VN7ZeOrkVfXqer-2pFnNT6fkkpuhM5C-Wl5Rt9Bh82pBoC4OQQAvD_BwEc">https://prom.ua/ua/p1237667976-beta-alanin-substantsiya.html?utm_source=google_e_pmax&amp;utm_medium=cpc&amp;utm_content=pmax&amp;utm_campaign=Pmax_cpa_war_medikamenty_medtovary&amp;gclid=CjwKC-AjwjM-iiBhA4EiwAZe6jQ-M0vEWgRm1VN7ZeOrkVfXqer-2pFnNT6fkkpuhM5C-Wl5Rt9Bh82pBoC4OQQAvD_BwEc</a>
	MgSO4,7H2O	0,7	8	0.0056	<a href="https://selitra.biz/uk/p616273124-magniju-sulphat-7-vodnij.html?srltid=AR57-fDQWAPAyMW83AifN4IbHPEjmWswK8k3ebvbAaTGCCgr1asvf4RtmE4">https://selitra.biz/uk/p616273124-magniju-sulphat-7-vodnij.html?srltid=AR57-fDQWAPAyMW83AifN4IbHPEjmWswK8k3ebvbAaTGCCgr1asvf4RtmE4</a>
	MnCl2,4H2O	0,28x10 <sup>-3</sup>	206	0.00005768	<a href="https://prom.ua/ua/p277934134-marganets-hloristyj-vodnyj.html?utm_source=google_pmax&amp;utm_medium=cpc&amp;utm_content=pmax&amp;utm_campaign=Pmax_cpa_1_50_b2b&amp;gclid=CjwKCAjw3ueiBhBmEiwA4BhspKkSg_9nliAguAc_k1KxHVGE8HCi2_S5gwOLJnFuLp-Mx0cVVuT5ebRoCuhQQAavD_BwE">https://prom.ua/ua/p277934134-marganets-hloristyj-vodnyj.html?utm_source=google_pmax&amp;utm_medium=cpc&amp;utm_content=pmax&amp;utm_campaign=Pmax_cpa_1_50_b2b&amp;gclid=CjwKCAjw3ueiBhBmEiwA4BhspKkSg_9nliAguAc_k1KxHVGE8HCi2_S5gwOLJnFuLp-Mx0cVVuT5ebRoCuhQQAavD_BwE</a>
	ZnSO4,7H2O	0,74x10 <sup>-3</sup>	87	0.00006438	<a href="https://klebrig.com.ua/ua/p1481084526-sulfat-tsinka-vodnyj.html?source=merchant_center&amp;utm_source=google&amp;utm_medium=cpc&amp;utm_campaign=Perf_Max-Turboweb&amp;gclid=CjwKCAjw3ueiBhBmEiwA4BhspNc2epoVCXgklv-ycsSi8jKB7r5k2RKxeU3Z5xLBOjApEh_tVEDfYABoCwkoQAvD_BwE">https://klebrig.com.ua/ua/p1481084526-sulfat-tsinka-vodnyj.html?source=merchant_center&amp;utm_source=google&amp;utm_medium=cpc&amp;utm_campaign=Perf_Max-Turboweb&amp;gclid=CjwKCAjw3ueiBhBmEiwA4BhspNc2epoVCXgklv-ycsSi8jKB7r5k2RKxeU3Z5xLBOjApEh_tVEDfYABoCwkoQAvD_BwE</a>
	CuSO4,5H2O	0,93x10 <sup>-3</sup>	123	0.00011439	<a href="https://www.systopt.com.ua/ru/item-mid-sirchanokysla-5-vodna-sulfat-midi-midnyj-kuporos">https://www.systopt.com.ua/ru/item-mid-sirchanokysla-5-vodna-sulfat-midi-midnyj-kuporos</a>
<b>Вартість 1 л середовища: 28.80 грн</b>					
3	м'ясо яловичини	143	85	12.155	<a href="https://ukrmyso.all.biz/uk/yalovychna-ii-klas-ohl-ukrayina-g13380766">https://ukrmyso.all.biz/uk/yalovychna-ii-klas-ohl-ukrayina-g13380766</a>
	папаїн	1.144	8500	9.724	<a href="https://prom.ua/ua/p1695232437-papain-enzim-800.html?utm_source=google_pmax&amp;utm_medium=cpc&amp;utm_content=pmax&amp;utm_campaign=Pmax_cpa_war_medikamenty_medtovary&amp;gclid=CjwKCAjwjMiiBhA4EiwAZe6jQ6gRME-Eh16-vwwT9y71A9nyOnhviTUDUk9MhIdXZS4IVsqDXHkYKE4hoCaAcQAvD_BwE">https://prom.ua/ua/p1695232437-papain-enzim-800.html?utm_source=google_pmax&amp;utm_medium=cpc&amp;utm_content=pmax&amp;utm_campaign=Pmax_cpa_war_medikamenty_medtovary&amp;gclid=CjwKCAjwjMiiBhA4EiwAZe6jQ6gRME-Eh16-vwwT9y71A9nyOnhviTUDUk9MhIdXZS4IVsqDXHkYKE4hoCaAcQAvD_BwE</a>
	дріжджовий екстракт	0.15	1100	0.165	<a href="https://prom.ua/ua/p1086437845-ekstrakt-drozhzhej.html">https://prom.ua/ua/p1086437845-ekstrakt-drozhzhej.html</a>

натрію лактат	$0.6 \times 10^{-3}$	269	0.0001614	<a href="https://prom.ua/ua/p738006496-vitamin-nikotinovaya-kislota.html?srltid=AR57-fBJuxdl502xQGEz7QAfE7IH1tzovA3bErbEcXn5u9xyDZRSf8Ue5cE">https://prom.ua/ua/p738006496-vitamin-nikotinovaya-kislota.html?srltid=AR57-fBJuxdl502xQGEz7QAfE7IH1tzovA3bErbEcXn5u9xyDZRSf8Ue5cE</a>
мальтоза	20	124	2.48	<a href="https://flagma.ua/uk/maltodekstrin-de-18-20-roquette-india-1-kg-o13627694.html">https://flagma.ua/uk/maltodekstrin-de-18-20-roquette-india-1-kg-o13627694.html</a>
MgSO <sub>4</sub> ,7H <sub>2</sub> O	0.3	8	0.0024	<a href="https://selitra.biz/uk/p616273124-magniju-sulphat-7-vodnyj.html?srltid=AR57-fDQWAPAyMW83AifN4IbHPEjmWswK8k3ebvbAaTGCCgrlasvf4RtmE4">https://selitra.biz/uk/p616273124-magniju-sulphat-7-vodnyj.html?srltid=AR57-fDQWAPAyMW83AifN4IbHPEjmWswK8k3ebvbAaTGCCgrlasvf4RtmE4</a>
пімелінова кислота	$0.14 \times 10^{-3}$	1292	0.00018088	<a href="https://www.alibaba.com/product-detail/Factory-Supply-Pimelic-Acid-Price-CAS_1600658411252.html?spm=a2700.7724857.0.0.24d2be2a7ueTTG&amp;s=p">https://www.alibaba.com/product-detail/Factory-Supply-Pimelic-Acid-Price-CAS_1600658411252.html?spm=a2700.7724857.0.0.24d2be2a7ueTTG&amp;s=p</a>
нікотинова кислота	$2,1 \times 10^{-3}$	660	0.001386	<a href="https://prom.ua/ua/p738006496-vitamin-nikotinovaya-kislota.html?srltid=AR57-fBJuxdl502xQGEz7QAfE7IH1tzovA3bErbEcXn5u9xyDZRSf8Ue5cE">https://prom.ua/ua/p738006496-vitamin-nikotinovaya-kislota.html?srltid=AR57-fBJuxdl502xQGEz7QAfE7IH1tzovA3bErbEcXn5u9xyDZRSf8Ue5cE</a>
Бета-аланін	$2.1 \times 10^{-3}$	825	0.0017325	<a href="https://prom.ua/ua/p1237667976-beta-alanin-substansiya.html?utm_source=google_e_pmax&amp;utm_medium=cpc&amp;utm_content=pmax&amp;utm_campaign=Pmax_cpa_war_medikamenty_medtovary&amp;gclid=CjwKCAjwjMiiBhA4EiwAZE6jQ_M0vEWgRm1VN7ZeOrkVfXqer-2pFnNT6fkkpuhM5CW15Rt9Bh82pBoC4OQQAvD_BwEc">https://prom.ua/ua/p1237667976-beta-alanin-substansiya.html?utm_source=google_e_pmax&amp;utm_medium=cpc&amp;utm_content=pmax&amp;utm_campaign=Pmax_cpa_war_medikamenty_medtovary&amp;gclid=CjwKCAjwjMiiBhA4EiwAZE6jQ_M0vEWgRm1VN7ZeOrkVfXqer-2pFnNT6fkkpuhM5CW15Rt9Bh82pBoC4OQQAvD_BwEc</a>
MnCl <sub>2</sub> ,4H <sub>2</sub> O	$0,28 \times 10^{-3}$	206	0.00005768	<a href="https://prom.ua/ua/p277934134-marganets-hloristyj-vodnyj.html?utm_source=google_pmax&amp;utm_medium=cpc&amp;utm_content=pmax&amp;utm_campaign=Pmax_cpa_1_50_b2b&amp;gclid=CjwKCAjw3ueiBhBmEiwA4BhspKkSg_9n1iAguAc_k1KxHVGE8HCi2_S5gwOLJnFuLpMx0cVVuT5ebRoCuhQQAvD_BwE">https://prom.ua/ua/p277934134-marganets-hloristyj-vodnyj.html?utm_source=google_pmax&amp;utm_medium=cpc&amp;utm_content=pmax&amp;utm_campaign=Pmax_cpa_1_50_b2b&amp;gclid=CjwKCAjw3ueiBhBmEiwA4BhspKkSg_9n1iAguAc_k1KxHVGE8HCi2_S5gwOLJnFuLpMx0cVVuT5ebRoCuhQQAvD_BwE</a>
ZnSO <sub>4</sub> ,7H <sub>2</sub> O	$0,74 \times 10^{-3}$	87	0.00006438	<a href="https://klebrig.com.ua/ua/p1481084526-sulfat-tsinka-vodnyj.html?source=merchant_center&amp;utm_source=google&amp;utm_medium=cpc&amp;utm_campaign=Perf_Max-Turboweb&amp;gclid=CjwKCAjw3ueiBhBmEiwA4BhspNc2epoVCXgkIvycsSi8jKB7r5k2RKxeU3Z5xLBOjApEh_tVEDfYABoCwkoQAvD_BwE">https://klebrig.com.ua/ua/p1481084526-sulfat-tsinka-vodnyj.html?source=merchant_center&amp;utm_source=google&amp;utm_medium=cpc&amp;utm_campaign=Perf_Max-Turboweb&amp;gclid=CjwKCAjw3ueiBhBmEiwA4BhspNc2epoVCXgkIvycsSi8jKB7r5k2RKxeU3Z5xLBOjApEh_tVEDfYABoCwkoQAvD_BwE</a>
CuSO <sub>4</sub> ,5H <sub>2</sub> O	$0,93 \times 10^{-3}$	123	0.00011439	<a href="https://www.systopt.com.ua/ru/item-mid-sirchanokysla-5-vodna-sulfat-midi-midnyj-kuporos">https://www.systopt.com.ua/ru/item-mid-sirchanokysla-5-vodna-sulfat-midi-midnyj-kuporos</a>
<b>Вартість 1 л середовища: 24.53 грн</b>				

Умовна вартість 1 г поверхнево-активних речовин, синтезованих на суміші ростових субстратів

№ середовища	Концентрація ПАР, г/л	Тривалість культивування, год	Кількість утворених ПАР за годину, г/год	Вартість 1 л середовища, грн/л	Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г
1	2	3	4	5	6
1	19.25	72	0.267	175.70	9.13
2	14.6	48	0.304	28.80	1.97
3	12.6	48	0.262	24.53	1.95

Як можемо бачити, середовища 2 та 3 (основані на розкладеному папаїном коров'ячому м'язі) набагато вигідніші для використання, аніж середовище 1 (казеїновий гідролізат).

## 2.2 Розрахунок складу поживного середовища

Тривалість культивування 48 год, концентрація токсину в культуральній рідині становить 12.6 г/л, а концентрація біомаси – 32 г/л.

**Хімічний склад бактеріальної клітини:** (в % до маси сухої речовини): Карбон – 50; Оксиген – 20; Нітроген – 10...14; Гідроген – 8; Фосфор – 3; Сульфур, Калій, Натрій - 1; Кальцій, Магній, Хлор – 0,5; Ферум – 0,2; решта елементів – близько 0,3.

### *Розрахунок вмісту джерела вуглецевого живлення у середовищі.*

*Потреби для синтезу біомаси.* Джерелом вуглецю у середовищі є мальтоза. У біомасі міститься 50 % Карбону, тож вміст Карбону у 32 г біомаси становить  $32 \times 0,5 = 16$  г. Ця кількість Карбону міститься у 40 г вуглеводів ( $16 \times 2,5 = 40$ ). Враховуючи, що при вирощуванні мікроорганізмів на вуглеводах близько 40 % субстрату окиснюється до  $\text{CO}_2$  для одержання енергії, необхідної для конструктивного метаболізму, вміст мальтози у середовищі становитиме  $(40 \times 0,4) + 40 = 56$  г/л = 5.6 %.

*Потреби для синтезу токсину.* Припустимо що приблизний вміст карбону у дифтерійному токсині – 25%. Тоді у 12.6 г/л токсину міститься 3.15 г/л карбону. Вміст вуглецю у мальтозі – 42%. Для синтезу 12.6 г/л токсину потрібно 10.5 г/л мальтози

$$1) 3.15/0.42 = 7.5 \text{ г/л}$$

$$2) (7.5*0.4) + 7.5 = 10.5 \text{ г/л}$$

Така кількість субстрату не може бути внесена у середовище одразу, початкова концентрація мальтози у середовищі становить 2%, тобто 20 г/л. Решта субстрату (46.5 г/л) вноситься у процесі культивування порціями.

*Розрахунок вмісту в середовищі джерела азотного живлення* для вирощування продуцента дифтерійного токсину доволі складно, оскільки джерело азоту є натуральним – розчинене папаїном м'ясо яловичини. Кількість нітрогену визначається методом К'ельдаля.

Взявши за приклад статтю [5], де використовується дане поживне середовище і даний метод, вміст нітрогену був в рамках 3.5-4г/л при 143 г/л розчиненої папаїном яловичини.

Припустимо вміст нітрогену в біомасі бактерії складає 10%. Тоді на 32 г біомаси потрібно 3.2 г нітрогену. Для такої кількості азоту нам знадобиться  $3.2 * 143 / 3.5 = 130.7$  грам розчепленої яловичини. Також слід зазначити, що на розчеплення одного кг яловичини витрачається 8 г папаїну, тож для розчеплення 130.7 г знадобиться  $130.7/1000*8 = 1.05$  г.

*Потреби для синтезу токсину.* Припустимо що у токсині вміст нітрогену - 9%. Тоді у 12.6 г токсину - 1.13 г нітрогену. Маємо:  $1.13/(3.5/143) = 46.2$  г яловичини.

Початкова концентрація розчепленого м'яса становить 143 г/л, а решта (33.9 г/л) також вноситься дробно.

#### ***Розрахунок складу підживлювального розчину***

У вигляді підживлювального розчину в середовище необхідно внести у процесі культивування продуцента дифтерійного токсину 33.9 г/л розчепленої папаїном яловичини та 46.5 г/л мальтози (див. попередні розрахунки). Тривалість

культивування становить 48 год. Прийmemo, що підживлення додається у середовище кожні 8 год. Тоді кількість порцій підживлення становить  $(48-8) / 8 = 5$ . Отже, з кожною порцією підживлення у середовище повинно вноситись  $33.9 / 5 = 6.78$  г/л яловичини і  $46.5 / 5 = 9.3$  г/л мальтози.

### ***Інші компоненти середовища***

Джерелом необхідних для росту бактерій елементів, як хлор, кальцій, ферум є розчеплений папаїном коров'ячий мускул. Крім того, до складу поживного середовища входить дріжджовий екстракт, який містить в собі необхідні ростові фактори для ауксотрофного штаму, яким є *Corynebacterium diphtheriae* PW8.

## **2.3 Морфолого-культуральні та Фізіолого-біохімічні ознаки *C. diphtheriae***

### **Морфологічні ознаки**

*C. diphtheriae* є грампозитивною паличкоподібною бактерією, яка має видовжену тонку форму, з розширення на одному, чи обох кінцях клітини. Доволі часто зустрічається у парах або малих групах (рис 2.1).



Рис. 2.1. *C. diphtheriae*, пафарбована метиленовим синім [8]

Розміри *C. diphtheriae* складають 3 - 5  $\mu\text{m}$  x 0.5 - 0.8  $\mu\text{m}$  в діаметрі. У бактерії наявні пілі та відсутня капсула. *C. diphtheriae* не утворює спори і є нерухомою. Утворює метакроматичні гранули, які є «складами» енергії. [8]

### **Культуральні ознаки**

*Corynebacterium diphtheriae* добре росте на простому поживному агарі та кровавому агарі у мезофільному ( $\sim 35^\circ\text{C}$ ) температурному діапазоні. Однак, ріст на кишковорозчинному агарі та на агарі МакКонкі не спостерігається. Ріст *C. diphtheriae* на агаризованому середовищі здобувається додаванням таких компонентів як налідиксова кислота та колістин сульфат. Ці речовини є інгібіторами для росту грамнегативних бактерій.

Найважливішим поживним середовищем, яке використовується для відокремлення *C. diphtheriae* є агар овечої крові (SBA). Інше селективне поживне середовище включає в себе цистин-теллуритовий кровавий агар (СТВА), або свіжоприготоване середовище Тінсдейла.

Нижче наведені культуральні характеристики *C. diphtheriae* на різних поживних середовищах

#### ***Теллуритове середовище.***

*C. diphtheriae* формує тьмяні, непрозорі колонії сірого кольору з діаметром у  $\sim 2$  мм. Поверхня колоній матова, має тенденцію розпадатись при дотиці петлею.

***Агар овечої крові.*** На даному поживному середовищі можна спостерігати сіро-чорні колонії з розміром 1-2 мм у діаметрі. *C. diphtheriae* проявляє гемолітичну активність на кровавому агарі [8].

### **Фізіолого-біохімічні ознаки**

*C. diphtheriae* – бактерія, здатна рости в мезофільному температурному діапазоні ( $25-45^\circ\text{C}$ ), в лабораторії вирощується за  $37^\circ\text{C}$ . Є нейтрофілом (оптимум рН  $7.5 \pm 0.5$ ). *C. diphtheriae* має досить нетипову клітинну стінку для грам+ бактерії. Вона складається з арабінози, галактози, діамінопімелінової кислоти та миколінових кислот (28-40 атомів карбону). Тип живлення *C. diphtheriae* – хемоорганотроф та аероб, здатний до зброджування у деяких особливих умовах. Ця бактерія є дуже вибаглива, та росте досить повільно навіть на дуже «багатих» середовищах. [10].

