МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет)__біотехнології та екологічного контролю__
Кафедра _____біотехнології і мікробіології_____

«До захисту в ЕК»		**«До захисту допущено»**	
Директор інституту(декан факультету)		Завідувач кафедри	
_____	__Наталія ГРЕГІРЧАК__	_____	_Віктор СТАБНІКОВ_
(підпис)	(ім'я та прізвище)	(підпис)	(ім'я та прізвище)
«___» _____ 20__р.		«___» _____ 20__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___Біосинтез рекомбінантного альбуміну *Escherichia coli* _____

Виконав: здобувач__5__ курсу, групи__1___

___САВЧУК Ксєнія Олександрівна_____ _____
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник ___СКРОЦЬКА Оксана Ігорівна_____ _____
(прізвище , ім'я та по батькові повністю) (підпис)

Консультанти_____ _____
(ім'я та прізвище) (підпис)

_____ _____
(ім'я та прізвище) (підпис)

_____ _____
(ім'я та прізвище) (підпис)

Рецензент _____ _____
(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 – 2023 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю
Кафедра біотехнології і мікробіології
Освітній ступінь **бакалавр**
Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код і назва)
Освітньо-професійна програма «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна»
(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ
Завідувач кафедри біотехнології і мікробіології
Віктор СТАБНІКОВ
"01" листопада 20 22 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

САВЧУК Ксєнії Олександрівни
(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Біосинтез рекомбінантного альбуміну *Escherichia coli*

керівник роботи СКРОЦЬКА Оксана Ігорівна доц, к.б.н.,
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)
затверджені наказом закладу вищої освіти від 31 жовтня 2022 року № 781-кс

2. Строк подання здобувачем роботи 31 січня 2023 р.

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Escherichia coli*, цільовий продукт: рекомбінантний альбумін, об'єм ферментера 100 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. Обґрунтування вибору технологічної схеми. РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання. РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми. РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва. РОЗДІЛ 8. Охорона довкілля

5. Перелік графічного матеріалу
Технологічна схема виробництва рекомбінантного альбуміну – 1 аркуш формату А1. Апаратурна схема виробництва альбуміну – 1 аркуш формату А2.

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання____01 листопада 2022 року_____

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Характеристика цільового продукту	01.11.2022 – 10.11.2022	
2	Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	11.11.2022 – 15.11.2022	
3	Техніко-економічне обґрунтування	16.11.2022 – 27.11.2022	
4	Обґрунтування вибору технологічної схеми	28.12.2022 – 02.01.2023	
5	Специфікація обладнання	02.01.2023 – 09.01.2023	
6	Опис технологічної схеми біосинтезу	10.01.2023 – 15.01.2023	
7	Контроль виробництва	16.01.2023 – 20.01.2023	
8	Охорона довкілля	20.01.2023 – 22.01.2023	
9	Оформлення пояснювальної записки	22.01.2023 – 23.01.2023	
10	Виконання графічної частини проекту	23.01.2023 – 31.01.2023	

Здобувач _____ ____Ксєнія САВЧУК_____
(підпис) (ім'я та прізвище)

Керівник роботи _____ ____Оксана СКРОЦЬКА____
(підпис) (ім'я та прізвище)

ЗМІСТ

Реферат 6

ВСТУП 7

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ 9

РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА 14

2.1 Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування 14

2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента 16

2.2.1 Морфолого-культуральні ознаки 16

2.2.2. Фізіолого-біохімічні ознаки 17

2.3. Таксономічний статус біологічного агента 17

РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обгрунтування 18

3.1. Потреба населення України в Альбуміні 18

3.2. Розрахунок потужності виробництва Альбуміну 23

3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів для отримання річної потреби цільового продукту і об’єму ферментера 25

3.4 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу 26

3.5. Біосинтез рекомбінантного альбуміну 28

3.5.1. Одержання мутантного штаму 28

3.5.2. Схема біотрансформації ростового субстрату 29

РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА 31

4.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера 31

4.1.1. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів 33
4.2. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища 35
РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ 36
РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ 39
РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА 50
7.1. Карта постадійного контролю доферментаційних процесів 50
7.2. Мікробіологічний контроль 55
7.3. Показники росту і синтезу цільового продукту 63
7.3.1. Визначення концентрації джерела азоту та вуглецю 63
7.3.2. Визначення концентрації цільового продукту 65
РОЗДІЛ 8. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ 68
8.1. Аналіз технологічної схеми виробництва альбуміну на місця емісії твердих, рідких та газоподібних відходів 68
8.2. Перспективи впровадження системи екологізації виробництва 70
8.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів 70
8.2.2. Система знешкодження та утилізації твердих відходів 74
8.2.3. Система знешкодження газоповітряних викидів 75
8.2.4. Заходи щодо зменшення об’ємів відходів 76
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ 77

Реферат

У кваліфікаційній роботі дано обґрунтування та викладено технологічний процес біосинтезу біомаси *Escherichia coli*, який включає блок допоміжних робіт (підготовка і стерилізація поживних середовищ, розчинів для підтримання рівня pH під час культивування), стадії підготовки посівного матеріалу та вирощування культури у виробничому ферментері.

Наведено техніко-економічне обґрунтування потреби у використанні Альбуміну та Рекомбінантного Альбуміну. Розраховано потужність виробництва Альбуміну.

Наведено склад поживного середовища для культивування *Escherichia coli*. З урахуванням складу поживного середовища запропоновано схему його підготовки та підібрано режими стерилізації. Розраховано необхідну кількість стадій підготовки посівного матеріалу. Розроблено апаратурну та технологічну схеми виробництва. Описано контроль і перспективи впровадження системи екологізації виробництва.

Дана робота включає в себе вступ, 8 розділів, а також список використаних літературних джерел. Сумарно праця складається із 82 сторінок, 13 таблиць, 7 рисунків, 64 літературних джерел, та 2 креслення: 1 аркуш формату А1 (технологічна схема) і 1 аркуш формату А2 (апаратурна схема).

Ключові слова: *альбумін, Escherichia coli, поживне середовище, культивування.*

ВСТУП

Завдяки терапевтичному потенціалу людського сироваткового альбуміну, що використовується для лікувань певної кількості хвороб, що будуть описані далі в роботі – світова потреба в HAS перевищила 500 тонн. Відомо, що HSA отримують шляхом фракціонування зібраної плазми крові людини[35]. Кров є обмеженим і небезпечним джерелом для виробництва терапевтичних засобів для людини. Бо, це джерело має ризик зараження збудниками крові, такими як ВІЛ, гепатит і решта. Тому, ***актуальність*** нашої теми полягає в тому, щоб усунути ризик такого забруднення шляхом біосинтезу rHSA. Також, ця робота розкриває тему просування альтернативних методів нетваринного походження для отримання достатньої кількості rHSA.

Новизна проекту полягає у тому, що використовуючи систему господаря E. coli, яка швидко зростає та масштабується за низької вартості бродіння, як продуцент для посилення функціонального виробництва rHSA, ми заповнюємо прогалини в літературі. Адже останніми десятиріччями через утворення білка з надмірною експресією системою хазяїна *E. coli* для виробництва rHSA нехтували

Отже, в цій роботі ми використали можливості *E. Coli* як господаря для посиленого функціонального виробництва rHSA (~60% від загального експресованого rHSA у розчинній фракції).

Escherichia coli (*E. Coli*) — грамнегативна паличкоподібна факультативно-анаеробна бактерія. Цей мікроорганізм вперше був описаний Теодором Ешеріхом у 1885 році. Більшість штамів *E. Coli* нешкідливо колонізують шлунково-кишковий тракт людей і тварин як звичайна флора.

З усіх систем-господарів *E. Coli* є одним із найзручніших господарів, який сприяв виробництву понад 30% рекомбінантних фармацевтичних препаратів, схвалених FDA. Кишкова паличка — це генетично та фізіологічно добре охарактеризований організм, який швидко росте та досягає високої щільності клітин за допомогою недорогих і простих субстратів. Число обертів ферментаційної партії для культури кишкової палички становить 300 на рік, що набагато більше, ніж будь-яка з доступних систем-господарів[61]. Таким чином, рекомбінантні продукти, отримані з кишкової палички, мають більший економічний потенціал, оскільки процеси бродіння дешевші порівняно з іншими доступними господарями експресії.

Мета роботи: розроблення технології культивування штаму *Escherichia coli* для посилення функціонального виробництва rHSA з високим виходом.

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

Одним з найбільш затребуваних терапевтичних білків, який користується величезним застосуванням у біотехнологіях є - Людський сироватковий альбумін (HSA) - це великий багатодоменний білок, що містить 17 дисульфідних зв'язків[43].

- Діюча речовина - Альбумін людини.
- Міжнародна непатентована назва - Albumin.
- European Pharmacopoeia monograph (0255) - Human Albumin solution.
- Інші назви - Альбумін людини, Альбумін, Albuminum (латинською.)

Відомо, що плазма крові людини (що є джерелом HSA) обмежене та небезпечне джерело. Тому, існує нагальна потреба сприяти виробництву рекомбінатного HSA (rHSA) нетваринного походження. Найзручнішим господарем є ***Escherichia coli***, що сприяє виробництву понад 30% рекомбінантних фармацевтичних препаратів, схвалених FDA. Його перевага складається в швидкому рості та досягненні високої щільності клітин за допомогою недорогих і простих субстратів[36].

Основним вузьким місцем у використанні ***E. Coli***, як господаря для багатого дисульфідом багатодоменного білка, є утворення агрегатів білка з надлишковою експресією. Більшість експресованого HSA утворює тільця включення (понад 90% від загального експресованого rHSA) у цитозолі ***E. coli*** .