*C. diphtheriae* досить чутливий для антибіотику бензилпеніциліну, та дуже чутливий до таких антибіотиків як: еритроміцин, кліндаміцин, кіпрофлоксацин, доксициклін, гентаміцин, рифампицин, лінезолід та ванкоміцин [11].

#### **2.4. Таксономічний статус *C. diphtheriae***

Сучасна (філогенетична) класифікація для *C. diphtheriae* наведена згідно другого видання Керівництва Бергі з систематики бактерій [9].

Домен: *Bacteria*

Відділ: *Actinobacteria*

Клас: *Actinobacteria*

Порядок: *Corynebacteriales*

Підпорядок: *Corynebacterineae*

Родина: *Corynebacteriaceae*

Рід: *Corynebacterium*

Вид: *diphtheriae*

## РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

### 3.1. Потреба у цільовому продукті

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 [12].

#### *Причини дифтерії*

Збудником є дифтерійна паличка (коринебактерія), яка виробляє екзотоксин, стійка до дії різних чинників, у зовнішньому середовищі може зберігатися до 15 діб; кип'ятіння та 1%-й розчин сулеми знищують палички через 1 хвилину. Токсин, який виділяє паличка, в зовнішньому середовищі нестійкий, швидко гине під час нагрівання (+60 °C та вище), а також внаслідок дії прямих сонячних променів. Інкубаційний період захворювання — від 3 до 10 днів [12].

#### *Профілактика дифтерії*

Попередити розвиток небезпечних ускладнень можна завдяки вакцинації дітей, згідно з Календарем профілактичних щеплень, і ревакцинація дорослих кожні 10 років.

Вакцинація, як і перенесене захворювання, вже через 1–1,5 років не гарантує захисту від інфікування та захворювання, але у правильно щеплених недуга матиме набагато легший перебіг, ніж у тих, хто не має щеплень. Тому так важливо вчасно здійснювати як вакцинацію, так і ревакцинацію.

Метою щеплення є створення антитоксичного імунітету проти дифтерії, наявність якого практично ліквідує небезпеку розвитку важких форм дифтерії та допомагає зменшити захворюваність. Вакцинація відбувається у кабінетах щеплень дільничних поліклінічних закладів (безкоштовно). Також є мережа приватних кабінетів щеплень, де можна вакцинуватися власним коштом [12].

					<b>НУХТ БТЕК 04.02.54 КР ПЗ</b>			
<b>Змн.</b>	<b>Лист.</b>	<b>№ докум.</b>	<b>Підпис</b>	<b>Дата</b>	<b>РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО- ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ</b>	<b>Літ.</b>	<b>Арк.</b>	<b>Аркушіє</b>
Розроб.	Тимофеев Д.Г.						22	85
Перевір.	Пенчук Ю.М.							
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.					<b>Кафедра БТМ</b>		<b>23</b>

На сьогодні відомо кілька поколінь вакцин. До препаратів першого покоління відносять корпускулярні або цільноклітинні вакцини, які поділяються на живі та інактивовані. Препаратами другого покоління є вакцини, які містять окремі фракції збудників або їх продукти. До таких препаратів належать хімічні (компонентні) вакцини. Третє покоління медичних імунобіологічних препаратів становлять рекомбінантні (генноінженерні) вакцини [13].

Анатоксини — це імунобіологічні препарати, які отримують при відповідній обробці екзотоксинів бактерій. Вони позбавлені токсичних властивостей, але зберігають антигенні. Метою їх застосування є індукування в організмі людини імунних реакцій, спрямованих на нейтралізацію токсинів. Найбільш давнім і розповсюдженим методом отримання анатоксинів є обробка токсинів формаліном при певній температурі та експозиції. Такі препарати виявляють стійкість до дії температурного фактора і досить стабільні при зберіганні. У процесі виготовлення вони, значною мірою, очищуються від баластних речовин і адсорбуються на певних хімічних сполуках — адсорбентах (ад'ювантах). Однією з найбільш розповсюджених серед вакцин даної групи є протидифтерійна [13].

Тому, з огляду на вищезазначене, вкрай важливою мірою є профілактика дифтерії, тобто імунізація, що обумовлює потребу в біосинтезі дифтерійного токсину.

За даними інформаційних джерел, загалом в Україні за 2022 рік народилося 195 тисяч дітей [14].

Показник охоплення щепленнями — це один з найважливіших критеріїв відстеження безпеки громадського здоров'я. Цифри відсотків показують скільки дітей отримали свою дозу вакцини згідно з Національним календарем профілактичних щеплень.

Так, за 6 місяців 2022 року з усіх дітей до 1 року лише 33,9% отримали свої дози щеплення проти дифтерії, правця та кашлюку [15].

Приймаємо, що близько 70% дітей було щеплено за весь 2022 рік проти дифтерії:

$$\frac{195\,000 \times 70}{100} = 136\,500 \text{ дітей}$$

Також згідно недавніх відомостей, в Україні з січня по липень 2023 року народилося 96 755 дітей. Приймаємо, що ці діти також будуть щеплені проти дифтерії. Тоді сумарне число дітей для забезпечення вакциною складе:

$$136\ 500 + 96\ 755 = 233\ 255 \text{ дітей}$$

В Україні на фармацевтичному ринку вже представлено вакцини проти дифтерії інших виробників, тому будемо охоплювати вакциною власного виробництва 70% від вищевказаної чисельності дітей:

$$\frac{233\ 255 \times 70}{100} = 163\ 279 \text{ дітей}$$

Згідно інструкції до вакцини Інфанрикс комбінованої для профілактики дифтерії, правця та кашлюку, одна доза (0,5 мл) містить не менше 30 МО дифтерійного анатоксину [16].

За схемою застосування вакцинальних препаратів згідно Національного календаря щеплень, до 1 року дитина отримує 3 ін'єкції вакцини проти дифтерії – у віці 2, 4 та 6 місяців відповідно [13].

Отже, загальна кількість токсину для імунізації 1 дитини віком до 1 року складає:

$$30 \times 3 = 90 \text{ МО}$$

Тоді 163 279 дітей отримають таку кількість дифтерійного токсину в якості імунізації:

$$163\ 279 \times 90 = 14\ 695\ 110$$

Отже, потреба у дифтерійному токсині для щеплення 163 279 дітей в Україні віком до 1 року складає 14 695 110 МО.

### **3.2. Розрахунок потужності виробництва**

Врахуємо, що будемо напрацьовувати серії вакцини для експорту з метою забезпечення закордонних ринків вакциною власного виробництва. Тоді збільшуємо потребу у токсині втричі:

$$14\ 695\ 110 \times 3 = 44\ 085\ 330 \text{ МО}$$

Обраний біологічний агент *C. diphtheriae* PW8 утворює 200 МО/мл (200000 МО/л) дифтерійного токсину [17]. Тоді необхідна кількість культуральної рідини для напрацювання 44 085 330 МО токсину складає:

$$\begin{aligned}200\ 000\ \text{МО} &- 1\ \text{л} \\44\ 085\ 330\ \text{МО} &- x \\x &= 220,4\ \text{л}\end{aligned}$$

Із врахуванням втрат токсину при виробництві 40 % необхідно культуральної рідини:

$$V_{\text{КР}} = 220,4 \times 1,4 \approx 309\ \text{л}$$

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

Для забезпечення річної потреби у дифтерійному токсині (згідно п.1.2) потрібно отримати (з урахуванням втрат під час виділення) 309 л культуральної рідини.

Розрахуємо, скільки культуральної рідини потрібно отримати за цикл ферментації, щоб розрахувати кількість стадій приготування посівного матеріалу [18]. Приймаємо кількість трудоднів – 30, тоді об'єм культуральної рідини за добу становить:

$$V_{\text{д}} = V_{\text{гп}} / T_{\text{тр}} = 309/30 = 10,3\ \text{л}$$

Кількість продукту за цикл буде становити:

$$V_{\text{цк}} = (K_1 \times V_{\text{д}} \times T_{\text{цф}}) / 24 = (1,1 \times 10,3 \times 54) / 24 = 25\ \text{л/цикл},$$

де  $T_{\text{цф}}$  – цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу (48 год) та час підготовки ферментера до роботи (6 год).  $K_1$  – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій ( $K_1 = 1,1 - 1,5$ ).

Підготовка ферментера включає: мийка та огляд – 1,5 год, перевірка на герметичність – 0,5 год, підігрів та стерилізація апарату – 1,5 год, охолодження ферментера – 0,5 год, завантаження поживного середовища – 1,5 год, засів культурою – 0,5 год.

Визначивши об'єм КР за один цикл і знаючи коефіцієнт заповнення  $K_3$ , визначаємо геометричний об'єм ферментера:

$$V_{\Gamma} = V_{\text{крц}}/K_{\text{зап}} = 25/0,5 = 50 \text{ л,}$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_3 = 3/5 = 0,6 - \text{не перевищує заданого значення [18].}$$

### 3.4. Розрахунок кількості стадій отримання посівного матеріалу

За один виробничий цикл отримують 25 л культуральної рідини (див. п.1.3). При одержанні культуральної рідини потрібно врахувати її втрати в результаті краплиносу через колектор відпрацьованого повітря ( $E_{\phi}$ ), які становлять від 10 - 15%.

З урахуванням покриття 10% втрат об'єм поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом має становити:

$$V_{\text{роб.1}} = V_{\text{кр}} \times (1 + E_{\phi}) = 25 \times 1,1 = 27,5 \text{ л,}$$

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

Отже, робочий об'єм ферментера дорівнює 27,5 л. За вибраного коефіцієнта заповнення 0,5 геометричний об'єм ферментера становить:  $V_{\phi} = 27,5 / 0,5 = 55 \text{ л}$ . Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер  $V_{\text{ст1}} = 50 \text{ л}$ .

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:  $K_{31} = 27,5/50 = 0,55$ . Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах для аеробних процесів (0,55-0,65), отже геометричний об'єм ферментера обрано правильно.

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить 10 % від об'єму поживного середовища.

Для засіву  $V_{\text{роб.1}} = 27,5 \text{ л}$  середовища необхідно приготувати

$$V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб.1}} \times X_{\phi} = 27,5 \times 0,1 = 2,75 \text{ л посівного матеріалу,}$$

де  $X_{\phi} = 0,1$  – доза посівного матеріалу для ферментера.

Тоді об'єм поживного середовища в ферментері буде становити:

$$V_{\text{пс1}} = V_{\text{роб.1}} - V_{\text{пм1}} = 27,5 - 2,75 = 24,75 \text{ л,}$$

Одержання посівного матеріалу  $V_{\text{пм1}} = 2,75 \text{ л}$  для засіву ферментера можна провести вирощуванням біологічного агента у колбах на качалці. Для цього використовують качалочні колби об'ємом  $V_{\text{колб}} = 750 \text{ мл}$  з коефіцієнтом заповнення  $K_{3к} = 0,2$ .

Тоді кількість колб становить:

$$N_{\text{колб}} = V_{\text{пм4}} / (V_{\text{колб}} * K_{\text{зк}}) = 2750 / (750 * 0,2) = 18 \text{ колб}$$

Отже, для виробничого синтезу дифтерійного токсину *C. diphtheriae* PW8 для одержання вакцини встановлюють ферментер на 50 л з коефіцієнтом заповнення 0,5 та передбачають наявність 18 качалочних колб.

Таблиця 3.1

Об'єми середовищ та апаратів для стадії підготовки посівного матеріалу та виробничого синтезу дифтерійного токсину

№ стадії	Об'єм культуральної рідини $V_{\text{кр}}$ , л	Об'єм культуральної рідини $V_{\text{роб.}}$ , л	Об'єм посівного матеріалу, $V_{\text{пм}}$ , л	Об'єм поживного середовища, $V_{\text{пс}}$ , л	Коефіцієнт заповнення, $K_{\text{зап}}$ , частка	Геометричний об'єм ферментера, $V_{\text{ст}}$ , л
1	2	3	4	5	6	7
1.	25	27,5	2,75	24,75	0,55	50
2.	2,75	2,75	-	2,75	0,2	18 колб

## РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

### 4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента

У якості джерела вуглецю *C. diphtheriae* використовує мальтозу. Скориставшись базою даних KEGG можемо знайти схему катаболізму ростового субстрату (рис. 4.1) [45].

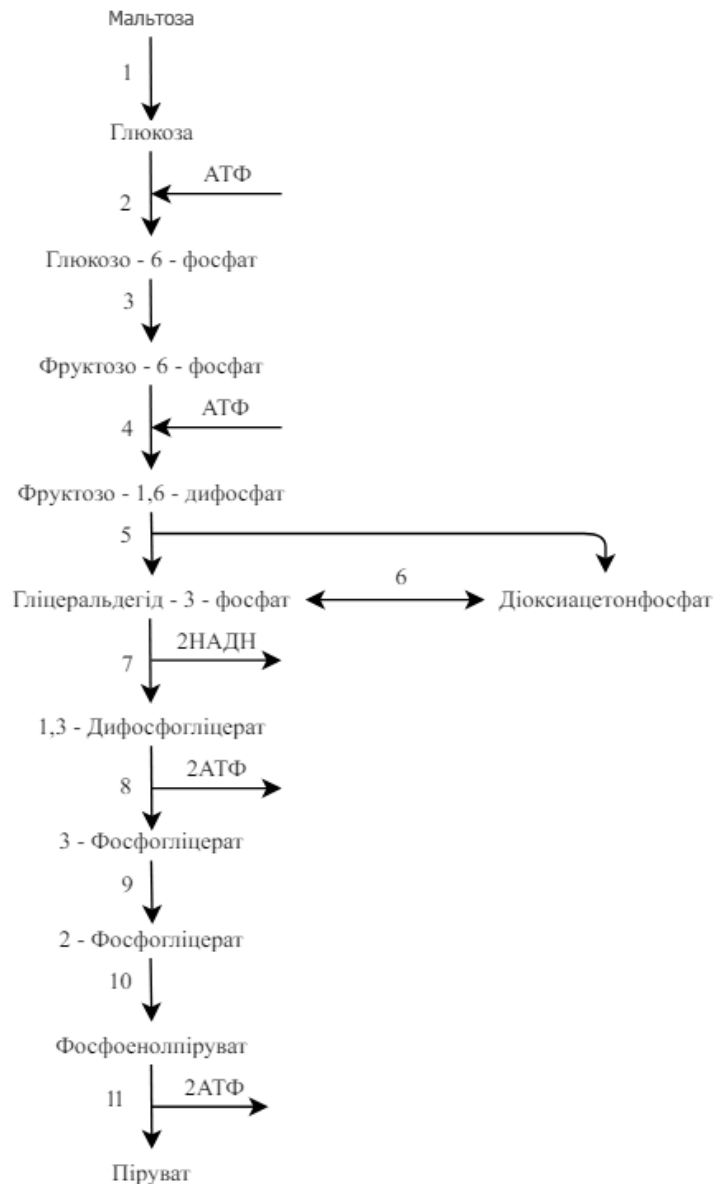


Рис. 4.1. Катаболізм мальтози

					<b>НУХТ БТЕК 04.02.54 КР ПЗ</b>			
Змн.	Лист.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Тимофеев Д.Г.			<b>РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ</b>	Літ.	Арк.	Аркуші
Перевір.		Пенчук Ю.М.					28	85
Реценз.						<b>Кафедра БТМ</b>		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						
					<b>29</b>			

Перелік ферментів: 1 – мальтаза (КФ 3.2.1.20); 2 - гексокіназа (КФ 2.7.1); 3 - глюкозофосфатізомераза (КФ 5.3.1.9); 4 - фосфофруктокіназа (КФ 2.7.1.11); 5 - фруктозодифосфатальдолаза (КФ 4.1.2.13); 6 - триозофосфатізомераза (КФ 5.3.1.1); 7 - гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12); 8 - фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3); 9 - фосфогліцератмутаза (КФ 5.4.2.12); 10 - енолаза (КФ 4.2.1.11); 11 - піруваткіназа (КФ 2.7.1.40);

В результаті гліколізу утворюється піруват, який у подальшому переходить до циклу трикарбонових кислот.

#### **4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт**

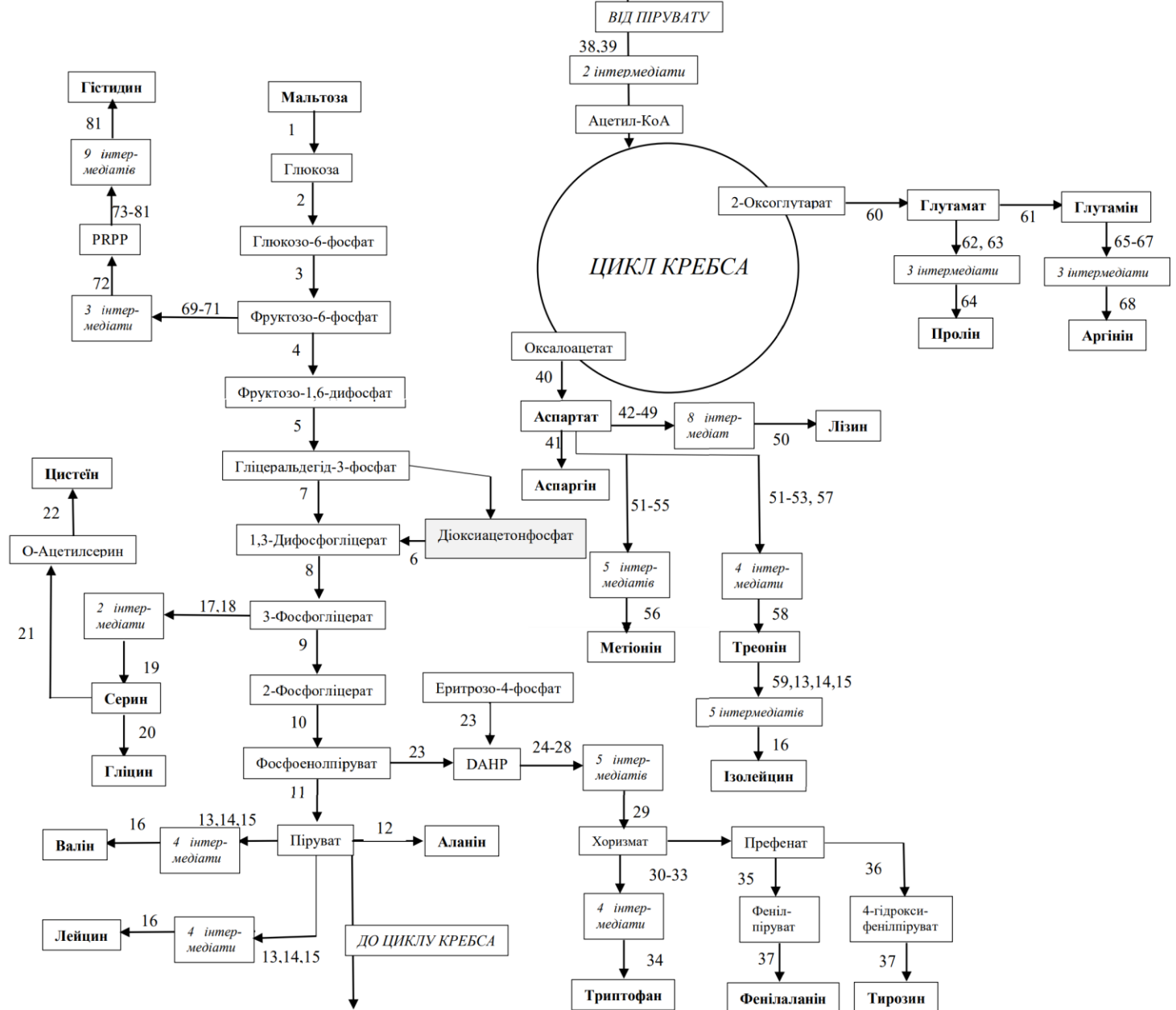
Дифтерійний токсин є білком, отже схему біосинтезу амінокислот у *C. diphtheriae* PW8 на ростовому субстраті мальтоза наведено на рис. 4.2.