Надаємо хімічну формулу аміноскладу білку **Альбуміну**:

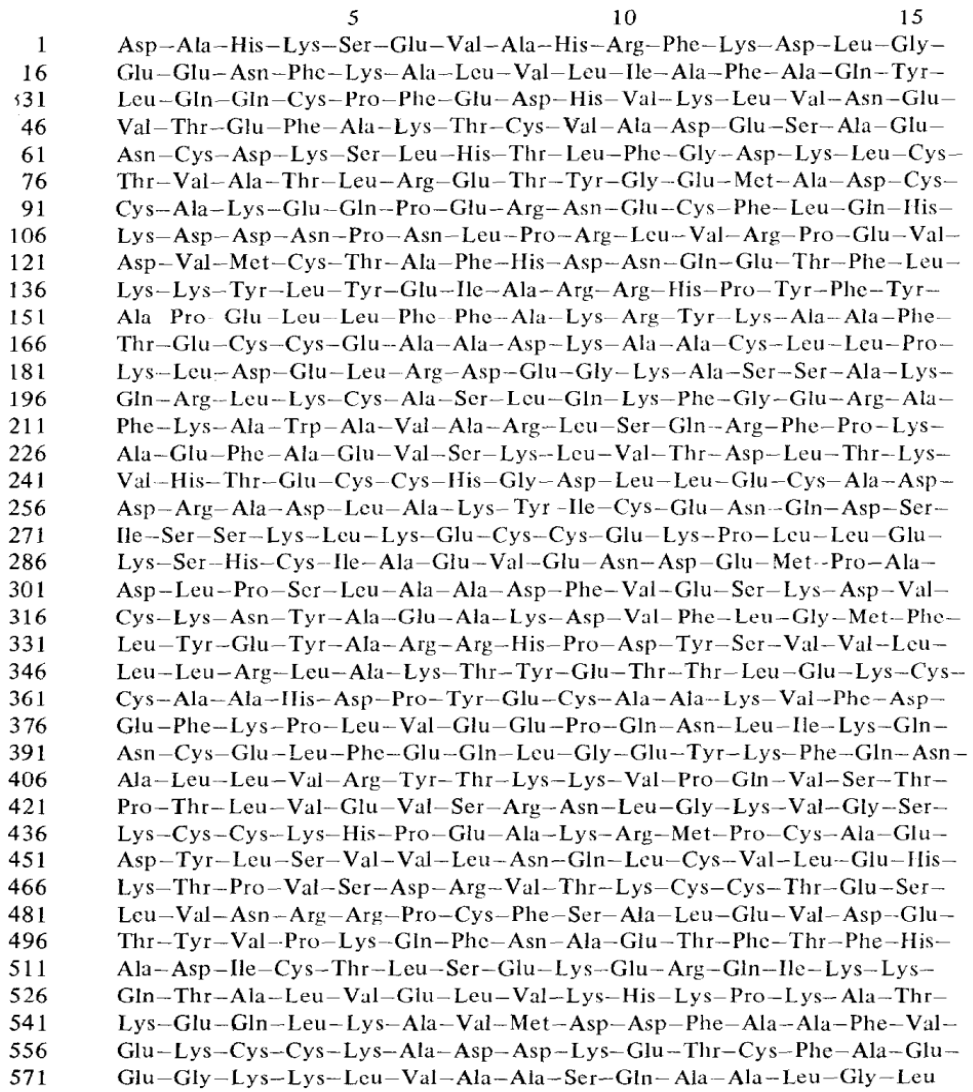


Рис. 1.1. Аміносклад білку Альбуміну

Щодо властивостей альбуміну людини:

При внутрішньовенному введенні (реципієнту) - **альбумін** підтримує онкотичний тиск циркулюючої крові, швидко підвищує артеріальний тиск, сприяє надходженню тканинної рідини в кров'яне русло і утриманню її. Також, бере участь в обмінних процесах між тканинами і кров'ю, є джерелом білкового харчування організму.

Молекула альбуміну несе негативний заряд, але може зворотньо зв'язуватись як з катіонами так і з аніонами, що є важливим для виконання його функцій транспорту або інактивації цілого ряду речовин,

у тому числі мікроелементів, ліків, барвників, жирних кислот, гормонів та ферментів.

Ізоелектрична точка альбуміну визначається в інтервалі pH *4.4-5.4* залежно від ступеня насиченості середовища солями.

Розчин альбуміну – це прозора в'язка рідина від жовтуватого до світло-коричневого кольору, допускається зеленуватий відтінок.

pH розчину альбуміну з концентрацією білку є : *10 г/л – від 6.7 до 7.3*[29].

На рахунок місця в класифікації БАР:

Альбумін – являє собою глобулярний білок, що належить до групи простих протеїнів.

Людський білок являє собою мономерний одноланцюговий неглікозильований серцеподібний білок масою 66,5 кДа, що складається з трьох гомологічних доменів, що містять 585 амінокислот, включаючи 35 залишків цистеїну, які беруть участь в утворенні 17 дисульфідних зв'язків.

Молекула альбуміну за вторинною структурою демонструє собою сильно загвинчену спіраль. Третинною структурою молекули альбуміну є глобула, яка утворює три кооперативних домени. Молекула альбуміну має один залишок триптофану (Trp 214) і вільну сульфгідрильну групу цистеїну (Cys 34). Схематичне зображення молекули альбуміну представлене на рисунку 1.2..

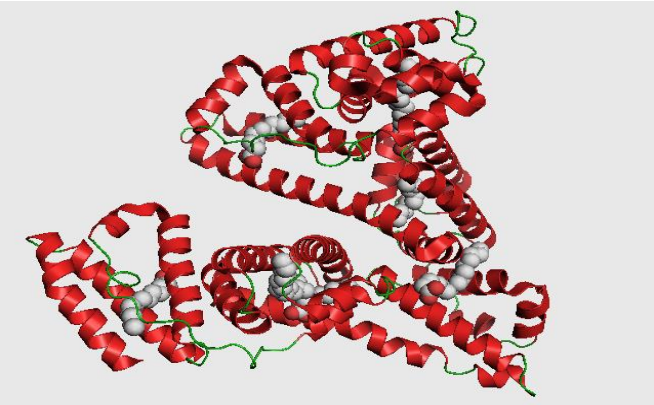


Рис. 1.2. Схема зображення молекули альбуміну

Узагальнений амінокислотний склад молекули альбуміну, яка складається з єдиного поліпептидного ланцюга і містить 585 амінокислотних залишків: Lys_{59}, His_{16}, Arg_{24}, Asp_{53}, Thr_{28}, Ser_{24}, Glu_{82}, Pro_{24}, Gly_{12}, Ala_{62}, Cys_{35}, Val_{41}, Met_{6}, Ile_{8}, Leu_{61}, Tyr_{18}, Phe_{31}, Trp.

Молекулярна маса альбуміну, розрахована на базі його амінокислотного складу становить – 66.500 дальтон. Повна амінокислотна послідовність сироваткового альбуміну людини представлена на рисунку 1.1[43].

Основне призначення продукції:

HSA — це розкішний, неглікозильований, найбільш універсальний білок-носій у плазмі, що виконує численні функції. Він має покращену фармакокінетику, подовжений період напіврозпаду в циркуляції, підвищену ефективність, знижену токсичність.

Загалом терапевтичні системи на основі HSA можна розділити на чотири категорії, тобто ***HSA-наночастинки ліків***, ***HSA-кон'югати ліків***, ***проліки***, що зв'язують HSA, і ***рекомбінантні*** злиті білки на основі HSA: останні в основному включають білки злиття антитіл (доменів) і цитокінів.

Досягнення в цій галузі виявили переваги систем на основі HSA у розробці орієнтованих на пухлину терапевтичних засобів, частково посилаючись на ефект посиленого проникнення та утримання (EPR) та інтенсивний макропіноцитоз. Відповідно, повідомлялося про різноманітні технічні платформи для розробки та підготовки терапевтичних засобів на основі HSA.

В основні стратегії та напрямки розвитку лікарських засобів включають:

- Орієнтацію на місце пухлини доставку ліків і посилене утримання ліків;
- Вивільнення та активацію проліків у місці пухлини;
- Інтенсивну інтерналізацію ліків у ракових клітинах;
- Імуномодуляцію, спрямовану на мікрооточення пухлини (TME).

Слід зазначити, що мультимодальний підхід на основі HSA є перспективним для розробки орієнтованих на пухлину терапевтичних засобів для лікування раку[36].

РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

2.1 Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування

Людський сироватковий альбумін (HSA) — один із найбільш затребуваних терапевтичних білків із величезним застосуванням у біотехнологіях — це великий багатодоменний білок, що містить 17 дисульфідних зв’язків.

HSA є головним чинником колоїдно-онкотичного тиску плазми, універсальним транспортним і депо-білком для багатьох ендогенних і екзогенних метаболітів і ліків, а також демонструє різноманітну важливу ферментативну, протизапальну та антиоксидантну активність[47].

Клінічно HSA використовували для лікування кількох захворювань, включаючи серйозні опіки, геморагічний шок і асцит, викликаний цирозом печінки. HSA також використовується як допоміжна речовина для вакцин, добавка до клітинного культурального середовища, транспорт кисню, нанодоставка ліків і в різних інших біотехнологічних застосуваннях.

Поточним джерелом HSA є плазма крові людини, яка, як ми зазначили вище, є обмеженим і небезпечним джерелом. Таким чином, існує нагальна потреба сприяти виробництву рекомбінантного HSA (rHSA) нетваринного походження. ***Escherichia coli*** є одним із унікальних і універсальних господарів, який сприяв виробництву понад 30% рекомбінантних фармацевтичних препаратів, схвалених FDA[53].

Оскільки наш промисловий продуцент, несе у собі вектор експресії білка нехарактерного для нього, необхідно провести індукцію вектора поживним середовищем.