Перелік ферментів: 1 – мальтаза (КФ 3.2.1.20); 2 - гексокіназа (КФ 2.7.1); 3 - глюкозофосфатізомераза (КФ 5.3.1.9); 4 - фосфофруктокіназа (КФ 2.7.1.11); 5 - фруктозодифосфатальдолаза (КФ 4.1.2.13); 6 - триозофосфатізомераза (КФ 5.3.1.1); 7 - гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12); 8 - фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3); 9 - фосфогліцератмутаза (КФ 5.4.2.12); 10 - енолаза (КФ 4.2.1.11); 11 - піруваткіназа (КФ 2.7.1.40); 12 - аланінсинтезуюча трансаміназа (КФ 2.6.1.2); 13 – ацетолактатсинтаза (КФ 2.2.1.6); 14 - кетол-кисла редуктоізомераза (КФ 1.1.1.86); 15 - дигідроксикисла дегідратаза (КФ 4.2.1.9); 16 - амінотрансфераза амінокислот з розгалуженим ланцюгом (КФ 2.6.1.42); 17 - D-3-фосфогліцератдегідрогеназа / 2-оксоглутаратредуктаза (КФ 1.1.1.95); 18 - фосфосерину амінотрансфераза (КФ 2.6.1.52); 19 – фосфосеринфосфатаза (КФ 3.1.3.3); 20 – серингідроксиметилтрансфераза (КФ 2.1.2.1); 21 - серинацетилтрансфераза (КФ 2.3.1.30); 22 - цистеїнсинтаза (КФ 2.5.1.47); 23 - фосфо-2-дегідро-3-дезоксигептонатаьдолаза (КФ 2.5.1.54); 24 - 3-дегідрохінатсинтаза (КФ 4.2.3.4); 25 - 3-дегідрохінатдегідратаза (КФ 4.2.1.10); 26 - шикімааткіназа (КФ 2.7.1.71); 27 - (КФ ); 28 - 3-фосфошикімаат-1-карбоксивінілтрансфераза (КФ 2.5.1.19); 29 - хоризматсинтаза (КФ 4.2.3.5); 30 - компонент I антранілатсинтази (КФ 4.1.3.27); 31 - антранілатфосфорибозилтрансфераза (КФ 2.4.2.18); 32 - фосфорибозил-ізомераза A (КФ 5.3.1.16); 33 - індол-3-гліцеролфосфатсинтаза (КФ 4.1.1.48); 34 - бета-

субодиниця триптофансинтази (КФ 4.2.1.20); 35 - префенатдегідратаза (КФ 4.2.1.51); 36 - Префенатдегідрогеназа (КФ 1.3.1.12); 37 - передбачувана амінотрансфераза (КФ 2.6.1.9); 38 - субодиниця E1 піруватдегідрогенази (КФ 1.2.4.1); 39 - дигідроліпоамід ацетилтрансфераза (КФ 2.3.1.12); 40 - Аспартатамінотрансфераза (КФ 2.6.1.1); 41 - передбачувана аспарагінсинтетаза (КФ 6.3.5.4); 42 - аспартатакіназа (КФ 2.7.2.4); 43 - аспартат-напівальдегіддегідрогеназа (КФ 1.2.1.11); 44 - передбачуваний білок біосинтезу лізину (КФ 4.3.3.7); 45 - дигідродипіколінатредуктази (КФ 1.17.1.8); 46 - 2,3,4,5-тетрагідропіридин-2-карбоксилат N-сукцинілтрансфераза (КФ 2.3.1.117); 47 - ацетилорнітинамінотрансфераза (КФ 2.6.1.11); 48 - сукцинілдіамінопімелатдесукцинілаза (КФ 3.5.1.18); 49 - Діамінопімелат епімераза (КФ 5.1.1.7); 50 - діамінопімелатдекарбоксилаза (КФ 4.1.1.20); 51 - аспартатакіназа (КФ 2.7.2.4); 52 - аспартат-напівальдегіддегідрогеназа (КФ 1.2.1.11); 53 - Гомосериндегідрогеназа (КФ 1.1.1.3); 54 - гомосерин O-ацетилтрансфераза (КФ 2.3.1.31); 55 - O-ацетилгомосеринамінокарбоксіпропілтрансфераза (КФ 2.5.1.49); 56 - 5-метилтетрагідрофолат-гомоцистеїн метилтрансфераза (КФ 2.1.1.13); 57 - гомосеринкіназа (КФ 2.7.1.39); 58 - треонінсинтаза (КФ 4.2.3.1); 59 - треоніндегідратаза (КФ 4.3.1.19); 60 - глутаматдегідрогеназа (КФ 1.4.1.4); 61 - глутамінсинтетаза I (КФ 6.3.1.2); 62 - гамма-глутамілкіназа (КФ 2.7.2.11); 63 - гамма-глутамілфосфатредуктаза (КФ 1.2.1.41); 64 - піролін-5-карбоксилатредуктаза (КФ 1.5.1.2); 65 - велика субодиниця карбамоїлфосфатсинтази (КФ 6.3.5.5); 66 - орнітинкарбамоїлтрансфераза (КФ 2.1.3.3); 67 - аргініносукцинатсинтаза (КФ 6.3.4.5); 68 - аргініносукцинатліаза (КФ 4.3.2.1); 69 - транскетолаза (КФ 2.2.1.1); 70 - рибулозофосфат-3-епімераза (КФ 5.1.3.1); 71 - рибозо-5-фосфат-ізомераза (КФ 5.3.1.6); 72 - рибозо-фосфат-пірофосфокіназа (КФ 2.7.6.1); 73 - АТФ-фосфорибозилтрансфераза (КФ 2.4.2.17); 74 - фосфорибозил-АТФ-пірофосфатаза (КФ 3.6.1.31); 75 - фосфорибозил-АМФ циклогідролаза (КФ 3.5.4.19); 76 - фосфорибозил-ізомераза А (КФ 5.3.1.24); 77 - субодиниця імідазолгліцеролфосфатсинтази HisF (КФ 4.3.2.10); 78 - імідазолегліцеринфосфатдегідратаза (КФ 4.2.1.19); 79 - передбачувана амінотрансфераза (КФ 2.6.1.9);

80 - гістидином фосфат фосфатаза (КФ 3.1.3.15); 81 - гістидиномдегідрогеназа (КФ 1.1.1.23);

Рисунок 4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт



## РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

### 5.1 Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

*C. diphtheriae* – бактерія, що росте в мезофільному температурному діапазоні (25-45°C), в лабораторії вирощується за 37°C, і є нейтрофілом (оптимум рН 7.5 ± 0.5) [19]. Це означає, що існує ризик контамінації сторонніми мезофільними та нейтрофільними мікроорганізмами, що зумовлює необхідність у асептичних умовах під час біосинтезу. Асептичні умови забезпечуються стерилізацією обладнання, поживного середовища, аераційного повітря, піногасника.

Для запобігання контамінації культивування *C. diphtheriae* PW8 найчастіше проводять у ферментері глибинним способом, з подачею стерильного повітря, оскільки *C. diphtheriae* хоч і є факультативним аеробом, проте потребує кисню для синтезу токсину

Вирощування *C. diphtheriae* PW8 можна провести «традиційним», стаціонарний методом культивування на колбах качалках, але такий метод є доволі трудомістким та небезпечним з точки зору стерильності. Як правило, під час такого культивування спостерігається низький вихід ПАР (дифтерійного токсину). Крім того, цей тип культури не є економічним. Ці проблеми можна подолати шляхом застосування методу глибинного культивування у ферментерах [4].

Дослідження «*Process Optimization for Enhanced Production of Diphtheria Toxin by Submerged Cultivation*» [4] показує, що після оптимізації джерела вуглецю, культивуванні і синтезу токсину провели порівняння культур у колбах на качалках та культуру у ферментері. Ріст і вироблення токсину були значно вищими у культурі у ферментері (180 Lf, або 12.6 г/л), ніж у колбах (80 Lf, або 5.6 г/л). Склад поживного середовища був однаковий для обох культур.

					<b>НУХТ БТЕК 04.02.54 КР ПЗ</b>			
<b>Змн.</b>	<b>Лист.</b>	<b>№ докум.</b>	<b>Підпис</b>	<b>Дата</b>	<b>РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ</b>	<b>Літ.</b>	<b>Арк.</b>	<b>Аркушіє</b>
Розроб.	Тимофеев Д.Г.						33	85
Перевір.	Пенчук Ю.М.					<b>Кафедра БТМ</b>		
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.				<b>34</b>			

Отже, якщо підсумувати усе написане вище одним реченням: культивування *C. diphtheriae* PW8, з метою отримати дифтерійний токсин, здійснюється глибинним способом у ферментері в аеробних умовах із забезпеченням асептики проведення процесу, тому що використовуючи такий спосіб ми оптимізуємо процес біосинтезу і отримуємо найбільшу кількість продукту.

Беручи в увагу спосіб культивування та фізіолого-біохімічними особливостями продуцента, обираємо необхідне оснащення ферментера, яке б забезпечило створення даних умов.

1. Аерація є дуже важливим параметром при культивації *C. diphtheriae*, оскільки від подачі правильного об'єму повітря залежить експресія токсину. При культивації стерильне повітря проходить через регулятор тиску, витратомір та знімний фільтр. Інтенсивність аерації може різнитись у залежності від культурного середовища. Так, при культивації на казеїновому середовищі аерація складала 0.7 – 1.5 л/хв [5], коли при культивації на середовищі розчиненого коров'ячого мускула аерація становила 3-4 л/хв [4]. Оскільки останнє середовище є більш економічно вигідним – зупинимось на значенні в 3-4 л/хв.

2. Для покращення масообмінних процесів та гомогенізації культури використовується мішалка з частотою 200 об/хв.

Перемішування здійснюється трьома шестилопатевими дисками, зверху, посередині та знизу посудини [4, 5].

3. Для підтримання сталої температури 35°C під час культивування ферментер має систему водної рециркуляції обладнану насосом і занурюваний нагрівач [4].

4. Для запобігання піноутворенню під час культивації використовується силіконовий піногасник [4, 5].

5. рН середовища для виробництва токсину підтримували на рівні 7.1 за допомогою фосфатного буферу.

## **5.2. Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря**

Аерація є дуже важливим параметром при культивування *Corynebacterium diphtheriae*, оскільки від подачі правильного об'єму повітря залежить експресія токсину. При культивації стерильне повітря проходить через регулятор тиску,

витратомір та знімний фільтр. Інтенсивність аерації може різнитись у залежності від культурного середовища. Так, при культивації на казеїновому середовищі аерація складала 0.7 – 1.5 л/хв [20], коли при культивації на іншому поживному середовищі режим аерації встановлювали на рівні 3-4 л/хв [21]. Оскільки останнє середовище є більш економічно вигідним – зупинимось на значенні в 3-4 л/хв.

Для одержання очищеного повітря для аерації використовують наступну схему підготовки.

Кількість мікроорганізмів в атмосферному повітрі знижується зі збільшенням висоти над рівнем землі; мікробна забрудненість повітря у вологих районах або районах із сильними вітрами й сипучими ґрунтами є значно вищою [22].

Тому систему повітрепідготовки потрібно планувати таким чином, щоб забір повітря здійснювався на висоті до 3 м від найвищої точки будівлі підприємства [18]. Зважаючи на обсяги ферментаційного обладнання, припускаємо, що забір повітря буде організовано на висоті 15 м.

Після цього проводять очищення повітря від грубих механічних частинок, направляючи повітря до фільтрів грубої очистки. Потім для стиснення повітря його подають на компресори [18]. Для стиснення й нагнітання повітря застосовують поршневі компресори чи турбокомпресори. Поршневі компресори володіють високим коефіцієнтом корисної дії (ККД), легкі в експлуатації, однак малопродуктивні та забруднюють мастилом повітря. На відміну від цього, турбокомпресори забезпечують стиснення повітря під впливом відцентрових сил. Таке обладнання складніше в обслуговуванні, але високопродуктивне та забезпечує відсутність мастила у повітрі [22]. Стиснення повітря зумовлює значне підвищення температури, через це після компресора повітря надходить у теплообмінник. В цьому апараті повітря охолоджується з утворенням конденсату, який відводиться.

Перед фільтрами встановлюється ресивер, що призначений для вирівнювання тиску в системі, рівномірного подавання повітря на наступні фільтри, усунення залишку конденсату та мастила [13, 14].

Після ресивера повітря підігривають до наближеної для культивування біологічного агента температури шляхом подачі у теплообмінник-нагрівач. Нагріте

повітря прямує спочатку до головного фільтра для досягнення очищення 95%, а потім до індивідуального фільтра, який встановлений перед ферментаційною ємністю. На цьому етапі рівень очистки повітря досягає 99,99% [18].

Щодо фільтрів, які використовуються на кожному етапі приготування повітря, то в якості фільтруючих матеріалів у фільтрах попереднього очищення використовують багатошарові дротяні сітки, набивні фільтри з металевої стружки, полімерних волокон або грубих мінеральних та синтетичних матеріалів. Широке поширення набули волокнисті матеріали для головних фільтрів. Такі матеріали є фільтрами об'ємної дії, адже розраховані на вловлювання та накопичення часток забруднень по всій глибині шару. Зокрема, це базальтові волокна, матеріали поліамідної, поліефірної, віскозної, металевої природи та їх комбінації. Для виготовлення індивідуальних фільтрів використовують такі речовини як базальтове супертонке волокно, скло, хлопкоасбест, сополімери вінілхлориду і акрилонітрилу [22].

### **5.3. Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища**

Для отримання посівного матеріалу та виробничого біосинтезу дифтерійного токсину *Corynebacterium diphtheriae* PW8 використовується середовище такого складу (г/л) [23]:

- 1) м'ясо яловичини - 143
- 2) папайн – 1,144
- 3) дріжджовий екстракт – 0,15
- 4) мальтоза – 20
- 5) натрію лактат - 0,6
- 6)  $MgSO_4 \times 7H_2O$  – 0,3
- 7) нікотинова кислота - 0,0021
- 8) бета-аланін - 0,0021
- 9) пімелінова кислота - 0,00014
- 10)  $MnCl_2 \times 4H_2O$  - 0,00028
- 11)  $ZnSO_4 \times 7H_2O$  - 0,00074

12)  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  - 0,00093

Виробничий біосинтез здійснюється у ферментері об'ємом 50 л з коефіцієнтом заповнення 0,5. Підготовка посівного матеріалу відбувається в колбах на качалці. Стерилізація поживного середовища для вирощування в колбах здійснюється у автоклаві, через невеликий об'єм – 2,75 л.

### 5.3.1 Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках

Проаналізувавши склад поживного середовища для вирощування *C. diphtheriae* PW8, умовно ділимо його на 4 композиції, залежно від режиму стерилізації компонентів:

**Композиція А:** розщеплене папаїном м'ясо яловичини (м'ясо яловичини+папаїн) (120°C, 20 хв);

**Композиція Б:** дріжджовий екстракт, натрію лактат, мальтоза (112°C, 20 хв);

**Композиція В:**  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  (130°C, 40 хв);

**Композиція Г:** нікотинова кислота, бета-аланін, пімелінова кислота (стерилізуюча фільтрація через фільтр з розміром пор 0,22 мкм).

У даному поживному середовищі наявне м'ясо яловичини, яке необхідно попередньо обробити ферментом папаїном. Підготовку яловичини здійснюють наступним чином.

Лабораторна методика: необхідну кількість подрібненого яловичого м'яса суспендують у стерильній воді (1:7 мас./об.) разом з папаїном з розрахунку 8 г ферменту на 1 кг м'яса. Загальну кількість ферменту папаїну зважують, подрібнюють в порошок і суспендують в 700 мл дистильованої води. Потім 100 мл цієї суміші додають до яловичини з 30-хвилинними інтервалами. Розщеплення проводять в контрольованих умовах температури (50°C ± 1°C) і рН (7,1±0,1). Тривалість процесу становить близько 3,5 години при постійному перемішуванні. Для підтримки рН 7,0-7,2 використовують розчин натрію гідроксиду (12,%). Після завершення додають концентровану соляну кислоту, щоб знизити рН до 5,1, і суміш кип'ятять протягом 10 хв. Додають крижану оцтову кислоту, щоб знизити рН до 4,1,

отриману суміш фільтрують за допомогою тканинного фільтра. Отриманий бульйон можна зберігати при 2-8°C близько 4 тижнів без істотної втрати якості [20].

Таблиця 5.1

**Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці**

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента в 2,75 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
М'ясо яловичини	143	393,25	<b>А</b>	1
Папаїн	1,144	3,15		
<b>Вода</b>		<b>0,8 л</b>		
Дріжджовий екстракт	0,15	0,41	<b>Б</b>	1
Натрію лактат	0,6	1,65		
Мальтоза	20	55		
<b>Вода</b>		<b>1 л</b>		
MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	0,3	0,82	<b>В</b>	0,25
MnCl <sub>2</sub> ×4H <sub>2</sub> O	0,00028	0,0007		
ZnSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	0,00074	0,002		
CuSO <sub>4</sub> ×5H <sub>2</sub> O	0,00093	0,002		
<b>Вода</b>		<b>0,25 л</b>		
Нікотинова кислота	0,0021	0,005	<b>Г</b>	0,5
Бета-аланін	0,0021	0,005		
Пімелінова кислота	0,00014	0,0004		
<b>Вода</b>		<b>0,5</b>		
<b>Разом:</b>		<b>2,75</b>		<b>2,75</b>

Приготування та стерилізація бульйону розщепленої ензимом яловичини проходить окремо від інших компонентів при відповідному режимі. Солі (композиція В) стерилізують у стандартному режимі для солей. Для дріжджового екстракту, натрію лактату та мальтози – м'які умови стерилізації, оскільки такі

компоненти можуть розкладатись за високих температур. Композицію Г складають компоненти, що потребують «холодної стерилізації», адже є вкрай термолабільним; процес стерилізації проходить з використанням лабораторної установки фільтрації на мембранному фільтрі 0,22 мкм.