Є спеціалізовані середовища для індукції векторів та посиленого росту штамів-продуцентів, задля компенсації енергетично-невигідного процесу синтезу нехарактерного метаболічного продукту. Для нашого штаму ***E.coli*** Origami2(DE3) з вектором HSA - рекомендоване використання середовища - ZYM-5052[40], яке автоіндукує синтези специфічної плазміди pET23b. Нижче наведений склад цього середовища у розрахунку на 1 літр стерильної води:

Таблиця 2.3.1 Склад ZYM-5052 (розрахунок на 1л стерильної води)

№	**Компонент**	**Концентрація (г/л)**
1	Триптон	10
2	Дріжджовий екстракт	5
3	Na2HPO4	3.55
4	KH2PO4	3.4
5	NH4Cl	2.68
6	Na2SO4	0.71
7	Гліцерин	5
8	Глюкоза	0.5
9	Лактоза	2
10	MgSO4	0.24

Контрольний pH має скласти - 6.8 (відхилення на 0.1 є допустимим)

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

2.2.1 Морфолого-культуральні ознаки

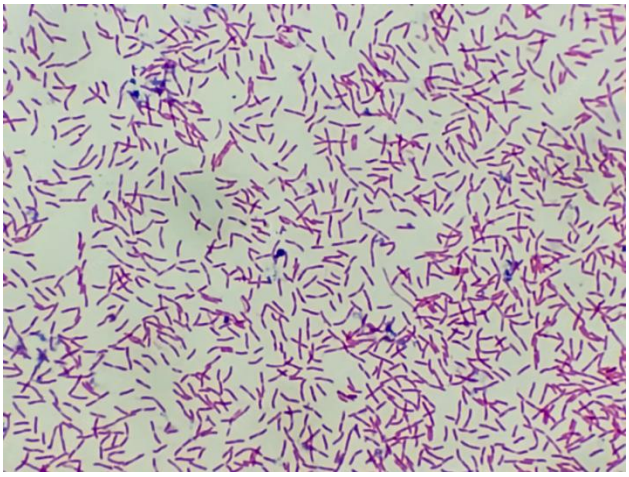


Рис.2.2.1. Зображення колоній E. coli під мікроскопом

E. coli - грамнегативна бактерія, факультативний анаероб, що не утворює ендоспор. Клітини паличкоподібні, зі злегка закругленими кінцями, розміром 0,4-0,8 × 1-3 мкм; об'єм клітини становить близько 0,6-0,7 мкм. В анаеробних умовах ***E. coli*** утворює як продукт життєдіяльності: лактат, сукцинат, етанол, ацетат і вуглекислий газ. Часто при цьому, утворюється молекулярний водень, який заважає утворенню зазначених вище метаболітів, тому ***E. coli*** часто співіснує з мікроорганізмами, що споживають водень, наприклад, з метаногенами або бактеріями, що відновлюють сульфат.

Оптимальні показники для росту досягаються культурами ***E. coli*** за температури 37°C. Зростання може стимулюватися аеробним або анаеробним диханням, різними парами окислювачів і відновників, у тому числі окисленням пірувату, форміату, водню, амінокислот, а також відновленням кисню, нітрату, диметилсульфоксиду та триметиламін N-оксиду.

Деякі щтами, мають джгутики, тому здатні пересуватися. В такому випадку, джгутики розташовані перитрихіально[39].

2.2.2. Фізіолого-біохімічні ознаки

Для трансформації використовується лабораторний-штам Origami2(DE3). Штами-господарі Origami2 є похідними K-12, які мають мутації в генах тіоредоксинредуктази (trxB) і глутатіонредуктази (gor), що значно посилює утворення дисульфідних зв'язків у цитоплазмі ***E. coli***. Цей штам рекомендований для виробництва у біотехнології білків, які потребують утворення дисульфідного зв'язку для правильного згортання.

За даними, що надають бази даних API 20E біохімічно цей штам характеризується наявністю - β-галоктозидази, лізин-декарбоксилази. Також здатний до продукції індолу, ферментації D-глюкози та D-манітолу, раманози, сорбітолу, мілібіози[53].

2.3. Таксономічний статус біологічного агента

Таблиця 2.3.1 Таксономічний статус ***Escherichia coli***

Домен:	*Бактерії (Bacteria)*
Тип:	*Proteobacteria*
Клас:	*Gamma Proteobacteria*
Ряд:	*Enterobacteriales*
Родина:	*Enterobacteriaceae*
Рід:	*Escherichia*
Вид:	*Escherichia coli*
Штам:	*Escherichia coli Origami2(DE3)*

РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обгрунтування

3.1. Потреба населення України в Альбуміні

У 2018 році було опубліковано рекомендації Національної консультативної групи Шотландії з питань використання плазмозамінників, зокрема розчинів альбуміну. В зазначених рекомендаціях було підтверджено настанови японських спеціалістів стосовно того, що альбумін є ефективним прогноз-модифікуючим препаратом у хворих на наступні види захворювання[30]:

- ***Цироз печінки . Асцит у пацієнтів із цирозом печінки***

У пацієнтів із цирозом печінки та асцитом, які отримують терапію діуретиками, альбумін впливає на прискорення зменшення асциту, запобігає його рецидиву та сприяє покращенню прогнозів після тривалого прийому[50].

- ***Парацентез великого об'єму***

При видаленні ≤4-5 л асцитичної рідини під час процедури парацентезу застосовувати альбумін не рекомендують. Адже індукована парацентезом дисфункція кровообігу може бути усунена шляхом заміщення електролітів. У випадку видалення більшого об'єму асцитичної рідини ефективним є гіпертонічний розчин альбуміну в дозі 8-10 г на 1 л асцитичної рідини.

- ***Спонтанний бактеріальний перитоніт***

Ефективним є застосування гіпертонічного розчину альбуміну в дозі 1,5 г/кг маси тіла протягом 6 год після встановлення діагнозу спонтанного бактеріального перитоніту з нирковою недостатністю та в подальшому в дозі 1 г/кг маси тіла на 3-й день захворювання.

- ***Гепаторенальний синдром***

Застосування гіпертонічного розчину альбуміну та вазоконстрикторів є ефективним у терапії гепаторенального синдрому 1-го типу. Альбумін слід уводити в дозі 1 г/кг маси тіла в перший день захворювання та в дозі 20-40 г/кг маси тіла в наступні дні у комбінації з терліпресином та іншими препаратами.

- ***Плазмаферез***

1. Плазмаферез із застосуванням ізотонічного або розведеного гіпертонічного розчину альбуміну у якості замісної рідини (1-1,5-кратний об’єм плазми за сеанс) рекомендований для лікування неврологічних розладів, таких як хронічна запальна демієлінізуюча полінейропатія та синдром Гієна – Барре[32].

2. Плазмаферез із застосуванням ізотонічного або розведеного гіпертонічного розчину альбуміну у якості замісної рідини в комбінації з імунодепресантами рекомендований для видалення антитіл анти-А або анти-В при АВ0-несумісному переливанні крові.

3. Плазмаферез із застосуванням ізотонічного або розведеного гіпертонічного розчину альбуміну у якості замісної рідини можна використовувати при розсіяному склерозі або при множинній мієломі чи макроглобулінемії, але терапевтична ефективність цієї процедури є тимчасовою.

- ***Набряк легень та виражені периферичні набряки***

У пацієнтів зі стійким до лікування набряком легень або вираженими периферичними набряками використання гіпертонічного розчину альбуміну розглядається лише у випадку вираженої гіпоальбумінемії .

▪ ***Нефритичний синдром***

При нефритичному синдромі з рефрактерними набряками або набряком легень гіпертонічний розчин альбуміну є лише тимчасово ефективним і має використовуватися винятково як акт необхідності.

▪ ***Гострий панкреатит***

Ізотонічний розчин альбуміну слід застосовувати у випадках гіповолемічного шоку, пов’язаного з гострим панкреатитом

▪ ***Гіповолемічний шок***

1. У пацієнтів із гіповолемією, які потребують інфузійної терапії для підтримання або відновлення ОЦК, використання альбуміну не пов’язане із покращенням смертності порівняно із застосуванням кристалоїдів.

2. Введення альбуміну для заміщення гіповолемії, вторинної після травми, хірургічного втручання тощо, може потенційно покращувати захворюваність[24].

▪ ***Сепсис та септичний шок***

Пропонують використовувати розчин альбуміну для інфузійної терапії тяжкого сепсису та септичного шоку, коли пацієнти потребують уведення великого об’єму кристалоїдів. При ініціальному лікуванні пацієнтів із тяжким сепсисом уведення альбуміну стабілізує гемодинаміку (слабка рекомендація, рівень доказовості С).

▪ ***Серцево-судинна хірургія***

Незважаючи на суперечливість даних застосування розчинів альбуміну під час операцій на відкритому серці все ж таки рекомендовано, проте з обережністю.

Але, нещодавно, у 2020 році, огляд літератури з використанням розчинів ***Альбуміну*** в інтенсивній терапії також підтвердив попередні рекомендації щодо доцільності призначення альбуміну у пацієнтів із декомпенсованим цирозом печінки. Питання щодо його використання при сепсисі та септичному шоці наразі залишається дискусійним[41].

У цієї категорії хворих ***Альбумін*** пропонується як терапія другої лінії, якщо реакція на введення кристалоїдів є недостатньою. Проте у критично тяжких хворих 90-денний рівень виживаності суттєво не відрізнявся при лікуванні ***Альбуміном*** або кристалоїдами у якості терапії першої лінії (відносний ризик 0,98; 95% ДІ 0,92-1,04).

Пацієнти, які отримували ***Альбумін***, перебували менше днів на апараті штучної вентиляції легень і потребували менше вазо-пресорної терапії порівняно з пацієнтами, які отримували кристалоїди (середня різниця – 1,10 та 1,04 відповідно).

- Рекомендована доза становить 500 мл 5% розчину альбуміну, яку можна повторно вводити кожні 30 хв у разі необхідності[60].

Рекомендації 2020 року, з пацієнтами із тяжкими термічними опіками, пропонують вводити ***Альбумін*** із загальною опіковою поверхнею тіла понад 30% після перших 6 год лікування[41].

Також, припускають, що пацієнти з тяжкими опіками мають отримувати достатню кількість ***Альбуміну***, щоб підтримувати його рівень у сироватці >30 г/л. Дози ***Альбуміну*** зазвичай складають близько 1-2 г/кг/день. Введення ***Альбуміну*** зменшує ризик розвитку ускладнень, пов’язаних із перевантаженням рідиною, які включають гострий респіраторний дистрес-синдром, гостре пошкодження нирок та абдомінальний компартмент-синдром, тим самим потенційно покращуючи прогноз у таких пацієнтів.