Композицію А готують та стерилізують в колбі на 3 л, композицію Б – у колбі обсягом 2 л, для підготовки композицій В та Г використовують колби на 0,5 л відповідно.

### **5.3.2. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу**

Умовний поділ поживного середовища на 4 композиції здійснюється аналогічно до розподілу для вирощування інокуляту в колбах:

**Композиція А:** розщеплене папаїном м'ясо яловичини (м'ясо яловичини+папаїн) (120°C, 20 хв);

**Композиція Б:** дріжджовий екстракт, натрію лактат, мальтоза (112°C, 20 хв);

**Композиція В:**  $MgSO_4 \times 7H_2O$ ,  $MnCl_2 \times 4H_2O$ ,  $ZnSO_4 \times 7H_2O$ ,  $CuSO_4 \times 5H_2O$  (130°C, 40 хв);

**Композиція Г:** нікотинова кислота, бета-аланін, пімелінова кислота (стерилізуюча фільтрація через фільтр з розміром пор 0,22 мкм).

Приготування та стерилізація бульйону розщепленої ензимом яловичини проходить окремо від інших компонентів при відповідному режимі. Солі (композиція В) стерилізують у стандартному режимі для солей. Для дріжджового екстракту, натрію лактату та мальтози – м'які умови стерилізації, оскільки такі компоненти можуть розкладатись за високих температур. Композицію Г складають компоненти, що потребують «холодної стерилізації», адже є вкрай термолабільними; процес стерилізації проходить з використанням лабораторної установки фільтрації на мембранному фільтрі 0,22 мкм.

**Склад композицій для приготування середовища для виробничого синтезу  
у ферментері 50 л**

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента в 24,75 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
М'ясо яловичини	143	3 539,2 (3,53 кг)	<b>А</b>	8
Папаїн	1,144	28,3		
Конденсат		0,8 л		
Вода		3,6 л		
<b>Разом</b>		<b>8 л</b>		
Дріжджовий екстракт	0,15	3,71	<b>Б</b>	1
Натрію лактат	0,6	14,85		
Мальтоза	20	495		
Вода		1 л		
MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	0,3	7,4	<b>В</b>	15,25
MnCl <sub>2</sub> ×4H <sub>2</sub> O	0,00028	0,007		
ZnSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	0,00074	0,018		
CuSO <sub>4</sub> ×5H <sub>2</sub> O	0,00093	0,023		
Конденсат		1,52 л		
Вода		13,7 л		
<b>Разом</b>		<b>15,25 л</b>		
Нікотинова кислота	0,0021	0,052	<b>Г</b>	0,5
Бета-аланін	0,0021	0,052		
Пімелінова кислота	0,00014	0,003		
Вода		0,5		
<b>Разом:</b>		<b>24,75</b>		

Приготування та стерилізація бульйону розщепленої ензимом яловичини проходить окремо від інших компонентів при відповідному режимі. Солі (композиція В) стерилізують у стандартному режимі для солей. Для дріжджового

екстракту, натрію лактату та мальтози – м'які умови стерилізації, оскільки такі компоненти можуть розкладатись за високих температур. Композицію Г складають компоненти, що потребують «холодної стерилізації», адже є вкрай термолабільними; процес стерилізації проходить з використанням лабораторної установки фільтрації на мембранному фільтрі 0,22 мкм.

Композицію А готують та стерилізують в реакторі на 20 л, композицію Б – у колбі обсягом 2 л. Складові композиції В розчиняють та стерилізують безпосередньо у ферментері 50 л, для підготовки композиції Г слід передбачити колбу на 0,5 л відповідно.

Вищевказані дані про лабораторний посуд та необхідне обладнання узагальнено в таблиці 5.3.

*Таблиця 5.3*

**Посуд та обладнання для підготовки композицій поживного середовища**

Композиція	Колби на качалці	Ферментер 50 л
А	Колба 3 л	Реактор 20 л
Б	Колба 2 л	Колба 2 л
В	Колба 0,5 л	Ферментер 50 л
Г	Колба 0,5 л	Колба 0,5 л

**5.4. Обґрунтування вибору піногасника**

Для покращення масообмінних процесів та гомогенізації культури використовується мішалка з частотою 200 об/хв. Перемішування здійснюється трьома шестилопатевими дисками, зверху, посередині та знизу посудини [12].

При такому режимі перемішування поживного середовища, враховуючи його склад, може спостерігатись утворення піни. У статтях [12] вказано, що для запобігання піноутворенню під час культивування використовувався силіконовий піногасник.

Для пінорегулювання та запобігання викидів піни із біотехнологічної апаратури існує багато способів і засобів, вибір яких залежить від природи мікроорганізмів,

фізико-хімічних властивостей середовища та гідродинамічних умов ведення процесу. Застосування хімічного піногасіння обмежується впливом хімічної речовини, що є піногасником, на властивості та якість основного продукту процесу ферментації. У виробництві деяких препаратів застосування хімічних піногасників неможливе [25].

Використання хімічних піногасників призводить до проблем, пов'язаних з їх побічною дією і дотримання стерильності [20]. Також хімічні піногасники мають суттєвий недолік, адже при їх утилізації мікробними клітинами, вони самі по собі можуть спричинити піноутворення [26].

Альтернативою є використання механічних піногасників. Основним вузлом будь-якого механічного піногасника є ротор, що обертається з великою швидкістю, який виконаний у вигляді диска або конусів з лопатями. Всі механічні піногасники можна розділити на дві групи: ударно-зсувного впливу на піну та відцентрово-фільтраційної впливу на піну. У першому випадку піна руйнується від ударів і зсувних деформацій, викликаних обертовими дисками, лопатями, а також струменями і краплями рідини, що розбризкуються обертовим ротором. У другому випадку поділ (сушка) піни відбувається за рахунок фільтрації рідини (синерезису) в полі відцентрових сил [25].

Оскільки механічний піногасник встановлюється безпосередньо у ферментаційне обладнання, не спричиняє побічних ефектів, не зумовлює порушення умов асептики, слід обрати саме механічний спосіб для усунення піни, що може утворюватись при культивуванні продуцента дифтерійного токсину.

### **5.5. Обґрунтування вибору речовин для регуляції рН**

Значення рН середовища для виробництва токсину необхідно підтримувати на рівні 7,1. Тому потрібно передбачити підготовку агентів для регулювання рН середовища. В якості підкислюючого агенту обираємо 6% розчин соляної кислоти. Для зміщення рН середовища в лужний бік оберемо 6% розчин натрію гідроксиду. При цьому нормою подачі цих розчинів є 2 мл на 1 л поживного середовища.

Тому для приблизно 25 л поживного середовища необхідно по  $2 \times 25 = 50$  мл кожного титрувального розчину.

Підготовку розчинів слід здійснювати у колбах по 100 мл. Розчин луку необхідно стерилізувати за підходячого для солей режиму, а розчин кислоти стерилізації не підлягає.

Таким чином, для отримання дифтерійного токсину необхідно провести такі додаткові стадії:

- 1) підготовка та стерилізація композицій поживного середовища;
- 2) підготовка 6%-го розчину HCl;
- 3) підготовка та стерилізація 6%-го розчину NaOH;

При цьому необхідним обладнанням є реактор 20 л для приготування і стерилізації композиції А для ферментера.

## **5.6. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів**

Оброблюваний об'єкт – стіни, підлога.

Підлогу та стіни миють пролонгованими засобами 1 раз на тиждень.

Для дезінфекції стін і підлоги в харчовому виробництві підходять такі засоби як “ЛЕГІОН САНІТАЙЗЕР”, “Divosan Extra VT55”, “ITS WATER DEZ-300”, “PuroTech Пентасол 234”, “Sviteco-PIP Interior Cleaner”, “ОНІКО «ДЕЗОХЛОРИН”.

### **Способи дезінфекції:**

- **Занурення у розчин**

занурюванням у робочий розчин дезінфекційного засобу посуду, білизни, іграшок, виробів медичного призначення, предметів догляду за хворими, інвентарю, дрібної тари тощо

- **Засипання сухим засобом**

засипанням залишків їжі, виділень, сміттєзбірників, ґрунту тощо дезінфекційними засобами, які виробляють у формі порошку, гранул;

- **Зрошення поверхні**

Особливості дезінфекції шляхом зрошення:

До дезінфекції шляхом зрошення вдаються при необхідності обробки великої площі, наприклад, цілого приміщення або навпаки, маленьких і важкодоступних поверхонь. Сутність цього способу знезараження полягає в тому, що розчин дезінфекційних засобів за допомогою спеціальних пристосувань (гідропультів і

розпилювачів рідини) розпорошується до аерозолю, який покриває оброблювані об'єкти.

Варто відзначити, що при використанні деззасобів способом зрошення відбувається подразнення верхніх дихальних шляхів і очей. Тому дезінфекція обов'язково повинна проводитися з використанням засобів індивідуального захисту: респіраторів, окулярів, рукавичок і спецодягу.

З огляду на подразнюючий вплив деззасобів, обробку шляхом зрошення в приміщенні проводять виключно у відсутності людей. Після закінчення часу витримки в приміщенні проводять вологе прибирання з метою видалення залишків деззасобів з поверхонь.

- **Протирання**

Особливості дезінфекції шляхом протирання:

Дезінфекція шляхом протирання є протирання поверхонь ганчір'ям, змоченим в робочий розчин деззасоби. Таким спосіб знезаражують:

Поверхні приміщення (підлога, стіни, стелі, двері);

Поверхні меблів;

Сантехнічне обладнання;

Професійну техніку, обладнання, прилади.

Дезінфекція шляхом протирання проводиться з використанням різних дезінфікуючих засобів. Так, робочі розчини дезінфікуючих засобів готують з рідких і твердих концентратів. А використання комбінованих деззасобів, до складу яких додатково входять миючі компоненти дозволяє поєднати в одному процесі дезінфекцію і миття поверхонь.

Крім того, для знезараження невеликих або важкодоступних поверхонь можуть використовуватися готові до застосування засоби для експрес-дезінфекції. Такі поверхні можна дезінфікувати шляхом протирання ганчір'ям, зрошеної аерозольним засобом для експрес-дезінфекції або спиртовими серветками.

### **Аерозольне розпилення**

#### **Сучасні вимоги до дезінфікуючих засобів**

Дані засоби повинні бути:

- Добре розчинними у воді;
- Легко і повністю змиватись при споліскуванні;
- Не мати стійкого запаху і бути безбарвними;
- Не володіти агресивною дією щодо матеріалів, з яких виготовлені доїльне обладнання та молочний інвентар;
- Володіти слабкою корозійною активністю;
- Бути стійкими при зберіганні;
- Не знижувати активності протягом тривалого часу;
- Бути пожежо- і вибухобезпечними;
- Бути безпечними для довкілля та повністю розпадатися на нешкідливі сполуки;
- Мати широкий спектр протимікробної активності;
- Діяти бактерицидно щодо патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів в присутності органічних речовин, солей твердості і мікроорганізмів в біоплівках;
- Не володіти подразнюючою дією на шкіру рук;
- За токсикологічною характеристикою бути нетоксичними або малотоксичними [46].

Миючі та дезінфікуючі засоби повинні відповідати таким вимогам:

- виражені миючі властивості (миюча здатність не менше 90,0%);
- виражена дезінфікуюча здатність (не менше 90,0%);
- повне змочування поверхонь із різних конструктивних матеріалів;
- низька агресивність по відношенню до конструктивних матеріалів, призначених для виготовлення технологічного обладнання, комунікацій, інвентаря;
- повне змивання з робочих поверхонь об'єктів підприємства при мінімальних втратах води вироблюваної продукції.

Для стерилізації стін та підлоги приміщень обираємо деззасіб “ЛЕГІОН САНІТАЙЗЕР” (діюча речовина, мас., %: 25,0 - полігексаметиленгуанідину гідро хлориду), оскільки він проявляє унікальну пролонговану бактерицидну дію, оброблені поверхні зберігають дезінфікуючу здатність тривалий час, до 7-ми днів.

**Фізичні та хімічні властивості:** ПГПМГ не леткий, некорозієактивний, нетоксичний, не викликає алергії не накопичується в організмі. Препарат не має запаху, розчини його безбарвні, не горючий, не вибухонебезпечний, при кімнатній температурі стабільний необмежений час. Концентрат ПГМГ (25% -ний розчин) зберігає свою стабільність і активність не менше 3-х років. Розчини ПГМГ неагресивні по відношенню до нержавіючої сталі, алюмінію, інших металів, а також до бетону, дереву, керамічній плитці, гумі, пластмас, тканин.

**Опис:** Бактерицидні властивості гуанідинових речовин обумовлені руйнівним електрохімічним впливом на оболонку клітини (клітинну мембрану), яка грає роль молекулярного фільтра, що захищає цитоплазматичну мембрану від руйнівних токсинів. Щоб подіяти на клітку, антибактеріальний препарат повинен проникнути через цей шар. Застосовується у фунгіцидах, використовують проти цвілі. [47].

Крім того, засіб "Легіон САНІТАЙЗЕР" має такі властивості:

- ❖ Виявляється активність по відношенню до широкого спектру бактерій, вірусів, грибків;
- ❖ Не формує резистентні форми мікроорганізмів;
- ❖ Відноситься до 4-го класу малонебезпечних сполук;
- ❖ Не має запаху, не подразнює шкіру і слизові оболонки;
- ❖ Стабільний і безпечний при зберіганні і транспортуванні;
- ❖ Не володіє агресивним впливом на оброблюваний матеріал;
- ❖ Засіб негорючий, пожежо- та вибухобезпечний, екологічно безпечний;
- ❖ Не містить альдегідів, спиртів, активного хлору

Засіб наноситься на поверхню до повного зволоження. Необхідно почекати експозицію до повного випаровування вологи. На поверхні оброблюваної поверхні утворюється мікрошар діючої речовини, який забезпечує тривалу бактерицидну дію. Засіб зареєстровано, має висновок санітарно-епідеміологічної експертизи. Отже, деззасіб "ЛЕГІОН САНІТАЙЗЕР" відповідає сучасним вимогам дезінфікуючих засобів [48].

## ІНСТРУКЦІЯ

### **ЩОДО ЗАСТОСУВАННЯ ДЕЗІНФЕКЦІЙНОГО ЗАСОБУ «ЛЕГІОН САНІТАЙЗЕР» (LEGION SANITIZER)**

1. Перед проведенням дезінфекції необхідно провести механічну очистку, миття та, при необхідності, знежирення поверхонь (приміщень, обладнання, тари, інвентарю), в тому числі, які контактують з питною водою.

2. Робочі розчини засобу готують у промаркованих ємностях, які виготовлені із будь-яких матеріалів, шляхом розведення засобу водою та наступного перемішування до повного його розчинення з подальшою витримкою на протязі однієї години. Для приготування робочих розчинів засобу використовують питну воду.

3. З метою дезінфекції застосовують робочий розчин препарату «ЛЕГІОН САНІТАЙЗЕР» в концентрації 0,5-1,0% по препарату і нормі витрат робочого розчину - 100 мл / м<sup>2</sup> з дотриманням часу експозиції 30 хвилин (при профілактичній дезінфекції).

4. Дезінфекцію об'єктів робочими розчинами «ЛЕГІОН САНІТАЙЗЕР» виконують способами протирання, зрошення, замочування, заливання або занурення.

5. Робочі розчини засобу не знебарвлюють тканини, не фіксують органічні забруднення, проявляють змочувальні та дезодоруючі властивості, що підсилюються при підвищенні температури розчинів до 30-90° С. Миючі властивості підсилюються при додаванні до них кальцинованої соди (30,0 г/л). Засіб не сумісний з милами, аніонними поверхнево-активними речовинами, концентрованими розчинами хлоровмісних сполук.

6. Проведення вологого прибирання після дезінфекції засобом «ЛЕГІОН САНІТАЙЗЕР», тобто спеціальне змивання дезінфікуючого засобу з оброблених поверхонь не потрібне.

Також обраний засіб можна використовувати для миття дверей, столів, інших твердих меблів та вікон, їх ретельно протирають ганчір'ям або щіткою, які змочені робочим розчином засобу. Щоденне вологе прибирання приміщень, оброблених

дезінфікуючим засобом «ЛЕГІОН САНІТАЙЗЕР», проводять водою кімнатної температури без застосування мила і миючих засобів.

**Особливості засобу:**

- Не містить токсичних компонентів - активний хлор, альдегідів, фенолів
- Має бактерицидну (включаючи спорові бактерії та туберкульоз), віруліцидну (включаючи віруси гепатиту та віл-інфекції) та фунгіцидну (включаючи кандидоз, дерматофіти) дію
- Має довготривалу (пролонговану) корисну дію
- Може використовуватись у присутності людей
- Має нейтральний показник РН
- Немає запаху. не викликає алергії
- Попереджує та знищує біобростання (біоплівку)
- Не призводить до корозії поверхонь та обладнання
- Просте обслуговування в експлуатації та зберіганні
- Безпечний для людини, тваринного, рослинного світу та навколишнього середовища [48].

Отже, обраний дезінфікуючий засіб відповідає сучасним вимогам дезінфікуючих засобів. Дезінфекцію підлоги та стін деззасобом «ЛЕГІОН САНІТАЙЗЕР» будемо здійснювати зрошенням, оскільки дезінфекції підлягає досить велика площа. Необхідно дезінфікувати стіни та підлогу в трьох приміщеннях, оскільки наявні ферментери на 10 м<sup>3</sup> та 100 м<sup>3</sup>, які плануємо розташувати в окремих приміщеннях (в першому приміщенні будуть розташовані ферментери на 10 л, 100 л та 1000 л) [48].

Оброблюваний об'єкт – ферментери та інше технологічне обладнання

Технологічне обладнання миють засобами 1 раз на тиждень.

Для дезінфекції ферментерів підходять такі засоби як “Ласепт 344-М”, “Асептопол 76”, “VertoSept 1”, “STERILIO A”, “WP 35”, “ЛАСЕПТ РАПІД”.

Для стерилізації ферментерів в харчовому виробництві обираємо деззасіб “Ласепт 344-М”

(діючі речовини,%: 10,0- додецилбіспропілентриамін; 13,0- алкілдиметилбензиламонію хлорид; 7,0 дидецилдиметиламонію хлорид).