Результати одного метааналізу показали, що введення ***Альбуміну*** значно знижувало смертність пацієнтів з опіками (ВШ=0,34; 95% ДІ 0,19-0,58; $p<0,001$), а згідно з даними іншого, введення ***Альбуміну*** протягом перших 24 год у хворих із тяжкими опіками значно зменшувало частоту розвитку абдомінального компартмент-синдрому – з 15,4 до 2,8%.

Таблиця 3.1.1 Узагальнені рекомендації щодо використання розчинів альбуміну

Показання	**Розчин альбуміну**	**Рекомендована доза**
• **Цироз печінки**		
Гепаторенальний синдром 1 типу	Гіпертонічний	• 1 г/кг маси тіла у 1-й день у комбінації з терліпресином або іншими вазопресорами • 20-40 г/кг маси тіла в наступні дні в комбінації з терліпресином або іншими вазопресорами
Спонтанний бактеріальний перитоніт	Гіпертонічний	• 1,5 г/кг маси тіла протягом перших 6 год • 1 г/кг маси тіла на 3-й день захворювання
Парацентез великого об'єму	Гіпертонічний	• 8-10 г/1 л асцитичної
Рефрактерний асцит	Гіпертонічний	
Терапевтичний плазмаферез, що не потребує заміни факторів згорання	Ізотонічний	• 1-1,5 загального об'єму плазми за процедуру
Під час операцій на відкритому серці	Ізотонічний	
Тяжкі опіки	Ізотонічний	• 1-2 г/кг маси тіла на день

❖ *Загальний об'єм плазми становить 70 мл/кг маси тіла для чоловіків та 65 мл/кг маси тіла для жінок.*

Зважаючи на фізіологічну роль ***Альбуміну*** в нормальному функціонуванні організму людини, застосування його препаратів є надважливим. А в деяких випадках й єдиним засобом для усунення таких захворювань, як, наприклад, гіповолемія.

3.2. Розрахунок потужності виробництва Альбуміну

За даними державного реєстру лікарських засобів України, зареєстровано[6]:

Таблиця 3.2.1 Список зареєстрованих препаратів

№ РП	Назва/лікарська форма	Склад діючих речовин	Виробник
UA/15876/01/01	***Альбумін Людини 200 г/л*** розчин для інфузій,200 г/л; по 50 мл або по 100 мл розчину у плашці; по 1 пляшці в коробці з картону	У 1000 мл препарату міститься: білки плазми, що містять не менше 95% альбуміну 200 г/л	КЕДРІОН С.П.А., Італія
UA/17703/01/03	***Альбунорм 5%*** розчин для інфузій, 50 г/л по 100 мл, 250 мл або 500 мл розчину у флаконі, по 1 флакону в картонній коробці	1000 мл розчину для інфузій містить 50 гр білків плазми із вмістом альбуміну людини не менше 96%	Октафарма
UA/17703/01/02	***Альбунорм 25 %*** розчин інфузій, 250 г/л; по 50 мл або 100 мл розчину у флаконі. По 1 флакону у картонній коробці	1000 мл розчину для інфузій містить 250 г білків плазми із вмістом альбуміну людини не менше 96%	Октафарма
UA/17703/01/01	***Альбунорм 20%*** розчин для інфузій, 200 г/л; по 50 мл або 100 мл розчину у флаконі. По 1 флакону у картонній коробці	1000 мл розчину для інфузій містить 200 г білків плазми із вмістом альбуміну людини не менше 96%	Октафарма
UA/15875/01/02	***Альбувен*** розчин по інфузій, 20% по 50 мл, 100 мл у флаконі; по 1 флакону у пачці з картону	1 мл препарату містить альбуміну людини 200мг	ТОВ «БІОФАРМА ПЛАЗМА», Україна

UA/15875/01/01	***Альбувен*** розчин для інфузій, 10 % по 50 мл, 100 мл у флаконі; по 1 флакону у пачці з картону	1 мл препарату містить альбуміну людини 100мг	ТОВ «БІОФАРМА ПЛАЗМА», Україна
UA/16283/01/01	***Флексбумін*** розчин для інфузій, 200 г/л; по 50 мл (№ 1 та № 24) або 100 мл (№ 1 та № 12) у поліетиленовому пакеті в коробці	1 л розчину містить альбуміну людини 200г	Баксалта ЮС Інк., США Бакстер АГ, Австрія

МОЗ України було визначено, що стратегічний мінімум ***Альбуміну*** для усієї України є - 160 кг на місяць (у 2022 році!). Тож згідно з річним планом закупівлі – в рік закуп ***Альбуміну*** сягає 2000 кг:

Також, у зв'язку із війною в Україні, 7 травня 2022 року Урядом було ухвалено розпорядження № 355-р, яким було дано дозвіл національним виробникам реалізовувати препарати на основі крові за кордоном, але із дотриманням обов'язкових умов[14].

Причиною цього стало те, що наприкінці квітня Об'єднання організацій роботодавців медичної та мікробіологічної промисловості України (далі — ООРММПУ) звернулося до МОЗ через можливі зловживання і порушення в сфері закупівель препаратів через дозвіл на період воєнного стану проводити публічні закупівлі шляхом укладення прямих договорів. Так, ООРММПУ повідомлялося, що при аналізі вже укладених договорів прослідковувалася тенденція до закупівлі на значні суми дороговартісних препаратів крові зарубіжних виробників. Хоча на ринку представлені доступні аналогічні препарати вітчизняного виробництва.

На даний момент, в Україні існує один завод, який виробляє ***Альбумін*** – це компанія Біофарма Плазма. Усі інші є експортними

варіантами. Оскільки, вітчизняний ***Альбумін*** виготовляється з плазми крові, то це ускладнює логістичну мережу і організацію виробництва.

Рекомбінантний Альбумін є більш безпечним, адже в ньому не використовується плазма крові, що може бути потенційно вірусно-контамінованою сировиною[31].

Рекомбінантний Альбумін, також може бути гіпоалергенним, що робить його безпечнішим до перебігу можливих побічних реакцій та відкидує усі ускладення роботи з матеріалом крові. Акцентуючи увагу на гіпоалергенності, ми відмічаємо його актуальність та перевагу перед чистим, «вітчизняним» ***Альбуміном***, який може бути забрудненим і небезпечним. ***Рекомбінантний Альбумін*** стає необхідним варіантом для тих, хто бореться з проблематикою алергії.

3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів для отримання річної потреби цільового продукту і об’єму ферментера

Через конкуренцію на ринку, ми забезпечимо лише 1 % усіх потреб України в альбуміні, тобто 20 кг на рік.

Потужність виробництва при синтезувальних можливостях 1.4 г/л [51]:

1.4 г - 1л

20000 г - 14 285,7 літрів культуральної рідини

Але, варто зазначити, що об’єм втрат на етапах очистки може сягати 70 % [38,57].

14 285,7·0.3 = 4285,71 літрів культуральної рідини для промислового синтезу ***Рекомбінантного Альбуміну*** на потреби України.

Плануємо, що вибрану кількість субстанції будемо виробляти за Трд = 336 робочих трудоднів.

Кількість циклів на рік становить:

Nцк = 24· Трд/Тцф = 24 · 336 / 56,5 = 142,73, а отже 143 циклів,

де Тцф – цикл роботи ферментера, який включає:

- тривалість виробничого біосинтезу (48 год);
- час підготовки ферментера до роботи (8,5 год):
- миття та огляд апарата (1,5 год),
- перевірка на герметичність (1 год),
- підігрів (0,5 год),
- стерилізація апарату (1 год),
- охолодження (1 год),
- завантаження середовища (2 год),
- засів (0,5 год),
- вивантаження культуральної рідини (1 год).

Кількість культуральної рідини за цикл складає:

Gцк = Gнт/Nцк = *4285,71* /143 = 42,9 л/цикл.

3.4 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

Виходячи із геометричного об’єму виробничого ферментеру (згідно із проєктованим завданням) та обраного коефіцієнту його заповнення, необхідно розрахувати кількість стадій підготовки посівного матеріалу, яку розраховують шляхом визначення робочого об’єму апарата.

Робочий об’єм ферментера ($V_{роб}$) визначають за формулою:

$$V_{роб} = V_{г.ф} \times К_{зап},$$

де: $V_{г.ф.}$ – геометричний об’єм ферментера (заданий керівником);

$К_{зап}$ – коефіцієнт заповнення.

Виробниче культивування ***E.coli*** для одержання рекомбінантного альбуміну здійснюють у ферментері об’ємом 100 л з коефіцієнтом заповнення 0,5. Робочий об’єм ферментера становить:

$$Vроб = 100 * 0,5 = 50 л.$$

Кількість посівного матеріалу (доза) становить 10 % від об’єму поживного середовища. Отже, для одержання 50 л культуральної рідини потрібно:

$Vроб.1 = 50 * 0,1 = 5 л$ посівного матеріалу.

Таку кількість інокуляту можна одержати під час культивування бактерій у посівному апараті об’ємом 10 л з коефіцієнтом заповнення 0,5.

Для засіву посівного апарату (одержання 5 л культуральної рідини) необхідно:

$Vроб.2 = 5 * 0,1 = 0.5$ л посівного матеріалу.

Така кількість інокуляту може бути одержана культивуванням бактерій у колбах на качалці.

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу ***Рекомбінантного Альбуміну*** у ферментері об’ємом 100 л з коефіцієнтом заповнення 0,5 буде відбуватися у два етапи.

3.5. Біосинтез рекомбінантного альбуміну

3.5.1. Одержання мутантного штаму

Для початку необхідним задля отримання продуцента рекомбінантного людського Альбуміну, є проведення трансформації штаму. Тому, першим кроком є перенесення гену HSA-людини (ген синтезу людського Альбуміну нормального) ДНК у клітину бактерії - ***E.coli***. Попередньо, ген HSA-людини має бути ампліфікований методом ПЛР з ДНК гепатоцитів людини[29].

Після цього ген HSA-людини клонується в бактеріальний вектор експресії pET23b, у сайт MCS – за допомогою його розміщення під промотор T7. Після чого, створений вектор стає готовим до інсерції в клітини бактерій ***E.coli***.

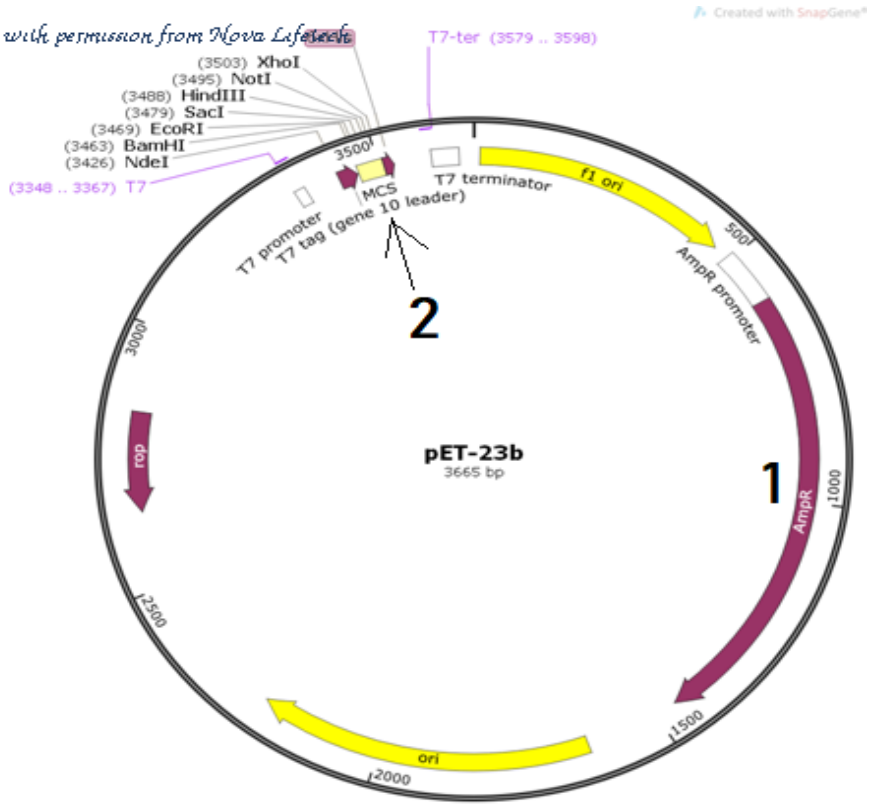
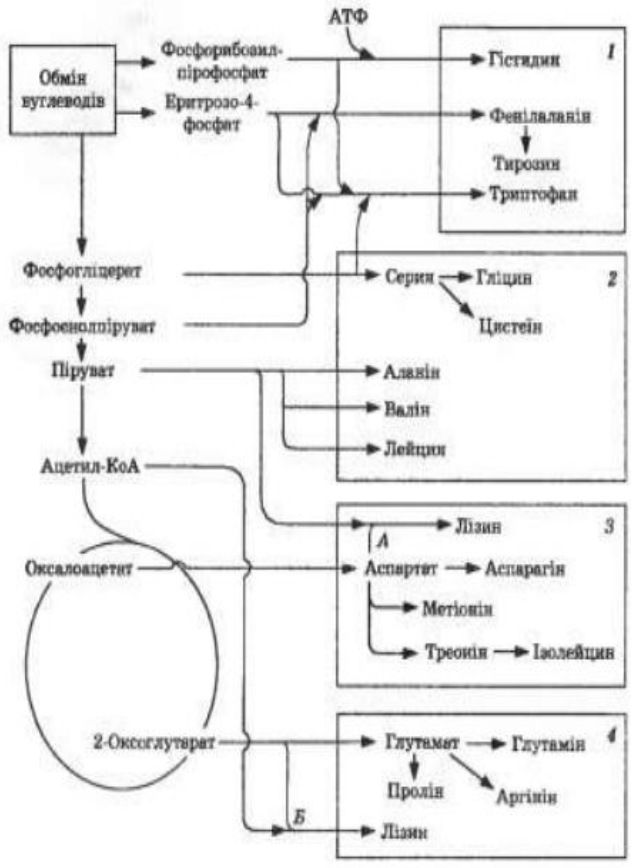


Рис.2.5.1 Генетична карта зконструйованого вектору для експресії людського Альбуміну у клітинах - мутантах E.coli
1- ген AmpR - стійкості до антибіотику
2- ділянка MCS у яку проводилась вставка гену HSA

3.5.2. Схема біотрансформації ростового субстрату

Оскільки ключовим енергетичним джерелом для росту бактерій-продуцентів і синтезу білка альбуміну у заданому поживному середовищі є вуглеводи, то вони трансформуються за певними шляхами.

Отже, у схемі утилізації поживного середовища доцільним буде розгляд можливості синтезу амінокислот, які саме будуть брати участь у метаболізмі задля синтезу альбуміну бактеріального походження. Важливо зазначити: ефективність синтезу альбуміну значно підвищиться, якщо у складі поживного середовища буде наявний пептон, чи інший білковий продукт, адже амінокислоти можна буде включати у синтез, не синтезуючи їх denovo з вуглеводів[2].



родини амінокислот: *1* - ароматичних амінокислот і гістидину; *2* - піру- ватна: *3* - аспартатна; *4* - глутаматна. Шляхи біосинтезу лізину: *А* - діаміно-пімеліновий; *Б* - аміноадипіновий

Рис. 3.5.1 Біотрансформація ростового субстрату

Для синтезу білків існують всі необхідні 20 амінокислот, що утворюються з певних метаболічних попередників (рис.3.5.1).

З наведених даних можна ствердити, що субстратами для синтезу амінокислот являються декілька сполук - піруват, оксалоацетат, 2-оксоглутарат, 3-фосфогліцерат, фосфоенолпіруват, еритрозо-4-фосфат і 5-фосфорибозил-пірофосфат.

Оксалоацетат являє собою стартову точку для синтезу шести амінокислот, 2-оксоглутарат є попередником синтезу чотирьох, а піруват - трьох амінокислот.

Аланін та аспартат синтезуються з пірувату та оксалоацетату трансамінуванням з використанням глутамату як донора аміногрупи. Аспарагін утворюється в реакції, аналогічній тій, що каталізується глутамінсинтетазою.

Відновлення аспартату дає напівальдегід аспарагінової кислоти - попередник лізину, треоніну та метіоніну. Дезамінування треоніну приводить до утворення 2-оксобутирату, який в результаті послідовної дії чотирьох ферментів перетворюється на ізолейцин.

Під дією чотирьох ферментів, піруват перетворюється на валін; проміжний продукт синтезу валіну служить попередником в утворенні лейцину. Серин, гліцин і цистеїн синтезуються з 3-фосфогліцерату, а пролін та аргінін - з глутамату. Складнішим є синтез ароматичних амінокислот.

Еритрозо-4-фосфат і фосфоенолпіруват конденсуються з утворенням С7-сполуки, яка піддається циклізації. Загальним проміжним продуктом синтезу ароматичних амінокислот є хоризмат. З нього через різні шляхи можливий синтез усіх ароматичних амінокислот.

РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА

4.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Під час виробництва рекомбінантних білків, у даному випадку HSA, клітина-господар відчуває порушення внутрішньої енергетики, що, у свою чергу, безпосередньо впливає на швидкість її росту. Крім того, виробництво рекомбінантного білка залежить від специфічної швидкості росту клітини-господаря.

Профіль росту клітин ***E. coli*** при трансформації плазмідами значно змінюється порівняно зі штамом дикого типу. Важливо відмітити, що на етапах прекультивування проводиться контроль експресії плазміди за допомогою методів ПЦР в реальному часі. Також, за допомогою ампіциліну відбувається відсіювання нетрансформованих клітин, оскільки вектор також несе на собі ген стійкості до ампіциліну[57].

Відомо, що бактерії виду ***Escherichia coli*** - є факультативно-анаеробними мікроорганізмами. Тому, для промислового культивування цих мікроорганізмів (з метою накопичення більшої біомаси) - процес проводять за умов аерації середовища, прокачка стерильного повітря через ферментер інтенсивністю в 1 л/л×хв. Також відомо, що культура ***Escherichia coli*** є мезофільною – оптимальна температура росту - 37ºС [39].

Культивування має бути проведено стерильно, для відповідності вимогам чистоти при виробництві лікарського засобу. Методики культивування мають бути валідовані для проходження GMP-сертифікацій.

Для промислового використання культури, доцільно використовувати методику глибинної культивації. Даний спосіб має ряд переваг, оскільки передбачає скорочення виробничих площ, виключення тяжкої невиробничої ручної праці, покращення гігієни праці, спрощення механізації та автоматизації виробництва. Глибинна культивація надає можливість до переходу на безперервне культивування. Але, є обмеження - бо зміна pH до ізоелектричної точки альбуміну вб`є всіх бактерій продуцентів.

При заповненні ферментеру середовищем і перевірці температури, (котра повинна бути не вищою 31°C) , у ферментер із посівного апарата спускають по трубопроводу посівну культуру. Кожне місце введення посівної культури в цей трубопровід і кожний вихід з нього у ферментер мають бути захищені паровими пробками[40].

Після того, як відбулося внесення посівної культури, починається процес вирощування продуценту. Вирощування проводять при постійній аерації. Повітря для аерації через трубопровід поступає на очищення у фільтр і в очищеному вигляді подається в середовище. Необхідна для вирощування температура (37-38°C) підтримується подачею води в сорочку чи охолоджуючі труби. Для усунення піни, що утворюється в процесі вирощування, додається піногасник із дозатора. Після вирощування, необхідно проводити зміну pH до 4.9, задля осадження альбуміну у ферментері і початку його відфракціонування від інших можливих білків та клітин бактерій. Після етапів фракціонування та подальшого освітлення розчину альбуміну у спирті, необхідно проводити розведення розчину до необхідної концентрації і розливу у флакони.

Оскільки продуцент альбуміну належить до числа факультативно-анаеробних мікроорганізмів, то для підвищення накопичення біомаси, нормального розвитку та функціонування - необхідне підведення кисню.