«ЛАСЕПТ 344-М» - дезінфікуючий засіб з мийними властивостями виробництва ТОВ «Лабораторія антисептики» (ТУ У 20.2-3827992-001:2012), є прозорою рідиною від безбарвної до жовтого кольору із специфічним запахом, що добре змішується з водою.

**Концентрований дезінфікуючий засіб з чудовим миючим ефектом на основі суміші четвертинних амонієвих сполук 1-го і 3-го поколінь і третинного аміну.**

Властивості деззасобу:

Володіє широким спектром дії (вирулоцидним, фунгіцидну, бактерицидну в т.ч. туберкулоцидним)

Добре сумісний з оброблюваними поверхнями

Ефективний в жорсткій воді

Ефективний у присутності органічних речовин (при білковій навантаженні)

Володіє підвищеними миючими властивостями

Володіє дезодоруючими властивостями

Може використовуватися в присутності людей

Перешкоджає виробленню мікроорганізмами резистентності [10].

Засіб «ЛАСЕПТ 344-М» має бактерицидні властивості щодо грамнегативних та грампозитивних бактерій (включаючи збудників туберкульозу), віруліцидні (включаючи віруси гепатитів, вірус СНІД/ВІЛ, поліомієліту, віруси грипу, аденовірус), фунгіцидні (включаючи гриби роду Кандида, дерматофіти, дріжджі). Засіб «ЛАСЕПТ 344-М» застосовується для мийки, профілактичної дезінфекції та санітарної обробки будь-яких видів устаткування, інвентарю, тари, виготовлених із всіх видів матеріалів.

**ІНСТРУКЦІЯ**

**ЩОДО ЗАСТОСУВАННЯ ДЕЗІНФІКУЮЧОГО ЗАСОБУ З МИЙНОЮ**

**ВЛАСТИВІСТЮ «ЛАСЕПТ 344-М»**

1.Розчини засобу «ЛАСЕПТ 344-М» застосовують для мийки та дезінфекції устаткування, інвентарю, тари, виготовлених з будь-якого матеріалу, виробничих приміщень..

2.Санітарна обробка технологічного обладнання, інвентарю, тари та виробничих приміщень включає в себе механічну очистку, мийку і профілактичну дезінфекцію розчинами «ЛАСЕПТ 344-М» та промивку холодною водопровідною водою до відсутності залишкових кількостей дезінфікуючого засобу.

3.Мийку і дезінфекцію розчинами «ЛАСЕПТ 344-М» проводять способом промивання, протирання, замочування, занурення й зрошення. Обробку об'єктів способом зрошення проводять за допомогою спеціального устаткування, домагаючись рівномірного й рясного змочування. Робочі розчини засобу ефективні при кімнатній температурі. При застосуванні робочих розчинів підвищеної температури (40-60 °С) їх антимікробні та миючі властивості значно підвищуються.

4.Нерозбірні трубопроводи промивають теплою водою від залишків сировини, потім вставляють заглушки й заливають на 2-4 години 0,3 % - ний розчин засобу «ЛАСЕПТ 344-М» з наступним промиванням холодною водою.

5.Розбірні трубопроводи спочатку відмивають від харчових залишків холодною або теплою водою, промивають гарячим лужним миючим розчином з наступним промиванням водою й дезінфікують зануренням у 0,3 % - ний розчин засобу «ЛАСЕПТ 344-М» після чого промивають струменем води або в проточній воді до відсутності залишкових кількостей дезінфікуючого засобу.

6.Мийку і дезінфекцію дрібного інвентарю й посуду здійснюють зануренням на 30 хвилин у ванни з 0,3 % - ним розчином засобу «ЛАСЕПТ 344-М» з наступним промиванням водою. Мийку і дезінфекцію великого інвентарю (візки, ящики й т.п.) як металевого, так і дерев'яного, проводять зрошенням 0,4 % - ним розчином засобу «ЛАСЕПТ 344-М» машинами або пристроями, що розприскують, після чого промивають водою [49].

## **ІНСТРУКЦІЯ**

### **ЩОДО ЗАСТОСУВАННЯ ДЕЗІНФІКУЮЧОГО ЗАСОБУ**

#### **“ДЕЗАНОЛ ОКСО”**

Склад засобу, вміст діючих та допоміжних речовин, мас. %: пероксид водню у межах 49-59 (діюча речовина), срібло колоїдне, стабілізуючі добавки.

❖ Форма випуску і фізико-хімічні властивості засобу: Однорідна прозора рідина зі специфічним запахом пероксиду водню. Виявляє окислювальні властивості. Добре розчиняється у воді. Водні розчини засобу “Дезанол оксо” прозорі, безбарвні, мають помірний запах пероксиду водню. Профілактична, поточна та заключна дезінфекція, генеральні прибирання, дезінфекція поверхонь приміщень, приладів в харчовій промисловості.

❖ Спектр антимікробної дії: засіб “Дезанол оксо” має бактерицидні (включаючи збудників туберкульозу), віруліцидні (включаючи збудників гепатитів, ВІЛ, кишкових вірусних інфекцій), фунгіцидні (включаючи збудників кандидозів та дерматомікозів, плісняві гриби) та спороцидні властивості.

❖ Засіб “Дезанол оксо”, відповідно до вимог ГОСТ 12.1.007, належить до помірно небезпечних речовин (3 клас безпеки) при введенні в шлунок та до мало небезпечних речовин (4 клас безпеки) при нанесенні на шкіру. Не виявляє сенсibilізуючих властивостей. У нативній формі подразнює шкіру і слизову оболонку очей. У рекомендованих з метою дезінфекції та стерилізації концентраціях не виявляє шкірноподразнювальних властивостей, не подразнює слизову оболонку очей. У насичених концентраціях, що створюються у приміщенні під час дезінфекції об’єктів робочим розчином засобу, не подразнює слизову оболонку верхніх дихальних шляхів та очей.

Поверхні (столи, тверді меблі) зрошують із розрахунку 100 мл/м<sup>2</sup> поверхні або ретельно протирають ганчір’ям, яке змочують робочим розчином засобу (норма витрат 100 мл/м<sup>2</sup> поверхні) [50].

### ***Обробка рук персоналу***

Засоби для дезінфекції рук, такі як "Стериліум" та "Неостерил М", є серед найпопулярніших у своєму класі. Однак, при виборі засобу для регулярного застосування необхідно враховувати як його ефективність у боротьбі з мікроорганізмами, так і його вплив на шкіру, зокрема збереження її здоров'я.

"Стериліум" містить 2-пропанол, 1-пропанол та мететроній етилсульфат. Ця комбінація компонентів робить його досить м'яким і ефективним у видаленні мікроорганізмів зі шкіри. За даними випробувань, "Стериліум" може зменшити

кількість транзиторної мікрофлори на шкірі вдвічі всього за 30 секунд, і ця ефективність зберігається протягом години. Важливо також зазначити, що він не має подразнюючого впливу на шкіру та не порушує її водно-жировий баланс, а також має бактерицидну та фунгіцидну дію.

"Неостерил М" містить неіоногенні і амфотерні поверхнево-активні речовини, полігексанід та зволожуючі компоненти. Цей засіб також відзначається широким спектром антимікробної дії, включаючи бактерицидну, фунгіцидну та віруліцидну активність. Цей засіб класифікується як засіб 4-го класу небезпеки, але вважається безпечним для шкіри рук персоналу.

З урахуванням цих фактів, «Неостерил М» є оптимальним вибором для регулярної обробки рук персоналу, оскільки забезпечує ефективний захист від мікроорганізмів, при цьому м'яко діє на шкіру, зберігаючи її здоров'я та комфорт [14-17].

Для встановлення обсягів поверхонь для обробки використаємо специфікацію обладнання з його габаритними розмірами. У ферментаційному відділенні наявні інокулятори та виробничий ферментер на  $0,3 \text{ м}^3$ . Висота ферментера становить близько 1,6 м, приймаємо висоту поверху – 3 м.

Загальна площа приміщення, де встановлено дане обладнання становить

$4 \text{ м} \times 3 \text{ м} = 12 \text{ м}^2$ . Враховуючи, що поверхня стін даного приміщення теж підлягає миттю та дезінфекції на висоту 2,5 м, загальна площа обробки становитиме:

$$\sum F = (4 \text{ м} \times 3 \text{ м}) + (3 \text{ м} + 3 \text{ м} + 4 \text{ м} + 4 \text{ м}) \times 2,5 \text{ м} = 12 \text{ м}^2 + 35 \text{ м}^2 = 47 \text{ м}^2$$

Загальний обсяг обладнання, яке підлягає миттю, становить:

$$10 + 30 + 100 + 300 = 440 \text{ л}$$

Оскільки при використанні СІР-мийки витрата становить 20% від обсягу обладнання, то поверхня для миття буде наступною:

$$440 * 20\% / 100\% = 88 \text{ л}$$

Дані щодо розрахунків розглянутих миючих та дезінфікуючих засобів представлено у табл. 5.4.

Таблиця 5.4

Назва засобу	Об'єкт миття та/або дезінфекції	Концентрація робочого розчину, %	Вартість 1 л (кг) мийного або дез. засобу, грн/л(кг)	Вартість 1 л робочого розчину мийного або дез.засобу, грн/л	Витрати робочого розчину, л/м <sup>2</sup>	Ефективність використання дез. розчину, Е <sub>дз</sub> , грн/м <sup>2</sup>
ЛЕГІОН САНІТАЙЗ ЕР	Поверхні, стіни, вікна, двері, підлога	6%	182	4,46	0,2	0,06
ЛАСЕПТ 344-М	Поверхні, стіни, вікна, двері, підлога	1,0%	216	1,08	0,2	0,01
ДЕЗАНОЛ ОКСО	Обладнання	0,3%	459	1,37	0,1	0,01

## РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Специфікацію технологічного обладнання, що наведено на апаратурній схемі графічної частини курсового проєкту, представлено у таблиці 6.1.

Таблиця 6.1

### Специфікація ділянки отримання дифтерійного токсину

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
1	2	3	4
ПЗ-1	Пристрій для забору повітря	1	Відцентровий повітрозабірний вентилятор. Матеріал - нержавіюча сталь. Продуктивність 28500 м <sup>3</sup> /хв. Компанія: «Shandong Erbang Agricultural Technology Co., Ltd.» (Китай) [27]
Ф-2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтр грубої очистки повітря KF-GS-ZX. Клас очищення G3/G4, ефективність 60-65%. Матеріал – синтетичне волокно. Кінцевий перепад тиску 250 Па. Максимальна температура 80°C. Компанія: «SET Filtre Sanayi Ticaret Ltd.Şti.» (Туреччина) [28]
К-3	Компресор	1	Промисловий повітряний компресор Clarke XE37/270. Об'єм повітряного бака 270 літрів. Максимальний робочий тиск 10 бар. Специфікація включає запобіжний клапан, манометр, випускний клапан повітря та зливний кран. Компанія: «Machine Mart» (Англія) [29]
Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Повітряний трубчастий теплообмінник Wondervo. Максимальний робочий тиск 12 Мпа. Діапазон робочих температур -40-200 °С. Виконаний з міді та алюмінію. Компанія: «Qingdao Wondervo Precision Equipment Co., Ltd» (Китай) [30]
Р-5	Ресивер	1	Ресивер для стисненого повітря. Об'єм 270 л. Максимальний тиск 10 бар. Комплект постачання: паспорт, запобіжний клапан, манометр, кран зливання конденсату Компанія: «ЕНТЕХ УКРАЇНА» (Україна) [31]

					<b>НУХТ БТЕК 04.02.54 КР ПЗ</b>		
Змн.	Лист.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Тимофєєв Д.Г.			Літ.	Арк.	Аркушіє
Перевір.		Пенчук Ю.М.				54	85
Реценз.					<b>Кафедра БТМ</b>		
Н. Контр.							
Затверд.		Стабніков В.П.					
					<b>РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ</b>		
					<b>55</b>		

Закінчення таблиці 6.1.

Т-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Повітряний трубчастий теплообмінник Wondervo. Максимальний робочий тиск 12 Мпа. Діапазон робочих температур -40-200 °С. Виконаний з міді та алюмінію. Компанія: «Qingdao Wondervo Precision Equipment Co., Ltd» (Китай) [30]
Ф-7	Головний фільтр очистки	1	Фільтри стисненого повітря. Матеріал MS, SS, PU. Ефективність 95%. Точність фільтрації 0,01 мкм. Компанія: «Define Filtration Inc.» (Індія) [32]
Д-8 Д-11	Ваги технічні	2	Лабораторні ваги РСЕ-ВТ 2000-ІСА. Наявний сертифікат калібрування ISO. Межа зважування 2100 г, мінімальна вага 0,03 г. Ціна поділки 0,01 г. Компанія: «PCE Instruments UK Ltd.» (Великобританія) [33]
Р-9	Реактор 20 л	1	Лабораторний хімічний реактор 20 л. Матеріал боросилікатне скло GC-17. Розміри 1270*610*690 мм. Швидкість обертання мішалки 50-680 об/хв. Компанія: «Henan Effison Trading Co., Ltd.» (Китай) [34]
Н-10 Н-14	Насос	2	Перистальтичний насос з регульованою витратою від 33 л/год до 100 л/год. Допустимі втрати ± 5%. Тиск 1 бар. Компанія: «Espango» (Італія) [35]
Ф-12	Індивідуальний фільтр	1	Стерильний повітряний фільтр Filson. Конструкційний матеріал: нержавіюча сталь 304/316L, PTFE. Ефективність стерилізації: 99,99%. Абсолютне утримання: 0,01 мкм. Пористість: 90%. Максимальна робоча температура: 200°С. Робочий тиск: 6-10 бар. Сертифікат якості: ISO 9001, ISO 14001. Компанія: «Filson Filter» (Китай) [36]
ФР-13	Ферментер 50 л	1	Двошаровий боросилікатний біореактор GR-50L. Швидкість обертання 200 об/хв, встановлена ротаційна лопатева мішалка. Розміри 660 × 535 × 2150 мм. Може використовуватися в широкому діапазоні температур від 200 °С до -80 °С. Компанія: «Zhengzhou Sykes Biotechnology Co., Ltd.» (Китай) [37]

## РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

Технологічна схема отримання дифтерійного токсину передбачає проведення допоміжних робіт (підготовка аераційного повітря, підготовка 6% розчину HCl, підготовка та стерилізація 6% розчину NaOH, підготовка та стерилізація компонентів поживних середовищ), а також власне технологічний процес (вирощування інокуляту та біосинтез дифтерійного токсину).

### *ДР 1. Підготовка аераційного повітря*

#### *ДР 1.1 Забір атмосферного повітря*

Проводять забір атмосферного повітря через повітрозабірник ПЗ-1 на висоті 15 м. Забір проводять на висоті до 3 м від найвищої точки будівлі підприємства зважаючи на обсяги ферментаційного обладнання та зменшення частки мікроорганізмів та механічних часток у повітрі.

#### *ДР 1.2. Груба очистка повітря*

Здійснюють очищення повітря від грубих механічних частинок, направляючи повітря до фільтру грубої очистки Ф-2 із синтетичного волокна класу очищення G3/G4, ефективність 60-65%.

#### *ДР 1.3. Компресування повітря*

Для стиснення повітря його подають на компресори К-3. Стиснення відбувається до 0,35–0,5 МПа.

#### *ДР 1.4. Охолодження повітря та зменшення надлишкової вологості*

Стиснення повітря зумовлює значне підвищення температури, через це після компресора повітря надходить до теплообмінника-охолоджувача Т-4 для досягнення температури 20°C. Далі повітря йде в ресивер Р-5, що призначений для вирівнювання тиску в системі, рівномірного подавання повітря на наступні фільтри, усунення залишку конденсату та мастила. При цьому кінцева вологість повітря складає 60 %.

					<b>НУХТ БТЕК 04.02.54 КР ПЗ</b>			
<b>Змн.</b>	<b>Лист.</b>	<b>№ докум.</b>	<b>Підпис</b>	<b>Дата</b>	<b>РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ</b>	<b>Літ.</b>	<b>Арк.</b>	<b>Аркуше</b>
Розроб.		Тимофеев Д.Г.					56	85
Перевір.		Пенчук Ю.М.						
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.				<b>Кафедра БТМ</b>		<b>57</b>

### *ДР 1.5. Нагрівання повітря*

Після ресивера повітря підігрівають до наближеної для культивування біологічного агента температури шляхом подачі у теплообмінник-нагрівач Т-6. На виході повітря матиме температуру 37-38°C, що дещо вище оптимуму для продуцента, оскільки незначні втрати тепла відбудуться на наступних стадіях очистки.

### *ДР 1.6. Очищення повітря в головному фільтрі*

Нагріте повітря прямує спочатку до головного фільтра Ф-7 для досягнення очищення 95%, матеріал MS, SS, PU; точність фільтрації 0,01 мкм.

### *ДР 1.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі*

Потім повітря надходить до індивідуального фільтра Ф-12, який встановлений перед ферментаційною ємністю. На цьому етапі рівень очистки повітря досягає 99,99%. Стерильне повітря подається до стадії ТП 5.1.

## ***ДР 2. Підготовка та стерилізація титрувальних розчинів***

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

До колби на 100 мл за допомогою мірного циліндра на 50 мл відмірюють 41,9 мл води дистильованої. Потім піпеткою на 10 мл відмірюють 8,1 мл 37% розчину хлоридної кислоти, розчин обережно перемішують. Приготований розчин кислоти подають до ФР-13 в асептичних умовах.

### *ДР 2.2. Приготування та стерилізація 6% розчину NaOH*

На технічних вагах зважують 3 г NaOH та поміщають колби на 100 мл. За допомогою мірного циліндра на 50 мл відмірюють 50 мл води дистильованої та додають в колбу на 100 мл, вміст колби перемішують. Колбу закривають ватно-марлевым корком та стерилізують в автоклаві за температури 131°C, тиску 0,15 МПа упродовж 40 хв.

## ***ДР 3. Приготування і стерилізація поживного середовища***

### *ДР 3.1. Розщеплення папаїном яловичого м'яса*

Необхідну кількість подрібненого яловичого м'яса суспендують у стерильній воді (1:7 мас./об.) разом з папаїном з розрахунку 8 г ферменту на 1 кг м'яса. Загальну кількість ферменту папаїну зважують, подрібнюють в порошок і суспендують в 700

мл дистильованої води. Потім 100 мл цієї суміші додають до яловичини з 30-хвилинними інтервалами. Розщеплення проводять в контрольованих умовах температури ( $50^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) і рН ( $7,1 \pm 0,1$ ). Тривалість процесу становить близько 3,5 години при постійному перемішуванні. Для підтримки рН 7,0-7,2 використовують розчин натрію гідроксиду (12,%). Після завершення додають концентровану соляну кислоту, щоб знизити рН до 5,1, і суміш кип'ять протягом 10 хв. Додають крижану оцтову кислоту, щоб знизити рН до 4,1, отриману суміш фільтрують за допомогою тканинного фільтра. Отриманий бульйон можна зберігати при  $2-8^{\circ}\text{C}$  близько 4 тижнів без істотної втрати якості.