При глибинному вирощуванні, повітря (як правило), вводиться в нижню частину ферментера за допомогою різноманітного обладнання для рівномірного розподілення його по всьому перерізу ферментера.

4.1.1. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

Важливою складовою для забезпечення виробництва продукції належної якості і мікробіологічної чистоти є забезпечення відповідного стану санітарії та гігієни на підприємстві. Підготовка виробничих приміщень включає в себе ряд заходів: вологе прибирання, дезінфекцію і ультрафіолетове опромінення підлоговими та настінними лампами стін, підлог, стель, поверхні обладнання та комунікацій з метою забезпечення чистоти. Підготовка виробничих приміщень поділяється на щоденну і генеральну. Щоденне прибирання "чистих" приміщень проводять після кожної зміни вологим способом.

Засоби для дезінфекції замінюються один раз на 1-3 місяці задля профілактики попередження набуття мікроорганізмами резистентності до миючих засобів. Із метою охорони безпеки життєдіяльності людини і тварин і запобігання небажаних для людини наслідків до дезінфікуючих речовин, які використовуються у фармацевтичній і харчовій промисловостях висувається ряд вимог:

- ✓ низька ціна та висока доступність;
- ✓ широкий спектр антимікробної дії;
- ✓ безпека для людей і тварин;
- ✓ мінімальні корозійна активність та агресивність;
- ✓ легка розчинність у воді;
- ✓ відсутність різкого запаху;
- ✓ стійкість при зберіганні, використанні, придатність до транспортування;
- ✓ висока активність;
- ✓ здатність до очищення та відбілювання [62].

Славін-Дельта - Робочі розчини засобу Славін-Дельта мають ефективні миючі, дезодоруючі, змочувальні, емульгуючі властивості, не зашкоджують виробам з металу, гуми, каучуку, скла, різних полімерних матеріалів (включаючи штучну шкіру, латекс, поліамід, макролон, полівінілхлорид, плексиглас, силікон, альгінат, гідроколоїд тощо), добре змиваються з поверхонь, підданих обробці, не залишають нальоту і плям, не фіксують органічні забруднення, не знебарвлюють і не зменшують міцність тканин. Ефективно видаляють механічні, білкові, жирові забруднення, залишки крові, залишки лікарських засобів. Також низьке піноутворення дозволяє використовувати засіб для миття та дезінфекції інструментів в ультразвукових ваннах. Засіб **Славін-Дельта** зберігає свої властивості після розморожування внаслідок замерзання. Дезінфікуючий засіб **Славін-Дельта** не містить окислювачів [63].

Фамідез Комбі - високоефективний протибактеріальний концентрат (включаючи мікробактерії туберкульозу), вірусів (щодо збудників вірусів гепатитів і СНІДу, рота-вірусів), грибків (щодо грибків роду Candida) з високою миючою здатністю на основі бігуанідину і четвертинної амонієвої солі з натурального кокосового жиру для дезінфекції та чистки поверхонь, обладнання та медичних інструментів. Містить інгібітор корозії, практично без запаху, не має сенсибілізуючої дії.

Дезінфекція і миття медичного інвентарю, виробів медичного призначення, предметів догляду за хворими, поверхонь усіх типів (підлога, стіни, двері тощо), твердих меблів, приладів, апаратури, устаткування з лакофарбовим, полімерним і гальванічним покриттям, санітарно-технічного обладнання, прибирального інвентарю тощо. Обробка операційних блоків, зон підвищеного інфекційного ризику [64].

4.2. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Спираючись на склад поживного середовища, наведений у попередньому підрозділі, наводимо нижче опис стерилізації поживного середовища.

На першому етапі проводиться приготування поживного середовища – у окремій ємності з перемішувачем розчиняємо у дистильованій воді: гліцерин, глюкозу, лактозу, триптон та дріжджовий екстракт і направляємо на установку безперервної стерилізації у режимі роботи 120°С (0,075–0,1 МПа) впродовж 20–30 хв[37].

Паралельно йде приготування розчину KH_2PO_4, що попередньо має бути висушений (при температурі 180°С – 6 годин, у сухо-жаровій шафі) – це потрібно зробити через його гігроскопічні властивості. Після чого, розчин вноситься у дистильовану воду для отримання заданої концентрації, що буде у вихідному розчині. Далі, по такій самій схемі йде приготування розчину Na_2HPO_4.

Na_2SO_4 та $MgSO_4$ у формі солей окремо стерилізуються у сухо-жаровій шафі при температурі 180°С - 6 годин та додаються разом на фінішних етапах формуляції розчину середовища. Розчин NH_4Cl, через його летючість та небезпеку термічного розкладання при стерилізації на високих температурах - осмотично фільтрується і додається до поживного середовища у відповідній концентрації.

Після чого проводиться стерилізація у автоклаві за температурним режимом при 131°С (0,15 МПа) впродовж 40–60 хв. Додатково готуються розчини лугу (6 % гідроксид натрію) та 6% соляна кислота та розчин 40% спирту. Оскільки вони будуть необхідні для проведення корекції pH поживного середовища та подальшого фракціонування альбуміну з поживного середовища[37].

РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Специфікація обладнання, зображеного на апаратурній схемі *(див. графічна частина)*, наведена в табл. 5.1.

Таблиця 5.1

Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу альбуміну

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
1	*2*	*3*	*4*
ПЗ-1	Повітрозабірник	1	Пристрій для забору повітря «Кліматокомплект» (Україна) Ступінь захисту пристрою IP43; Максимальна температура транспортованого повітря+ 40°С. Габаритні розміри, мм: 82х82х30[12].
Ф-2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Кишеньковий фільтр ПКФ. Виробник: «Турбовент». Фільтрувальний матеріал: синтетичне волокно класу G4; продуктивність: 3500 м^3/год; Е=90%; габаритні розміри, мм: 300х600х400[18].
К-3	Компресор	1	Турбокомпресор Т2 («Dalgakiran»). Продуктивність: 2250 м^3/год; габаритні розміри, мм: 2450х1640х1900; робочий тиск: 5.5 – 8.8 бар [17].
Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Охолоджувач повітря CWK 250-3-2,5. Виробник: «Systemair». Максимальний робочий тиск 1,6 МПа (16 бар), вихідна температура повітря 18,2 ºС[17].
Р-5	Ресивер	1	Ресивер ПЗВ 500-600-11-01 («Zelko»). Об’єм, л: 500; ; габаритні розміри, мм: 2125х600; максимальний тиск: 11 бар [13].

Продовження табл. 5.1.

Т-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Повітронагрівач водяний VBC. Виробник: «Systemair», Швеція. Максимальний робочий тиск 1,6 МПа (16 бар), робоча температура 150 ºС[16].
Ф-7	Головний фільтр очистки	1	Карманний фільтр тонкої очистки класу F9. Фільтруючий матеріал мельблоун. Ступінь очищення становить 90-99 % Максимальна робоча температура: 60-70°С. [19].
ІФ-8, ІФ-14	Індивідуальний фільтр	2	Фільтр у стальному корпусі BF. Фільтруючий матеріал: боросилікатне волокно; робочий тиск: 16 бар; діапазон температур: 1,5-65°С; ступінь очищення повітря фільтром: 99,999 % [26].
І-9	Інокулятор	1	Виробник: «BLBIO». Інокулятор об’ємом 10 л BLBIO-10SJ. Матеріал корпусу: нержавіюча сталь AISI 316L; обладнаний турбінною мішалкою: 200 об/хв; з рубашкою; датчиками вимірювання pH, кисню, температури; до комплекту також входять: витратомір, манометр, барботер, контролер рівня рідини; потужність апарату: 2 кВт; габаритні розміри, мм: 890х660х1600 [40].
Д-10, Д-12	Ваговий дозатор	2	Дозатор ваговий автоматичний шнековий обліковий ДВП-3У. Максимальна продуктивність, кг/хв: 30; похибка: 2 %; потужність, не більше: 1 кВт; габаритні розміри, мм: 650 х 780 х 1300 [7].
РЗ-11	Реактор-змішувач для приготування і стерилізації композиції А	1	Реактор гомогенізатор 40Л. Виробник: Україна. Виконаний із нержавіючої сталі AISI 304. До складу реактора входять: сорочка, якірна мішалка: 150 об/хв; потужністьапарату складає: 0,75 кВт; температура перемішування: 250 °С; габаритні розміри, мм: 600 х 500 х 750 [1].

Закінчення табл. 5.1

РЗ-13	Реактор-змішувач для приготування композиції Б	1	Реактор-змішувач об’ємом СЕон 40 л. Виробник: Україна. Оснащений сорочкою, лопатевою мішалкою: 100 об/хв; потужність двигуна, кВт: 0,75; макс. температура: 250 °С; габаритні розміри, мм: 600 х 500 х 750 [1].
ФР-15	Ферментер	1	Ферментер об’ємом 100 л DIN-AE. Виробник: Німеччина. Матеріал: нержавіюча сталь 304; обладнаний барботером, сорочкою, датчиком pH, кисню, температури; містить також пробовідбірник, манометр; турбінну мішалку: 320 об/хв; допустимий тиск: 6 бар; габаритні розміри, мм: 600х1980 [42].
Н-16	Насос відцентровий для перекачування культуральної рідини від ФР-15 у збірник	1	Насос Відцентровий CS 50-160 D («Speroni»). Потужність: 3 кВт; тиск: 10 бар; максимальний напір: 25 м; матеріал: чавун; продуктивність: 72 $м^3$/год (1200 л/хв)[20].

РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

Технологічна схема біосинтезу альбуміну *Escherichia coli* DE3 складається із допоміжних робіт та основного технологічного процесу. До стадій допоміжних робіт (ДР) належать: підготовка стерильного аераційного повітря, приготування титрувальних розчинів HCl та NaOH, приготування і стерилізація поживних середовищ. До стадій основного технологічного процесу (ТП) відносять: підготовку посівного матеріалу та виробничий біосинтез.

У графічній частині проекту наведені технологічні та апаратні схеми біосинтезу альбуміну.