Такий бульйон надходить до ДР 3.2.1, ДР 3.3.1.

*ДР 3.2. Приготування та стерилізація композицій для вирощування інокуляту у колбах на качалках*

*ДР 3.2.1 Приготування та стерилізація композиції А*

На технічних терезах зважують 1 кг бульйону та поміщають у колбу об'ємом 3 л. Стерилізацію бульйону яловичини проводять окремо від інших компонентів в автоклаві при  $120^{\circ}\text{C}$ , 0,075 МПа впродовж 20 хв.

*ДР 3.2.2. Приготування та стерилізація композиції Б*

На технічних терезах зважують 0,41 г дріжджового екстракту, 1,65 г натрій лактату, 55 г мальтози. Наважки поміщають у колбу об'ємом 2 л, додають 1 л води питної, перемішують, закривають ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві при  $112^{\circ}\text{C}$ , 0,05 МПа впродовж 20 хв.

*ДР 3.2.3. Приготування та стерилізація композиції В*

На аналітичних терезах зважують 0,82 г  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,0007 г  $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ , 0,002 г  $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,002 г  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ . Наважки поміщають у колбу об'ємом 0,5 л, додають 250 мл води дистильованої, перемішують, закривають ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві при  $131^{\circ}\text{C}$ , 0,15 МПа впродовж 40 хв.

*ДР 3.2.4. Приготування та стерилізація композиції Г*

На аналітичних терезах зважують 0,005 г нікотинової кислоти, 0,005 г бета-аланіну, 0,0004 г пімелінової кислоти. Наважки поміщають у колбу об'ємом 0,5 л, додають 0,5 л води питної, перемішують. В асептичних умовах проводять

фільтрування отриманого розчину композиції на лабораторній установці фільтрації з використанням гідрофільного мембранного фільтру з розміром пор 0,22 мкм. Стерильна композиція через фільтр надходить в стерильну колбу об'ємом 0,5 л.

*ДР 3.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для біосинтезу цільового продукту у ферментері 50 л*

*ДР 3.3.1. Приготування та стерилізація композиції А*

*ДР 3.3.1. Приготування та стерилізація композиції А*

На технічних терезах Д-8 зважують 8 кг бульйону та поміщають у реактор Р-9 об'ємом 20 л. Стерилізацію бульйону яловичини проводять окремо від інших компонентів при 120°C, 0,075 МПа впродовж 20 хв.

*ДР 3.3.2. Приготування та стерилізація композиції Б*

На технічних терезах зважують 3,71 г дріжджового екстракту, 14,85 г натрій лактату, 495 г мальтози. Наважки поміщають у колбу об'ємом 2 л, додають 1 л води питної, перемішують, закривають ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві при 112 °С, 0,05 МПа впродовж 20 хв.

*ДР 3.3.3. Приготування та стерилізація композиції В*

На технічних терезах Д-11 зважують 7,4 г  $MgSO_4 \times 7H_2O$ , 0,007 г  $MnCl_2 \times 4H_2O$ , 0,018 г  $ZnSO_4 \times 7H_2O$ , 0,023 г  $CuSO_4 \times 5H_2O$ . Наважки поміщають у ферментер ФР-13 об'ємом 50 л, подають 13,7 л води питної. Вмикають мішалку, подають пару в сорочку апарату, стерилізують при 131 °С, 0,15 МПа впродовж 40 хв.

*ДР 3.3.4. Приготування та стерилізація композиції Г*

На аналітичних терезах зважують 0,052 г нікотинової кислоти, 0,052 г бета-аланіну, 0,003 г пімелінової кислоти. Наважки поміщають у колбу об'ємом 0,5 л, додають 0,5 л води питної, перемішують. В асептичних умовах проводять фільтрування отриманого розчину композиції на лабораторній установці фільтрації з використанням гідрофільного мембранного фільтру з розміром пор 0,22 мкм. Стерильна композиція через фільтр надходить в стерильну колбу об'ємом 0,5 л.

#### ***ТП 4. Підготовка посівного матеріалу***

##### ***ТП 4.1 Підтримання колекційної культури***

Протягом процесу використовується класичний штам *Corynebacterium diphtheriae* PW 8. Культура зберігається у ліофілізованому стані у пробірці на скошеному агаризованому середовищі Лефлера при температурі 2-8 °С.

#### *ТП 4.2. Одержання робочої культури*

Робоча культура була одержана пересіванням культури на чашки Петрі із агаризованим середовищем Лефлера для отримання ізольованих колоній. Культивують у термостаті температурі 35°С впродовж 48 год.

#### *ТП 4.3. Пересівання на скошене середовище*

Отримані ізольовані колонії з чашки Петрі (від ТП 4.2) пересівають петлею в пробірки зі скошеним середовищем Лефлера (одна ізольована колонія використовується для засіву однієї пробірки). В пробірки пересівають ізольовані колонії, що знаходяться на відстані не менше 1 см. Культивують в термостаті при температурі 35°С впродовж 24 год.

#### *ТП 4.4. Вирощування інокуляту у колбах на качалках*

В умовах асептики у колбу об'ємом 3 л зі стерильною композицією А (від ДР 3.2.1) зливають простерилізовані композиції Б, В та Г (від Д.Р. 3.2.2, Д.Р. 3.2.3 та ДР 3.2.4 відповідно), перемішують і розливають по 150 мл у качалочні колби об'ємом 750 мл. У пробірки з робочою культурою *Corynebacterium diphtheriae* PW 8 (від Т.П. 4.3) вносять по 1,5 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини, піпеткою відбирають одержану бактеріальну суспензію і вносять у качалочні колби з поживним середовищем. Для засіву однієї колби використовують бактеріальну суспензію, одержану з однієї пробірки. Культивують на качалках 20 годин, при 35°С та 140 об/хв.

### **ТП 5. Біосинтез**

#### *ТП 5.1 Виробниче культивування*

У попередньо простерилізований ферментер ФР-13 об'ємом 50 л з композицією В (від ДР 3.3.3) насосом Н-10 перекачують простерилізовану композицію А з реактора Р-9 (ДР 3.3.1), а також подають композицію Б (ДР 3.3.2) та композицію Г (ДР 3.3.4) з колб. Вмикають перемішуючий пристрій.

Процес починається з додавання інокуляту (від *ТП 4.4*). Культивуація відбувається при 35°C протягом 48 годин, процес зупиняється при найбільшому значенні антигенної чистоти 180 Lf/мл або 12,6 г/л токсину. Культуру у ферментері перемішують при 800 об/хв та вирощують при швидкості аерації 3-4 л/хв. Кількість піни контролюють за допомогою механічного піногасника, яким обладнаний ферментер. рН середовища для виробництва токсину підтримують на рівні 7,1 за допомогою розчину соляної кислоти (від *ДР 2.1*) та розчину гідроксиду натрію (від *ДР 2.1*) відповідно, вносять в асептичних умовах з розрахунку 2 мл на 1 л культуральної рідини.

Проби для проведення аналізу кількостей вуглецю, азоту, кількості біомаси, цільового токсину та мікробіологічної чистоти відбирають кожні 8 годин. Після біосинтезу культуральна рідина насосом Н-14 подається на стадії одержання вакцини.

## РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

### 8.1 Карта постадійного контролю біосинтезу біомаси *Corynebacterium diphtheria* для одержання вакцини протидифтерійної

Таблиця 8.1

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
Кт 1.1 Забір атмосферного повітря	Висота забору повітря	Висота труби забору	Протягом всього циклу виробництва	H=15 м
Кт 1.2 Груба очистка повітря	Очищене повітря, ступінь очищення повітря на виході з фільтра, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеню очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки у фільтрі грубого очищення	E=60-65%, тиск згідно паспорту
Кт 1.3 Компресування повітря	Стиснене повітря, тиск	Манометр технічний	Повітря після компресування	P=0,35-0,5 МПа
Кт 1.4 Охолодження повітря та зменшення надлишкової вологості	Охоложене повітря, температура, вологість	Термометр технічний, психрометричний метод	Після охолодження повітря і видалення вологи	t=20°C, W=60%

<b>НУХТ БТЕК 04.02.54 КР ПЗ</b>				
Змн.	Лист.	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.		Тимофеев Д.Г.		
Перевір.		Пенчук Ю.М.		
Реценз.				
Н. Контр.				
Затверд.		Стабніков В.П.		
<b>РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА</b>				
		Літ.	Арк.	Аркуші
			62	85
<b>Кафедра БТМ</b>				
<b>63</b>				

Продовження таблиці 8.1.

Кт 1.5 Нагрівання повітря	Підігріте повітря, температу ра	Термометр технічний	Після нагріву повітря	$t=37-38^{\circ}\text{C}$
Кт 1.6 Очищення повітря в головному фільтрі	Очищене повітря, перепади тисків, ступінь очищення повітря на виході з фільтра	Манометр, перевірка ступеню очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки у фільтрі головного очищення	$E=95\%$ , тиск згідно паспорту
Кт 1.7 Очищення повітря на індивідуаль ному фільтрі	Очищене повітря, ступінь очищення повітря	Перевірка ступеню очищення повітря згідно паспорту фільтра	Під час очищення повітря на індивідуальних фільтрах	$E=99,99\%$
Кх 2.1 Приготуван ня 6% розчину НСІ	Концентра ція НСІ	Хімічний метод	Після приготування розчину	$C=6\%$
Кх, Кт, Км 2.2 Приготуван ня та стерилізація 6% розчину NaOH	Концентра ція NaOH, температу ра, тиск, час, стерильніс ть	Хімічний метод, манометр технічний, термометр, таймер, мікробіологіч ний контроль	Після приготування розчину; тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний метод контролю	$C=6\%$ , $P=0,15$ МПа, $t=131^{\circ}\text{C}$ , $\tau=40$ хв, відсутність мікробіоти
Кт, Кх 3.1 Розщепленн я папаїном яловичого м'яса	Яловиче м'ясо, температу ра, час, рН	Термометр, таймер, рН- метр	Температура та час визначаються безперервно, рН визначається періодично	$t_1=50^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , $\text{pH}_1=7,1 \pm 0,1$ , $\tau_1=3,5$ год, $\text{pH}_2=5,1$ , $\tau_2=10$ хв, $\text{pH}_3=4,1$
Кт, Км 3.2.1 Приготуван ня та стерилізація композиції А для	Композиці я А, температу ра, тиск, час, стерильніс	Манометр технічний, термометр, таймер, мікробіологіч ний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний метод контролю	$P=0,075$ МПа, $t=120^{\circ}\text{C}$ , $\tau=20$ хв, відсутність мікробіоти

вирощування інокуляту в колбах на качалках	ть			
Кт, Км 3.2.2 Приготування та стерилізація композиції Б для вирощування інокуляту в колбах на качалках	Композиція Б, температура, тиск, час, стерильність	Манометр технічний, термометр, таймер, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний метод контролю	P=0,05 МПа, t=112°C, τ=20 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.2.3 Приготування та стерилізація композиції В для вирощування інокуляту в колбах на качалках	Композиція В, температура, тиск, час, стерильність	Манометр технічний, термометр, таймер, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний метод контролю	P=0,15 МПа, t=131°C, τ=40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.2.4 Приготування та стерилізація композиції Г для вирощування інокуляту в колбах на качалках	Композиція Г, розмір пор мембранного фільтра, стерильність	Установка мембранної фільтрації, мікробіологічний контроль	Фільтруючий елемент підбирається на початку процесу стерилізації, мікробіологічний метод контролю	d=0,22 мкм, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.3.1 Приготування та стерилізація композиції А для біосинтезу цільового продукту у ферментері 50 л	Композиція А, температура, тиск, час, стерильність	Манометр технічний, термометр, таймер, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний метод контролю	P=0,075 МПа, t=120°C, τ=20 хв, відсутність мікробіоти

Кт, Км 3.3.2 Приготування та стерилізація композиції Б для біосинтезу цільового продукту у ферментері 50 л	Композиція Б, температура, тиск, час, стерильність	Манометр технічний, термометр, таймер, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний метод контролю	P=0,05 МПа, t=112°C, τ=20 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.3.3 Приготування та стерилізація композиції В для біосинтезу цільового продукту у ферментері 50 л	Композиція В, температура, тиск, час, стерильність	Манометр технічний, термометр, таймер, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний метод контролю	P=0,15 МПа, t=131°C, τ=40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.3.4 Приготування та стерилізація композиції Г для біосинтезу цільового продукту у ферментері 50 л	Композиція Г, розмір пор мембранного фільтра, стерильність	Установка мембранної фільтрації, мікробіологічний контроль	Фільтруючий елемент підбирається на початку процесу стерилізації, мікробіологічний метод контролю	d=0,22 мкм, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1 Підтримання колекційної культури	Колекційна культура <i>Corynebacterium diphtheriae</i> RW 8, температура, мікробіологічна чистота культури	Холодильник	Мікробіологічний контроль	t=2-8°C, відсутність сторонньої мікробіоти

Кт, Км 4.2 Одержання робочої культури	Пересіяна культура, чашки Петрі з агаризован им середовищ ем Лефлера, температу ра, тривалість вирощуван ня, мікробіоло гічна чистота культури	Термостат, мікроскоп, мікробіологіч ний контроль	Мікробіологічний контроль після вирощування культури	t=35°C, τ=48 год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 4.3 Пересівання на скошене середовище	Пересіяна культура, пробірки з агаризован им середовищ ем Лефлера, температу ра, тривалість вирощуван ня, мікробіоло гічна чистота культури	Термостат, мікроскоп, мікробіологіч ний контроль	Мікробіологічний контроль після вирощування культури	t=35°C, τ=24 год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 4.4 Вирощуван ня інокуляту у колбах на качалках	Посівний матеріал, тривалість вирощуван ня, температу ра, швидкість	Термометр технічний, таймер, тахометр, мікробіологіч ний контроль	Після вирощування інокуляту в колбах на качалках	t=35°C, τ=20 год, ω=140 об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти

	перемішування, мікробіологічна чистота культури			
Кт, Кх, Км 5.1 Виробниче культивування	Культуральна рідина, температура, рН, тривалість культивування, швидкість аерації, концентрація токсину, мікробіологічна чистота	Термометр технічний, таймер, рН- датчик, тахометр, термостат, мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль проводять кожні 4-6 год, концентрація токсину визначається після закінчення процесу культивування	$t=35^{\circ}\text{C}$ , $\tau=48$ год, $\omega=800$ об/хв, $w=3-4$ л/хв, $\text{pH}=7,1$ , $C_T=12,6$ г/л, відсутність сторонньої мікробіоти

## 8.2. Мікробіологічний контроль

Культивування бактерій *Corynebacterium diphtheriae* здійснюється в асептичних умовах, що значить що необхідно проводити мікробіологічний контроль на всіх етапах, для попередження контамінації. Кожні 4...6 год з ферментера відбирають зразки культуральної рідини для аналізу, об'ємом 150-200 мл.

Мікробіологічний контроль чистоти культури проводиться двома методами:  
1) Розсівання проби культуральної рідини та готового посівного матеріалу на агаризоване середовище у чашках Петрі; 2) світлове мікроскопіювання [38].

1) Висів проводиться на чашки Петрі з СА (для виявлення грибів і дріжджів) і МПА (для виявлення бактерій), методом виснаженого штриха, в асептичних умовах. Після цього чашки ставлять інкубуватись за  $30^{\circ}\text{C}$ . Наприкінці інкубації проводять візуальну оцінку поверхні середовищ. На культурі у чашці з сусло-агаром не має бути нічого, коли на культурі у чашці з МПА мають бути колонії *C.*

*diphtheriae*. Візуально колонії випуклі, мають кулясту форму та світле, напівпрозоре каламутне забавлення.

2) Другим методом контролю є світлове мікроскопіювання з імерсією. Дослідження проводять у асептичних умовах. Препарат починають готувати нанесенням краплі досліджуваної культуральної рідини на знежирене предметне скельце за допомогою стерильної петлі, після чого розподіляють її по склу. Після розподілу бактерії фіксують у полум'ї спиртівки, що закріплює бактерії на склі. Далі зразок фарбують метиленовим синім, оскільки знаємо що *C. diphtheriae* – грампозитивна бактерія. Після фарбування зразок промивається, дегідратується та мікроскопіюється з імерсією.

За відсутності сторонньої мікробіоти у зразку мають бути лише клітини *C. diphtheriae*, які мають форму паличкоподібну форму, є нерухомими, не мають капсул та є грам позитивними.

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

#### **8.3.1. Визначення концентрації дифтерійного токсину**

Визначення концентрації дифтерійного токсину відбувається у одиницях Lf (limes flocculation). Значення Lf розчину токсину була виміряна методом Рамона. У цьому методі 1 одиниця Lf дорівнює кількості токсину, що реагує з 1 одиницею антитоксину.

Цей тест порівнює токсин і відповідний антитоксин і оцінює співвідношення еквівалентності. Кінцева точка визначається як суміш двох компонентів, які якнайшвидше покажуть видиму флокуляцію. Концентрацію токсину можна підтримувати постійною та додавати різні кількості антитоксину. Це те, що зробив Рамон, і тому цей метод часто називають методом Рамона, також відомий як бета-процедура [39].

Для переведу L/f у г/л використовується формула:

$$\text{г/л} = (\text{Lf/мл}) \times (\text{молекулярна маса ензиму}) / 1000$$

#### **Перелік необхідних матеріалів і реактивів:**

1. Дифтерійний токсин та відповідний антитоксин.

2. Розчину хлориду натрію 9 г/л.
3. Латексна суспензія - реактив для флоакуляції.
4. Дистильована вода: для розведення реагентів та приготування розчинів.
5. Лабораторна апаратура: петлі для передачі зразків, посуд, центрифуга, тощо.
6. Термостат або водяна баня.

#### **Умови проведення дослідів**

Ряд об'ємів еталонного стандарту антитоксину, доведеного до концентрації 100 Lf-екв./мл, розподіляють у серію, наприклад, 7 см × 1 см пробірок для флокуляції. У кожен пробірочку додають достатню кількість 9 г/л розчину хлориду натрію, щоб отримати постійний загальний об'єм, наприклад, 1 мл. Досліджувані зразки розбавляють, щоб отримати очікувану концентрацію приблизно 50 Lf/мл, і, наприклад, 1 мл аліквоти цього розведення розподіляють у кожен з пробірок, що містять антитоксин.

Пробірки належним чином перемішують шляхом струшування, потім поміщають у водяну баню при постійній температурі від 30 °С до 52 °С і спостерігають через рівні проміжки часу для першої появи флокул. Для цього може знадобитися використання збільшувальної лінзи та сильного освітлення. Перша та друга суміші для флокуляції записуються, а також час, необхідний для появи першої флокуляції. 2 пробірки можуть флоакулювати одночасно.

Першою пробірочкою для флокуляції є та, яка містить кількість антитоксину, найближчу за еквівалентністю до кількості антигену в зразку. Вміст антитоксину в цій пробірці можна використовувати для розрахунку значення Lf зразка. Якщо 2 пробірки флоакулюють одночасно, середнє значення з пробірок надається як результат. Час, необхідний для флокуляції першої пробірки (Kf), є корисним показником якості антигену. Якщо при даній температурі і концентрації анатоксину і антитоксину значення Kf підвищується порівняно з нормою, це свідчить про пошкодження антигену. Значення Kf також може змінюватися залежно від якості використовуваного антитоксину [40].

### 8.3.2 Визначення концентрації джерела вуглецевого живлення

При рості *C. diphtheriae* на обраному мною середовищі - папаїновому поживному середовищі, бактерії споживатимуть мальтозу як джерело вуглецевого живлення, для отримання енергії та росту. Вимірювання вмісту мальтози будемо проводити за допомогою методу спектрофотометрії. Спектрофотометрія використовується для кількісного аналізу індивідуальних речовин і багатокомпонентних систем, що нам і потрібно.

Принцип спектрофотометрії полягає в наступному: У спектрофотометрії відбувається вимірювання інтенсивності світла залежно від довжини хвилі. Це здійснюється шляхом дифракції світлового пучка в спектр довжин хвиль, виявлення інтенсивності із зарядовим обладнанням і відображення результатів у вигляді графіка на детекторі, а потім на дисплеї. Світло падає на досліджувану речовину, а потім проходить через детектор, який реєструє інтенсивність світла [38].

### 8.3.3 Визначення концентрації джерела азотного живлення

Високоєфективна іонна хроматографія (НПІС) часто застосовується для аналізу іонів нітрату, нітриту та амонію. Для цього рідкі зразки не потребують спеціальної підготовки, окрім центрифугування чи фільтрування.

У статті [41] запропоновано метод визначення загального азоту за допомогою іонної хроматографії.

Окислювальний реагент: 15 мл 3,75 М розчину NaOH додавали до 500 мл деіонізованої води, 50 г  $K_2S_2O_8$  розчиняли в отриманому розчині, утворену суміш розбавляли водою до співвідношення 1:1. Цей окислюючий реагент необхідно використовувати свіжим.

#### Методика визначення

6 мл окислювача додавали до 4 мл зразка, поміщали в PTFE тигель і закривали. Тигель поміщали в корпус з нержавіючої сталі бомби Парра і закривали, затягнувши гвинтову кришку з нержавіючої сталі. Систему поміщали в попередньо розігріту до 105°C духовку і витримували при цій температурі протягом 4 год. Бомбу розкривали після охолодження до температури навколишнього середовища.

Під впливом тиску, температури та рН органічні та неорганічні сполуки азоту перетворювалися на нітрати. Утворений нітрат вимірювали за допомогою іонної хроматографії [41].

Потім проводять визначення нітратів шляхом іонної хроматографії.

*Визначення нітратів методом іонної хроматографії [41]*

#### Зразки та реагенти

Перед введенням у хроматограф зразки розбавляли в десять разів, оскільки пік  $\text{SO}_4^{2-}$ , отриманий з пероксодисульфату калію, після процедури розщеплення заважає виявленню нітратів. Холосту пробу окисного реагенту після процедури розщеплення вводили в хроматограф. Усі реагенти мають бути найвищої чистоти, а для розведень використовується деіонізована вода. Калібрувальні стандарти готують шляхом розведення змішаних вихідних стандартних розчинів, що містять 1000 мг/л  $\text{NO}_3^-$ -N, використовуючи серію розведень [41].

### **8.4. Показники якості готового продукту**

#### ***Методика 1. Визначення цільового продукту***

Кількісне визначення концентрації токсину чи анатоксину здійснюється за допомогою методу Рамона, принцип якого було наведено вище.

#### **Методика 2. Вимірювання рН розчину :**

Проводять підготовку відповідного потенціометра (з ціною поділки 0,05 одиниць рН) згідно з інструкцією до приладу. Калібрують потенціометр по стандартному буферному розчину з рН 6,86. Розходження між показниками приладу і номінальним значенням рН буферного розчину не повинно перевищувати 0,04 одиниці рН.

Електроди промивають у дистильованій воді (тричі міняючи воду). Поміщають 20 – 30 мл контрольного розчину в хімічний стакан ємкістю 50 мл. Занурюють електроди в розчин. Визначають рН по шкалі приладу після того, як показання приладу набудуть постійного значення (звичайно на протязі 2 хв). Після проведення повторних вимірювань результати слід записувати у вигляді середнього арифметичного одержаних значень.

Середнє значення рН розчину повинно бути в межах від 3,8 до 4,5 при температурі (25±2) °С.

#### ***Методика 8. Випробування препарату на стерильність***

Препарат в умовах випробування немає антимікробної дії.

Посів препарату на поживні середовища проводять методом мембранфільтрації на приладі «Стеритест».

Для контролю стерильності відбирають зразок від серії в кількості 30 ампул. Фільтрування зразків проводять в асептичних умовах. Вміст всіх ампул пропускають через 2 стерильні фільтри з діаметром пор 0,45 мкм, впаяні в дві стерильні пластикові ємності (каністри). Після закінчення фільтрації каністри заповнюють поживним середовищем – першу тіогліколевим, другу – Сабуро. Посіви в тіогліколевому середовищі витримують при температурі (30-35) °С і в середовищі Сабуро – (20-25) °С протягом 7 діб при щоденному перегляді.

#### ***Облік та інтерпретація результатів випробування на стерильність***

Посіви переглядають в розсіяному світлі щоденно та по закінченні періоду інкубації. Наявність росту мікроорганізмів у живильних середовищах оцінюють візуально по наявності помутніння, плівки осаду та інших макроскопічних змін. Виявлений ріст мікроорганізмів необхідно підтвердити мікроскопіюванням мазків, зафарбованих по Граму. Вважають, що випробовуваний препарат задовольняє вимогам випробувань на стерильність при відсутності мікроорганізмів. При виявленні росту хоча би в одній пробірці (колбі, флаконі) його підтверджують мікроскопіюванням та повторюють випробування на такій же кількості зразків, як і в перший раз. При відсутності росту мікроорганізмів при повторному посіві вважають, що випробовуваний препарат задовольняє вимогам випробувань на стерильність. У разі росту мікроорганізмів при повторному посіві, морфологічно східних з мікроорганізмами, виявленими в первинному посіві, випробовуваний препарат вважають нестерильним. Якщо при повторному посіві простежується ріст мікроорганізмів, які відрізняються по морфології від спочатку виділених, випробування повторюють в третій раз на подвоєній кількості. При відсутності росту мікроорганізмів після інкубації посівів в третьому випробуванні вважають, що випробовуваний препарат

задовольняє вимогам на стерильність. При наявності росту хача би в одній пробірці випробовуваний препарат вважають нестерильним.

***Поживні середовища.*** Для контролю стерильності використовують «Сухе живильне середовище для контролю стерильності» (тіогліколеве) та середовище Сабуро (рідке). Замість комерційного тіогліколевого середовища та середовища Сабуро може бути використане тіогліколеве середовище та середовище Сабуро індивідуального виготовлення.

## РОЗДІЛ 9. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ

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

Технологія отримання «дифтерійного токсину» включає три основні етапи:

1. Доферментаційні допоміжні роботи охоплюють кілька важливих підпроцесів, таких як санітарна підготовка виробництва, приготування та стерилізація титрувальних агентів і поживного середовища. Ці підпроцеси є необхідними для забезпечення стерильних умов та необхідних хімічних компонентів для подальших етапів отримання посівного матеріалу та виробничого біосинтезу.
2. Ферментаційний технологічний процес складається з двох основних стадій: одержання посівного матеріалу та біосинтезу. Одержання посівного матеріалу включає вирощування специфічних культур, які потім використовуються для інокуляції у ферментерах. Біосинтез - це основний етап, де відбувається активне виробництво дифтерійного токсину шляхом ферментації. Важливо підтримувати оптимальні умови, такі як температура, рН та аерація, щоб забезпечити максимальну продуктивність.
3. Післяферментаційний технологічний процес включає кілька стадій, основними з яких є відділення біомаси та отримання кінцевого продукту – «дифтерійного анатоксиу». Відділення біомаси здійснюється центрифугуванням, що дозволяє відокремити клітини від рідкого середовища. Після цього отримують дифтерійний токсин, який потребує очистки, концентрації та інактивації.

Етапи приготування титрувальних розчинів, відділення біомаси та санітарна підготовка виробництва є джерелами рідких відходів, які можуть включати залишки хімічних реагентів та біомаси. Газоподібні відходи виникають під час одержання посівного матеріалу та виробничого біосинтезу і можуть включати різні летючі органічні сполуки та продукти метаболізму [42].

					<b>НУХТ БТЕК 04.02.54 КР ПЗ</b>			
<b>Змн.</b>	<b>Лист.</b>	<b>№ докум.</b>	<b>Підпис</b>	<b>Дата</b>	<b>РОЗДІЛ 9. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ</b>	<b>Лім.</b>	<b>Арк.</b>	<b>Аркушіє</b>
Розроб.		Тимофеев Д.Г.					74	85
Перевір.		Пенчук Ю.М.						
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.			<b>Кафедра БТМ</b>			
								<b>75</b>

Впровадження технологічних, управлінських та інших рішень щодо екологізації підвищують ефективність використання природних ресурсів і зберігають якість природного середовища. Екологізація передбачає перехід до природозберігаючих методів виробництва, що включає мінімізацію відходів. У технічному аспекті екологізація означає впровадження чистих технологій виробництва, що зменшують негативний вплив на навколишнє середовище.

*Біотехнологічні підприємства генерують три категорії відходів:*

**Виробничі відходи** включають залишки сировини, непотрібні продукти реакцій та забруднені матеріали.

**Побутові відходи** – це відходи, які утворюються в результаті життєдіяльності працівників підприємства, включаючи харчові відходи, упаковки та інші побутові предмети.

**Атмосферні відходи** складаються з газів та парів, які викидаються в атмосферу в процесі виробництва, і можуть містити шкідливі речовини, що вимагає спеціальних систем фільтрації та очищення.

**Загальна мета екологізації** полягає в створенні замкнених циклів виробництва, де відходи одного процесу стають сировиною для іншого, мінімізуючи таким чином негативний вплив на довкілля та забезпечуючи стале використання ресурсів.

## 9.2 Система знешкодження та утилізації рідких відходів

У процесі виробництва утворюються залишки мийно-дезінфікуючих засобів. Для миття та дезінфекції обладнання використовуються мобільні циркуляційні СІР-мийки, для яких необхідно приготувати робочі розчини в об'ємі, що становить 20-30% від загальної ємності обладнання. Згідно зі специфікацією, до цього розрахунку включаються реактори-збірники, інокулятори та ферментери, які використовуються у виробничому процесі.

$$V_{\text{ємностей}} = V_{\text{реактор}} + V_{\text{ферментер}} = 2,75 + 25 + 50 = 77,75$$

Тоді об'єм мийно-дезінфікуючих засобів становитиме:

$$V_{\text{засобів}} = 77,75 * 0,2 = 15,55 \text{ (15,6) л}$$

$$V_{\text{засобів}} = 77,75 * 0,3 = 23,325 \text{ (23,3) л}$$

Приймаємо, що об'єм відпрацьованих залишків засобів дорівнює об'єму цих засобів, тобто 15,6 - 23,3 л.

**Відпрацьована вода після ополіскування обладнання.** Об'єм води для ополіскування, так само як і мийно-дезінфікуючого розчину, становить 20-30% від об'єму ємнісного обладнання. Як було вказано раніше, цей параметр дорівнює 15,6 - 23,3 л. Таким чином, в сумі орієнтовна кількість стічних вод за один цикл виробництва становитиме:  $23,3 + 23,3 = 46,6$  л.

Орієнтовний об'єм стічних вод на 25 л кінцевого продукту становить 46,6 л.

Відповідно до розрахунків за один цикл отримуємо 27,5 л культуральної рідини, з концентрацією кінцевого продукту 12,6 г/л (0,0126 кг/л):

$$\text{Тобто } 27,5 \cdot 0,0126 = 0,3465 \text{ кг}$$

Так як основна частина культуральної рідини є вода, то  $27,5 - 0,3465 = 27,1535$  кг або наближено для спрощення розрахунків (27,2)

Таким чином, за один виробничий цикл отримуємо 0,3465 кг кінцевого продукту та 27,2 л води.

Оскільки цикл триває 2 доби (48 годин) за 1 добу отримуємо  $27,2/2 = 13,6$  л. Визначаємо середні витрати стічних вод від Виробничого підприємства.

Приймаємо кількість трудоднів – 30, тоді об'єм культуральної рідини за добу становить:

$$V_d = V_{\text{гп}} / T_{\text{тр}} = 309/30 = 10,3 \text{ л}$$

Тоді,

$$Q_e = q_e \cdot n;$$

де  $q_e$  - норма водовідведення в л на одиницю продукції, яку випускає підприємство (орієнтовно можна прийняти відповідно до пройденої практики тобто 50-100 л);  $n$  - кількість одиниць продукції, що виробляється за зміну (розраховується у масових одиницях випуску готової продукції на добу).

$$Q_e = 50 \cdot 10,3 \approx 515 \text{ л/доба.}$$

Середні за зміну витрати побутових стічних вод становлять:

$$Q_n = q_n \cdot N = 25 \cdot 5 = 125 \text{ л/зміну,}$$

де  $q_n$  – норма відведення побутових стічних вод в л/зм на одного робітника (приймаємо для холодного цеху  $0,025 \text{ м}^3/\text{зм}$ );  $N$  – кількість робітників, що працюють у зміну, приймаємо 5:

1. Технолог цеху (біотехнолог): ця особа буде відповідати за процес культивування, збір та очищення біомаси з ферментера.

2. Мікробіолог ВКЯ (відповідальний за контроль якості): відповідає за контроль якості на різних етапах виробництва та забезпечує виконання стандартів GMP і вимог затверджених регулюючими органами.

3. Технік з обслуговування та ремонту обладнання: ця особа буде відповідати за обслуговування та ремонт обладнання в разі необхідності.

4. Керівник зміни: ця особа буде відповідати за керування роботою всіх працівників на зміні та вирішення питань, пов'язаних з виробництвом біомаси.

5. Санітарний робітник: цей працівник забезпечує дотримання правил санітарної гігієни та чистоти в цеху. Він займається підготовкою приміщень, дезінфікує обладнання та поверхні, контролює виконання правил особистої гігієни працівників, дотримання ними правил переодягання та захисту від шкідливих впливів, що забезпечує безпеку продукту та працівників [43].

Саме таку кількість робітників ми приймаємо, бо відповідно до вимог GMP варто мінімізувати кількість робітників на зміні, адже персонал це головне потенційне джерело контамінації. Також, якщо правильно провести процес оптимізації виробництва, то зменшення кількості робітників може допомогти знизити рівень помилок та підвищити рівень якості продукції.

Середні за добу витрати побутових стічних вод становлять:

$$Q_n = q_n \cdot N_{зм} = 125 \cdot 2 = 250 \text{ л/добу},$$

де  $N_{зм}$  – кількість змін на добу ( $N_{зм} = 2$ ).

Загальні витрати стічних вод, що утворюються на підприємстві, становлять:

$$Q = Q_e + Q_n + Q_a = 515 + 250 + 13.6 \text{ л} = 778.6 \text{ л/добу}.$$

Система очищення стічних вод для підприємства потребує спеціалізованого підходу для забезпечення ефективної очистки від забруднень та дотримання екологічних норм. Основні компоненти такої системи включають попередню

обробку, фізико-хімічну очистку, біологічну очистку та моніторинг і контроль якості.

На початковому етапі стічні води піддаються попередній обробці, яка спрямована на видалення великих твердих частинок, таких як осад. Це досягається за допомогою грубих фільтрів або сіток, що затримують великі забруднювачі. Механічне видалення великих частинок є важливим для запобігання засміченню обладнання на наступних етапах очищення.

Фізико-хімічна очистка. На цьому етапі додаються спеціальні хімічні речовини – коагулянти і флокулянти, які сприяють утворенню флокул – великих агрегатів дрібних частинок і забруднень. Сформовані флокули легше видаляються з води за допомогою фільтрації або осадження в спеціальних осадниках, що дозволяє значно зменшити концентрацію заражених речовин у воді.

Для подальшого розкладання органічних забруднень використовуються біологічні процеси. Це може бути здійснено за допомогою біологічних фільтрів або систем активного мулу. У цих системах бактерії і мікроорганізми розкладають органічні сполуки на більш прості речовини, такі як вуглекислий газ і вода. Цей етап є критичним для видалення біологічно розкладних забруднень.

Моніторинг і контроль якості є завершальним етапом у системі очищення стічних вод. Вони забезпечують постійний нагляд за якістю очищеної води, використовуючи сучасні методи і технології. Це включає регулярний відбір проб та аналіз на залишкові забруднення, що гарантує відповідність очищеної води екологічним стандартам перед її поверненням у навколишнє середовище або повторним використанням у виробництві.

Постійний моніторинг якості води на різних етапах очищення є важливою частиною системи. Це включає вимірювання параметрів, таких як рівень рН, концентрація розчиненого кисню, хімічне (ХСК) та біохімічне споживання кисню (БСК). Моніторинг дозволяє забезпечити відповідність якості води нормативним вимогам та ефективно керувати процесом очищення.

Ця комплексна система очищення стічних вод допомагає забезпечити ефективно та екологічно безпечно видалення забруднень, що дозволяє підприємству дотримуватися екологічних норм і стандартів.

### **9.3. Система знешкодження газоповітряних відходів**

Газоподібні відходи біотехнологічних виробництв виникають під час отримання посівного матеріалу та виробничого біосинтезу у вигляді використаного повітря, яке містить аерозольні частки клітин продуцента.

Розрахуємо об'єм відпрацьованого повітря, знаючи, що він приблизно дорівнює об'ємам аераційного повітря.

Для аерації ферментера потрібно 3 л/хв, тобто  $60 \times 3 = 180$  л/год. Процес отримання посівного матеріалу займає 48 год, для цього необхідно  $48 \times 180 = 8,640$  л аераційного повітря на виробничий цикл.

Оскільки виробництво дифтерійного анатоксину може створювати потенційно небезпечні відходи, для максимально ефективного очищення газоподібних відходів необхідно використовувати багатокомпонентну абсорційну камеру. Відпрацьоване повітря відчищується фізико-хімічним методом.

- Перша стадія – використання рідкого сорбента ( $H_2O_2$ ).
- Друга стадія - ультрафіолетове-опромінення.