ДР 1. Підготовка аераційного повітря

ДР 1.1 Забір атмосферного повітря

У найвищій точці – на висоті 10 м (висота поверху – 6 м, кількість поверхів – 1, косий дах будівлі (~1,5 м), + 2-3 метри), де розміщають обладнання для стиснення та очищення повітря, проходить забір атмосферного повітря. Процес проходить із залученням повітрозабірника.

ДР 1.2. Груба очистка повітря

Обов'язковим етапом є очищення повітря від пилу та механічних частинок. Цю операцію проводять у фільтрі з утримувальною здатністю 80%.

ДР 1.3. Компресування повітря

На данному етапі проходить стиснення(до тиску близько 0,4 МПа). Процес проходить у компресорі. Під час компресування обов'язковим є підвищення температури повітря, тому наступним етапом є його охолодження.

ДР 1.4. Охолодження повітря та зменшення надлишкової вологості.

Щоб мінімізувати забруднення, повітря в теплообміннику різко охолоджують до 19 °С. Отримана волога потім зріджується в приймачі, таким чином кінцева вологість поступово зменшується до близько 60%.

ДР 1.5. Нагрівання повітря

Після охолодження повітря, можливим є утворення надлишку конденсату на волокнах головного та індивідуального фільтрів. Задля запобігання та зменшення об'ємів утвореного конденсату, охолоджене повітря в теплообміннику підігрівають до температури 30 °С.

ДР 1.6. Очищення повітря в головному фільтрі

Нагріте повітря пускають через головний фільтр. Ступінь очищення повітря збільшується до Е = 95 %.

ДР 1.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

Перед посівними апаратами та ферментером встановлюють індивідуальні фільтри (ІФ-8, ІФ-14), ступінь очищення яких становить Е = 99,99998 %.

ДР 2. Підготовка титрувальних агентів

ДР 2.1. Приготування 6%-го розчину соляної кислоти

ДР 2.1.1. Приготування 6%-го розчину соляної кислоти для підкислення середовища у ферментері об'ємом 100 л

У колбу об'ємом 250 мл за допомогою мірного циліндра об'ємом 25 мл додають 16,2 мл дистильованої води і вносять за допомогою мірного циліндра на 100 мл при постійному перемішуванні 83,8 мл 37%-ого розчину HCl. Таким чином отримуємо 100 мл 6 %-го розчину хлоридної кислоти. Після чого, колбу підключають до ферментаторної установки, який самостійно регулює рівень pH.

ДР 2.2. Приготування 6%-го розчину натрій гідроксиду

ДР 2.2.1. Приготування 6%-го розчину натрій гідроксиду для підлужнення поживного середовища у ферментері об'ємом 100 л

На технічних вагах зважують 60 г кристалічного їдкого натру. Отриману таким чином наважку засипають у колбу на 250 мл і за допомогою мірного циліндра на 100 мл додають 100 мл дистильованої води. Згодом одержаний розчин лугу об'ємом 100 мл перемішують до повного розчинення, закривають ватно-марлевою пробкою. Одержаний розчин стерилізують в автоклаві при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 3. Приготування і стерилізація поживних середовищ

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

Аби провести процес вирощування посівного матеріалу у колбах, слід підготувати 447,5 мл поживного середовища (50 мл разом з інокулятом, що становить 10 % від загального об'єму та 2,5 мл гліцерину). Вміст та кількість компонентів наводимо в табл. 6.1.

Таблиця 6.1

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 447,5 мл середовища

Компонент ПС	Концентрація, г/л	Вміст компоненту в 447,5 мл ПС, г	Композиція	Об'єм композиції, мл
Триптон	10	4,5	А	250
Дріжджовий екстракт	5	2,24		
Лактоза	2	0,9		
Глюкоза	0,5	0,224		
Вода		250 мл		
Na_2HPO_4	3,55	1,6	Б	150
KH_2PO_4	3,4	1,52		
NH_4Cl	2,68	1,2		
Na_2SO_4	0,71	0,317		
Вода		150 мл		
$MgSO_4$	0,24	0,107	В	47,5
Вода		47,5 мл		

ДР 3.1.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних терезах зважують 4,5 г триптону, 2,24 г дріжджового екстракту, 0,9 г лактози, 0,224 г глюкози. Наважки засипають у чисту і суху колбу об'ємом 500 мл, доливають дистильовану воду (250 мл), перемішують, закривають ватно-марлевим корком і стерилізують в автоклаві при 112 ºС (0,05 МПа) протягом 30 хв.

ДР 3.1.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних терезах зважують 1,6 г Na_2HPO_4, 1,52 г KH_2PO_4, 1,2 г NH_4Cl, 0,317 г Na_2SO_4. Наважки обережно переносять у колбу об'ємом 250 мл, додають дистильовану воду (0,15 л), перемішують, закривають ватно-марлевим корком і стерилізують в автоклаві при 131 ºС (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 3.1.3. Приготування і стерилізація композиції В

На технічних терезах зважують 0,107 г $MgSO_4$. Наважку поміщають у колбу об'ємом 100 мл, додають дистильовану воду (47,5 мл), перемішують, закривають ватно-марлевим корком і стерилізують в автоклаві при 131 ºС (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 3.2. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту у посівному апараті об'ємом 10 л.

Аби отримати попередньо обрахований об'єм посівного матеріалу потрібно попередньо підготувати 4475 мл поживного середовища (500 мл припадає на одержаний інокулят, що становить 10 % від загального об'єму та 25 мл гліцерину). Вміст та кількість компонентів вказано в табл. 6.2.

Таблиця 6.2

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 4475 мл середовища

Компонент ПС	Концентрація, г/л	Вміст компоненту в 4,475 л ПС, г	Композиція	Об’єм композиції, мл
Триптон	10	44,75	А	2000
Дріжджовий екстракт	5	22,4		
Лактоза	2	8,95		
Глюкоза	0,5	2,24		
Вода		2000 мл		
Na_2HPO_4	3,55	15,9	Б	2000
KH_2PO_4	3,4	15,2		
NH_4Cl	2,68	12		
Na_2SO_4	0,71	3,18		
Вода		2000 мл		
$MgSO_4$	0,24	1,074	В	475
Вода		475 мл		

ДР 3.2.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних терезах зважують 44,75 г триптону, 22,4 г дріжджового екстракту, 8,95 г лактози, 2,24 г глюкози. Наважки поміщають у суху і чисту колбу об’ємом 3 л, доливають дистильовану воду (2 л), перемішують, закривають ватно-марлевим корком і стерилізують в автоклаві при 112 ºС (0,05 МПа) протягом 30 хв.

ДР 3.2.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних терезах зважують 15,9 г Na_2HPO_4, 15,2 г KH_2PO_4, 12 г NH_4Cl, 3,18 г Na_2SO_4. Наважки поміщають у колбу об'ємом 3 л, додають дистильовану воду (2 л), перемішують, закривають ватно-марлевим корком і стерилізують в автоклаві при 131 ºС (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 3.2.3. Приготування і стерилізація композиції В

На технічних терезах зважують 1,074 г $MgSO_4$. Наважку поміщають у колбу об'ємом 1 л, додають дистильовану воду (475 мл), перемішують, закривають ватно-марлевим корком і стерилізують в автоклаві при 131 ºС (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 3.3. Приготування і стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 100 л.

Для виробничого біосинтезу альбуміну необхідно підготувати 44,75 л поживного середовища (5 л разом з посівним матеріалом, що становить 10 % від загального об'єму та 250 мл гліцерину). Кількісний та якісний склад компонентів наведено в табл. 6.3.

Таблиця 6.3

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 44,75 л середовища

Компонент ПС	Концентрація, г/л	Вміст компоненту в 44,75 л ПС, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Триптон	10	447,5		
Дріжджовий екстракт	5	223,75		
Лактоза	2	89,5	А	24,75
Глюкоза	0,5	22,38		
Вода		21,5		
Конденсат		2,475		
Na_2HPO_4	3,55	158,9		
KH_2PO_4	3,4	152,15		
NH_4Cl	2,68	120		
Na_2SO_4	0,71	31,77	Б	20
$MgSO_4$	0,24	10,74		
Вода		17,03		
Конденсат		2		

ДР 3.3.1. Приготування композиції А

Через ваговий дозатор (Д-10) у реактор-змішувач об'ємом 40 л (РЗ-11) вносять 447,5 г триптону, 223,75 г дріжджового екстракту, 89,5 г лактози, 22,38 г глюкози, додають через лічильник 21,5 л води питної і стерилізують при 112 ºС (0,05 МПа) протягом 30 хв.

ДР 3.3.2. Приготування композиції Б

Через ваговий дозатор (Д-12) у реактор-змішувач на 40 л (РЗ-13) вносять 158,9 г Na_2HPO_4, 152,15 кг KH_2PO_4, 120 г NH_4Cl, 31,77 г Na_2SO_4,

10,74 г $MgSO_4$, додають через лічильник 17,03 л води питної, вмикають перемішуючий пристрій. Для кращого розчинення компонентів у сорочку реактора подають пару, щоб досягти температури у реакторі на рівні 40°С. Отриманий розчин подають самоплином у попередньо простерилізований ферментер (ФР-15) об'ємом 40 л, через конектор подають 6 %-ий розчин HCl об'ємом 40 мл (від *ДР 2.1.1*) до досягнення pH 4,0-4,5 і стерилізують при 131 ºС (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ТП 4. Підготовка посівного матеріалу

ТП 4.1. Підтримання колекційної культури

Бактеріальний штам колекційної культури *E. coli* DE3 зберігають у пробірці на скошеному щільному агаризованому середовищі (м'ясо-пептонний агар). Пересіви на свіже поживне середовище проводять 1 – 2 рази на місяць. Усі роботи із колекційною культурою проводять із дотриманням правил асептики.

ТП 4.2. Одержання робочої культури

Колекційну культуру *E. coli* DE3 розсівають на чашки Петрі із м'ясо-пептонним агаром для одержання ізольованих колоній. Вирощують у термостаті при температурі 37 °С (24 год).