Після обробки відпрацьоване повітря позбавлено контамінації патогенним мікроорганізмом, тож його можна повторно використовувати у виробництві, або безпечно випускати у навколишнє середовище.

### **9.4. Система знешкодження твердих відходів**

Тверді відходи на підприємстві включають різні категорії, такі як бруд на фільтрах, непридатні хімічні реактиви, пакувальні матеріали та скло. Фільтри можуть містити клітини продуценту, тому використані фільтри піддаються обробці в убойному автоклаві. Непридатні хімічні реактиви потребують спеціальних заходів для їх зберігання та утилізації. Їх слід зберігати у спеціальних відокремлених шафах і передавати спеціалізованим організаціям, які займаються обробкою небезпечних хімічних речовин відповідно до технологічних стандартів. Пакувальні матеріали необхідно сортувати, збирати в окремі контейнери з кришками і передавати на

переробку до пунктів вторинної переробки. Скло, як і інші відходи, слід збирати окремо і передавати на переробку до відповідних пунктів прийому вторсировини. Ці заходи сприяють ефективному використанню ресурсів і допомагають зменшити негативний вплив на навколишнє середовище.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. New *Corynebacterium* Species with the Potential to Produce Diphtheria Toxin; Marta Prygiel, Maciej Polak, Ewa Mosiej, Karol Wdowiak, Kamila Formińska and Aleksandra Anna Zasada [Наукова стаття] <https://www.mdpi.com/2076-0817/11/11/1264/htm>
2. Diphtheria toxin (DT) an overview, ScienceDirect [Електроний ресурс] [https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/diphtheria-toxin#:~:text=Diphtheria%20toxin%20kills%20cells%20by,synthesis%20\(Collier%2C%201967\).](https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/diphtheria-toxin#:~:text=Diphtheria%20toxin%20kills%20cells%20by,synthesis%20(Collier%2C%201967).)
3. Human antibodies neutralizing diphtheria toxin in vitro and in vivo. Esther Veronika Wenzel, Margarita Bosnak, Robert Tierney, Maren Schubert, Jeffrey Brown, Stefan Dübel, Androulla Efstratiou, Dorothea Sesardic, Paul Stickings, Michael Hust. 2022 . [Наукова стаття] <https://www.nature.com/articles/s41598-019-57103-5>
4. Optimization of Diphtheria Toxin Production by *Corynebacterium diphtheriae* Using a Casein-based Medium in a Fermenter; Yong-Ju Chung, Jin-A Lee, Mi-Young Jung, Sang-Mi Lee, Tae-Yeon Kim, Yong-Kyung Choe, and Ik-Hwan Kim; 2016 [Наукова стаття] <https://sci-hub.ru/https://link.springer.com/article/10.1007/s12257-016-0360-9>
5. Process Optimization for Enhanced Production Toxin by Submerged Cultivation; BHEEMAN SUNDARAN,\* Y. UDAYA BHASKARA RAO,' AND RATNAM BOOPATHY, 2001 [Наукова стаття] <https://sci-hub.ru/https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16232962/>
6. WHO: Manual for the production and control of vaccines. Diphtheria toxoid. BLG/UNDP/77-I Rev 1977 [Електроний ресурс] [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/70058/BLG\\_UNDP\\_77.1\\_Rev.1.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/70058/BLG_UNDP_77.1_Rev.1.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
7. Toxigenic *Corynebacterium* species: Building a modern bio-resource to counter an old disease; 2017 [Електроний ресурс] <https://www.culturecollections.org.uk/news/nctc-news/toxigenic-corynebacterium-species-building-a-modern-bio-resource-to-counter-an-old-disease.aspx>
8. *Corynebacterium diphtheriae* (Klebs-Löffler bacillus)- An Overview. *Sagar Aryal*. 2022 15(1) [Електроний ресурс]. <https://microbenotes.com/corynebacterium-diphtheriae/#morphology-of-corynebacterium-diphtheriae>
9. Т. П. Пирог. Загальна мікробіологія. 2010. Стр. 307 [Підручник]
10. *Corynebacterium diphtheriae*. Courtney Crowley. 2005 22(1). [Наукова стаття] [https://web.mst.edu/~djwesten/MoW/BIO221\\_2005/C\\_diphtheriae.htm](https://web.mst.edu/~djwesten/MoW/BIO221_2005/C_diphtheriae.htm)
11. Antimicrobial susceptibility of *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium ulcerans* in Germany. *Durdica V Marosevic, Anja Berger, Gunnar*

Kahmeter, Sarah Katharina Payer, Stefan Hörmansdorfer, Andreas Sing. 2020 03(8). [Наукова стаття] <https://academic.oup.com/jac/article/75/10/2885/5880199>

12. Центр громадського здоров'я МОЗ України. Дифтерія [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://phc.org.ua/kontrol-zakhvoryuvan/inshi-infekciyni-zakhvoryuvannya/krapelni-infekcii/difteriya>

13. Питання імунопрофілактики: навчальний посібник для лікарів інтернів педіатричного профілю / уклад. О. В. Усачова [та ін.]. – Запоріжжя : [ЗДМУ], 2014. – 121 с

14. Менше новонароджених, але більше шлюбів: оприлюднено дані держреєстрів за 2022 рік [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.slovoidilo.ua/2023/01/06/novyna/suspilstvo/menshe-novonarodzhenykh-bilshе-shlyubiv-oprylyudneno-dani-derzhreystriv-2022-rik>

15. Центр громадського здоров'я МОЗ України. РІВЕНЬ ОХОПЛЕННЯ ЩЕПЛЕННЯМИ ЗА 6 МІСЯЦІВ 2022 РОКУ В УКРАЇНІ НИЖЧЕ 40%: ЗАКЛИКАЄМО БАТЬКІВ НАДОЛУЖИТИ ПРОПУЩЕНІ ЩЕПЛЕННЯ ДІТЕЙ [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.phc.org.ua/news/riven-okhoplennya-sheplennyami-za-6-misyaciv-2022-roku-v-ukraini-nizhche-40-zaklikaemo-batkiv>

16. Інфанрикс комб. вакцина для проф. дифтерії правця кашлюку 1д/0.5мл шприц №1 [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://sanitas.ua/product/15517>

17. Sundaran, V., Udaya Bhaskara Rao, Y., & Boopathy, R. (2001). Process optimization for enhanced production of diphtheria toxin by submerged cultivation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 91(2), 123–128. doi:10.1016/s1389-1723(01)80053-0.

18. Основи проектування біотехнологічних виробництв [Електронний ресурс]: метод. рекомендації до викон. курс. проекту для здобувачів вищої освіти освіт. ступ. «бакалавр» спец.162 ««Біотехнології та біоінженерія» осв.-проф. прогр. «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна» ден. форми навч./ уклад. Т.П. Пирог, Ю.В. Карлаш, В.О. Красінько. – К.: НУХТ, 2022. – 79 с.

19. Medical Microbiology. 4th edition, Chapter 32Corynebacterium Diphtheriae; John R. Murphy, 1996 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7971/>

20. Костюченко Н.І. Біотехнологічні аспекти раціонального природокористування: навчальний посібник для здобувачів ступеня вищої освіти бакалавра напряму підготовки «Екологія, охорона навколишнього середовища та збалансоване природокористування» / Н.І. Костюченко. – Запоріжжя: ЗНУ, 2018. – 116 с.

21. Chung, Yong-Ju & Lee, Jin-A & Jung, Mi-Young & Lee, Sang-Mi & Kim, Tae-Yeon & Choe, Yong-Kyung & Kim, Ik-Hwan. (2016). Optimization of diphtheria toxin production by *Corynebacterium diphtheriae* using a casein-based medium in a fermenter. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 21. 537-543. 10.1007/s12257-016-0360-9.

22. Конспект лекцій з дисципліни «Асептика біотехнологічних виробництв» освітньо-професійної програми другого (магістерського) рівня вищої освіти зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» усіх форм навчання / Укл.: Головей О.П., Гуляєв В.М. – Кам'янське, ДДТУ, 2017 р., 140 с.
23. 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 : journal of the International Association of Biological Standardization*, 44(6), 534–539. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2016.08.002>
24. . Особливості дифтерії у дітей / О. К. Колоскова, Л. А. Іванова, У. І. Марусик, О. В. Белашова, М. Н. Гарас // Актуальна інфектологія. - 2014. - № 4. - С. 7-12.
25. Конспект лекцій з дисципліни “ Устаткування виробництва”. Для здобувачів вищої освіти бакалаврського рівня зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія». Укладач: В.М.Гуляєв. Кам'янське: ДДТУ, 2019. – 58с.
26. Лобова О.В., Левішко А.С., Гуменюк І.І. Біотехнології: Навч. посібник. – К.: Видавництво НУБіП України 2021. с. 548.
27. Big floor stand industrial exhaust ventilation centrifugal fan high speed air intake fans [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://www.alibaba.com/product-detail/big-floor-stand-industrial-exhaust-ventilation\\_1600807769236.html](https://www.alibaba.com/product-detail/big-floor-stand-industrial-exhaust-ventilation_1600807769236.html)
28. PANSET GS COARSE FILTERS Extended Surface Panel Filter [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://www.setfil.com/wp-content/uploads/2021/06/10\\_PANSET\\_GS\\_en.pdf](https://www.setfil.com/wp-content/uploads/2021/06/10_PANSET_GS_en.pdf)
29. CLARKE XE37/270 (O/L) 36CFM 270LITRE 2X4HP INDUSTRIAL AIR COMPRESSOR (230V) [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.machinemart.co.uk/p/clarke-xe37200-ol-industrial-air-compressor-23/>
30. Wondervo Copper Tube Aluminum Fin Heat Exchanger Commercial Air Conditioner Condenser heat pump air heat exchanger [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://www.alibaba.com/product-detail/Wondervo-Copper-Tube-Aluminum-Fin-Heat\\_1600705178767.html](https://www.alibaba.com/product-detail/Wondervo-Copper-Tube-Aluminum-Fin-Heat_1600705178767.html)
31. Повітрозбірник, ресивер для стисненого повітря 270 л 0,27 м3 (Р 270, Р270, Р 270.500, Р270.500, РВ270, РВ 270) [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://entech-ukraine.dp.ua/ua/p522993220-vozduhosbornik-resiver-dlya.html>
32. Air Filter [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.definefiltration.com/air-filter.html>
33. Laboratory Scale PCE-BT 2000-ICA incl. ISO Calibration Certificate [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://www.pce-instruments.com/english/weighing-equipment/scales-and-balances/lab-scales-laboratory-scales-pce-instruments-laboratory-scale-pce-bt-2000-ica-incl.-iso-calibration-certificate-det\\_6046047.htm?\\_list=kat&\\_listpos=11](https://www.pce-instruments.com/english/weighing-equipment/scales-and-balances/lab-scales-laboratory-scales-pce-instruments-laboratory-scale-pce-bt-2000-ica-incl.-iso-calibration-certificate-det_6046047.htm?_list=kat&_listpos=11)

34. Lab 20L Chemical Equipment Glass Reactor High Borosilicate Glass Reactor [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://www.alibaba.com/product-detail/Lab-20L-Chemical-Equipment-Glass-Reactor\\_1600250996027.html](https://www.alibaba.com/product-detail/Lab-20L-Chemical-Equipment-Glass-Reactor_1600250996027.html)

35. PERISTALTIC PUMP IPL10/100 [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.espango.it/eng/product/peristaltic-pumps/peristaltic-pumps/peristaltic-pump-ipl10100/d6d2ba9dc5d168eb9d7ce99b75b9b799/>

36. Filson sterile air filters [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.filsonfilters.com/sterile-air-filters/>

37. 50L Two-layer Borosilicate Bioreactor GR-50L [Електронний ресурс].  
Режим доступу: [https://www.bio-equip.cn/enshow1equip\\_pc.asp?equipid=28420&division=1403](https://www.bio-equip.cn/enshow1equip_pc.asp?equipid=28420&division=1403)

38. Красінко В.О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв: конспект лекцій – К.: НУХТ, 2019. – 252 с

39. Lyng, J. (1990). Quantitative estimation of diphtheria and tetanus toxoids. 4. Toxoids as international reference materials defining Lf-units for diphtheria and tetanus toxoids. *Biologicals*, 18(1), 11–17. doi:10.1016/1045-1056(90)90063-6

40. European Pharmacopoeia Monograph Flocculation Value (Lf) of diphtheria and tetanus toxins and toxoids (Ramon assay). 9th Edition 01/2008:20727

41. De Medina, H. L., de Vargas, M. C., Marin, J., & Pirela, D. (1994). Determination of total nitrogen in water samples by means of high-pressure bombs and ion chromatography. *Journal of Chromatography A*, 671(1-2), 287–293. doi:10.1016/0021-9673(94)80252-1

42. Навчально-методичний посібник "Технології захисту водного середовища" для спеціальностей 101"Екологія", 183 «Технології захисту навколишнього середовища» всіх форм навчання / Полтава: НУ «Полтавська політехніка імені Юрія Кондратюка», Миколаїв: Національний університет кораблебудування імені адмірала Макарова. 2022. – 306 с. [Електронний ресурс].  
Режим доступу:

<https://reposit.nupp.edu.ua/bitstream/PolNTU/11307/1/%D0%9D%D0%B0%D0%B2%D1%87%D0%BF%D0%BE%D1%81%D1%96%D0%B1%D0%A2%D0%B5%D1%85%D0%BD%D0%BE%D0%BB%D0%BE%D0%B3%D1%96%D1%97%20%D0%B7%D0%B0%D1%85%D0%B8%D1%81%D1%82%D1%83%20%D0%B2%D0%BE%D0%B4%D0%BD%D0%BE%D0%B3%D0%BE%20%D1%81%D0%B5%D1%80%D0%B5%D0%B4%D0%BE%D0%B2%D0%B8%D1%89%D0%B0.pdf>

43. Вимоги до персоналу на виробництвах відповідно до стандартів GMP [Електронний ресурс]

[https://www.google.com/search?q=gmp+%D0%BA%D1%96%D0%BB%D1%8C%D0%BA%D1%96%D1%81%D1%82%D1%8C+%D0%BF%D0%B5%D1%80%D1%81%D0%BE%D0%B0%D0%BB%D1%83&sca\\_esv=b061e2632347ae6b&sxsrf=ADLYWIKVzk6vWScNv8quv5C6MGsfFijcg%3A1717523393877&ei=wVNfZombNf2Lxc8Ps4i7yAw&ved=0ahUKEwj\\_6OewcKGAX9RfEDHTPEDskQ4dUDCBA&uact=5&oq=gmp+%D0%BA%D1%96%D0%BB%D1%8C%D0%BA%D1%96%D1%81%D1%82%D1%8C+%D0%BF%D0%B5%D1%80%D1%81%D0%BE%D0%B0%D0%BB%D1%83](https://www.google.com/search?q=gmp+%D0%BA%D1%96%D0%BB%D1%8C%D0%BA%D1%96%D1%81%D1%82%D1%8C+%D0%BF%D0%B5%D1%80%D1%81%D0%BE%D0%B0%D0%BB%D1%83&sca_esv=b061e2632347ae6b&sxsrf=ADLYWIKVzk6vWScNv8quv5C6MGsfFijcg%3A1717523393877&ei=wVNfZombNf2Lxc8Ps4i7yAw&ved=0ahUKEwj_6OewcKGAX9RfEDHTPEDskQ4dUDCBA&uact=5&oq=gmp+%D0%BA%D1%96%D0%BB%D1%8C%D0%BA%D1%96%D1%81%D1%82%D1%8C+%D0%BF%D0%B5%D1%80%D1%81%D0%BE%D0%B0%D0%BB%D1%83)

[D0%BF%D0%B5%D1%80%D1%81%D0%BE%D0%B0%D0%BB%D1%83&gs\\_lp=Eg  
xnd3Mtd2l6LXNlcnAiJ2dtcCDQuTGW0LvRjNC60ZbRgdGC0Ywg0L\\_QtdGA0YHQvtC  
w0LvRgzIJECEYoAEYChgqSPJeUJUqWMNdcAR4AZABAZgBjgGgAfsUqgEEOC4xN  
7gBA8gBAPgBAZgCHKAC2xTCAgoQABiwAxjWBBhHwgIKECMYgAQYJxiKBcICC  
xAuGIAEGJECGIoFwgILEAAyGaqYkQIYigXCAgUQABiABMICCxAuGIAEGNED  
GMcBwgIHEAAyGaqYCsICDRAuGIAEGNEDGMcBGArCAgsQLhiABBjHARivAcI  
CCBAAGIAEGMsBwgIGEAAYFhgewgIFECEYoAHCAgUQIRifBcICBxAhGKABGAq  
YAwCIBgGQBgOSBwUxMS4xN6AH2Fg&scient=gws-wiz-  
serp#vhid=zephyr:0&vssid=atritem-https://www.dls.gov.ua/wp-  
content/uploads/2018/10/GMP-1\\_2016.pdf](https://www.dls.gov.ua/wp-content/uploads/2018/10/GMP-1_2016.pdf)

44. Фільтр повітряний касетний, клас фільтрації F9 [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://ventfilter.kiev.ua/goods/filtr-vozdushniy-kassetniy-klass-filtratsii-f9/>

45. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes [Електронний ресурс] <https://www.genome.jp/pathway/cdw00010>

46. Полігексаметиленбігуанід гідрохлорид. SuperAgronom.com, 2016-2020. . [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://superagronom.com/substance/poligeksametilenbiguanid-gidrohlorid-id17955>

47. Дезинфицирующее средство "Легион Санитайзер" 0,5 % универсальный 10 л. ТОВ "Аверленд", 2020. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://prom.ua/p1158574611-dezinfitsiruyuschee-sredstvo-legion.html>

48. Інструкція щодо застосування дезінфекційного засобу «ЛЕГІОН САНІТАЙЗЕР» (LEGION SANITIZER) з метою дезінфекції та достерилізаційного очищення, Біосанлайф, 2018. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://biosan.kiev.ua/ua/produkcija/organichni-dezinfektantiv-aboorganichni-dezinfikuyuchi-zasobi.html>

49. Інструкція щодо застосування дезінфікуючого засобу з мийною властивістю «ЛАСЕПТ 344-М», Харків, 2013. [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://lasept.com.ua/sites/default/files/manuals/instrukciya\\_lasept\\_344-m\\_pticya.pdf](https://lasept.com.ua/sites/default/files/manuals/instrukciya_lasept_344-m_pticya.pdf)

50. Методичні вказівки щодо застосування засобу “ДЕЗАНОЛ ОКСО” з метою дезінфекції, стерилізації та достерилізаційного очищення. ТОВ “Ордема”, Київ, 2013 . [Електронний ресурс]. Режим доступу: [file:///E:/Downloads/mv\\_dezanol\\_okso.pdf](file:///E:/Downloads/mv_dezanol_okso.pdf)