ТП 4.3. Вирощування інокуляту у пробірках на агаризованих середовищах

Отримані ізольовані колонії *E. coli* DE3 із чашок Петрі (від *ТП 4.2*) пересівають петлею у пробірки зі скошеним м'ясо-пептонним агаром. У пробірки пересівають ізольовані колонії, що знаходяться на відстані не менше 1 см. Тривалість вирощування складає 24 годин, оптимальна температура – 37°С. Кожні 4 год із пробірок відбирають проби для проведення мікробіологічного контролю.

ТП 4.4. Вирощування інокуляту в колбах на качалках

В асептичних умовах у колбу об'ємом 500 мл вносять стерильну композицію А (від *ДР 3.1.1*) вносять простерилізовану композицію Б (від *ДР 3.1.2*), вносять композицію В (від *ДР 3.1.3*), додають 2,5 мл гліцерину, перемішують і розливають по 223,75 мл у 2 стерильні качалочні колби об'ємом 750 мл.

У пробірку з робочою культурою *E. coli* DE3 (від *ТП 4.3*) вносять 5 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини, стерильною піпеткою відбирають отриману суспензію бактерій і вносять у качалочні колби із поживним середовищем. Для засіву 1 колби використовують бактеріальну суспензію, одержану з 1 пробірки.

Процес культивування здійснюють на качалках (220 об/хв) при температурі 37°С упродовж 12 год. Після завершення процесу визначають концентрацію біомаси, яка повинна становити 0,8 – 1,0 г/л, а також здійснюють мікробіологічний контроль. Після проведення мікробіологічного контролю культуральну рідину зливають у посівну колбу об'ємом 500 мл.

ТП.4.5. Вирощування інокуляту у посівному апараті об'ємом 10 л

У посівний апарат (І-9) вносять стерильну композицію А (від *ДР 3.2.1*) вносять простерилізовану композицію Б (від *ДР 3.2.2*), вносять композицію В (від *ДР 3.2.3*), додають 25 мл гліцерину і вмикають перемішуючий пристрій. Через засівну колбу вносять посівний матеріал (від *ТП 4.4*). Культивують при температурі 37°С і концентрації розчиненого кисню (pO_2 = 20 – 30 % від насичення повітря) упродовж 12 год. Підтримання pO_2 на заданому рівні здійснюють регулюванням швидкості перемішування і рівня аерації (витрати стерильного аераційного повітря).

Кожні 4 год з інокулятора відбирають проби культуральної рідини для проведення мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси, яка повинна становити 0,8 – 1,0 г/л.

ТП 5. Виробничий біосинтез

ТП 5.1. Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 100 л

У ферментер (ФР-15) із стерильною композицією Б (від *ДР 3.3.2*), із реактора (РЗ-11) додають самоплином простерилізовану композицію А (від *ДР 3.3.1*), вносять 250 мл гліцерину, вмикають перемішуючий пристрій і доводять 6%-им розчином NaOH (від *ДР 2.2.1*) pH середовища за показником датчика pH до 6,6-6,8. Через трубу перетискування подають з інокулятора (І-9) посівний матеріал (від *ТП 4.5*). Культивують при температурі 37°С і концентрації розчиненого кисню (pO_2 = 20 – 30 % від насичення повітря) упродовж 48 год. Підтримка pO_2 на заданому рівні здійснюється шляхом регулювання швидкості перемішування та рівня аерації.

Кожні 4 год із ферментера відбирають проби культуральної рідини для проведення мікробіологічного контролю, визначення концентрації біомаси (1,6 – 2,0 г/л) та концентрації альбуміну (1,4 г/л).

Після закінчення процесу біосинтезу культуральну рідину перекачують відцентровим насосом (Н-16) у цех виділення цільового продукту.

РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

7.1. Карта постадійного контролю доферментаційних процесів

Таблиця 7.1.1

Карта постадійного контролю біосинтезу альбуміну

Номер контрольної точки та назва стадії	**Об'єкт контролю та показник, що визначається**	**Засоби та методи контролю**	**Періодичність перевірки та відбору проб**	**Нормативні значення показника**
1	***2***	***3***	***4***	***5***
Кт 1.1 *Забір атмосферного повітря*	**Повітрозабірник** Висота забору повітря	-	Під час купівлі та при встановленні	Н = 10 м
Кт 1.2 *Очистка від грубих домішок*	**Очищене повітря** Ступінь очистки, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно з паспортом фільтра	Після проходження через фільтр грубої очистки	Е = 90%
Кт 1.3 *Стиснення повітря*	**Стиснене повітря** Тиск, температура	Манометр, термометр	Після стиснення	Р = 0,35-0,5 МПа, t = 120-250°С
Кт 1.4 *Охолодження і видалення зайвої вологи*	**Охолоджене повітря** Температура, вологовміст	Термометр, психрометр	Після охолодження і видалення вологи	t = 25-35°С, W = 60%
Кт 1.4 *Охолодження і видалення зайвої вологи*	**Охолоджене повітря** Температура, вологовміст	Термометр, психрометр	Після охолодження і видалення вологи	t = 25-35°С, W = 60%
Кт 1.5 *Нагрівання повітря*	**Нагріте повітря** Температура, вологовміст	Термометр, психрометр	Після нагрівання	t = 40-50°С, W = 50%
Кт 1.6 *Очищення у головному фільтрі*	**Очищене повітря** Ступінь очистки, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно з паспортом фільтра	Після проходження через головний фільтр	Е = 95%

Продовження табл. 7.1.1

Кт, Км 1.7 *Очищення в індивідуальному фільтрі*	**Очищене повітря** Ступінь очищення, мікробіологічна чистота	Перевірка ступеня очищення згідно з нормативною документацією фільтра, мікробіологічний контроль	Після проходження через індивідуальний фільтр	Е = 99,999%, КУО ≤ 1
Кт, Кх, Км 2.1.1 *Приготування стерильного розчину соляної кислоти для підкислення поживного середовища у ферментері об'ємом 100 л*	**Розчин соляної кислоти** Концентрація, стерильність	Фізико-хімічний метод, мікробіологічний контроль	Визначення концентрації та проведення мікробіологічного контролю проходить після приготування розчину	С = 6%, відсутність мікробіоти
Кт, Кх, Км 2.2.1 *Приготування 6%-го розчину натрій гідроксиду для підлужнення поживного середовища у ферментері об'ємом 100 л*	**Розчин натрію гідроксиду** Тиск, час, концентрація, стерильність	Манометр, годинник, фізико-хімічний метод, мікробіологічний контроль	Концентрація визначається після приготування розчину, тривалість, тиск безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	Р = 0,15 МПа, τ = 40 хв, С = 6%, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.1.1. *. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках.*	**Композиція А** Тиск, час, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тривалість і тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	Р = 0,05 МПа, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.1.2. *. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках.*	**Композиція Б** Тиск, час, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тривалість і тиск визначаються під час стерилізації безперервно, мікробіологічний контроль після стерилізації	Р = 0,05 МПа, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти

Продовження табл. 7.1.1

Кт, Км 3.1.3. *. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках.*	**Композиція В** Тиск, час, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тривалість і тиск визначаються під час стерилізації безперервно, мікробіологічний контроль після стерилізації	Р = 0,15 МПа, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.2.1. *. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту у посівному апараті об'ємом 10 л.*	**Композиція А** Тиск, час, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тривалість і тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	Р = 0,05 МПа, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.2.2. *. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту у посівному апараті об'ємом 10 л.*	**Композиція Б** Тиск, час, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тривалість і тиск визначаються під час стерилізації безперервно, мікробіологічний контроль після стерилізації	Р = 0,05 МПа, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.2.3. *. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту у посівному апараті об'ємом 10 л*	**Композиція В** Тиск, час, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тривалість і тиск визначаються під час стерилізації безперервно, мікробіологічний контроль після стерилізації	Р = 0,15 МПа, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.3.1. *. Приготування і стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 100 л.*	**Композиція А** Тиск, час, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тривалість і тиск визначаються під час стерилізації безперервно, мікробіологічний контроль після стерилізації	Р = 0,05 МПа, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти

Продовження табл. 7.1.1

Кт, Км 3.3.2. *. Приготування і стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 100 л.*	**Композиція А** Тиск, час, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тривалість і тиск визначаються під час стерилізації безперервно, мікробіологічний контроль після стерилізації	P = 0,05 МПа, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1 *Підтримання колекційної культури*	**Колекційна культура *Escherichia coli* DE3**, температура, мікробіологічна чистота	Холодильник, мікробіологічний контроль	Температура – безперервно при зберіганні, мікробіологічний контроль – кожні 3-4 місяці	t = 2 – 4 °C, τ = 3 – 4 місяці, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 4.2 *Одержання робочої культури*	**Робоча культура *Escherichia coli* DE3 на чашках Петрі** температура, мікробіологічна чистота	Термостат, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час вирощування, мікробіологічний контроль проводять після вирощування	t = 37 °C, τ = 24 год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 4.3 *Вирощування культури на щільному середовищі*	**Робоча культура *Escherichia coli* DE3 у пробірках** температура, мікробіологічна чистота	Термостат, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час вирощування, мікробіологічний контроль проводять після вирощування	t = 37 °C, τ = 24 год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 4.4 *Вирощування культури у колбах на качалках*	**Посівний матеріал** температура, час, pH, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота	Термометр, годинник, тахометр, мікробіологічний контроль	Температура, pH і частота обертів мішалки контролюються автоматично під час вирощування, мікробіологічний контроль проводять після вирощування	t = 37 °C, τ = 12 год, w = 220 об/хв, pH = 6,8-7,0, відсутність сторонньої мікробіоти

Закінчення табл. 7.1.1

Кт, Км, Кх 4.5 *Вирощування інокуляту у посівному апараті об'ємом 10 л*	**Посівний матеріал** Температура, час, pH, концентрація розчиненого кисню, мікробіологічна чистота	Датчик температури і pH, годинник, тахометр, датчик pO_2, ротаметр, мікробіологічний контроль	Температура, pH, частота обертів мішалки і концентрація розчиненого кисню контролюються автоматично під час вирощування, мікробіологічний контроль – кожні 4 год і після культивування	t = 37 °C, τ = 12 год, pH = 6,8-7,0, pO_2 = 20 – 30%, w = 220 об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км, Кх 5.1 *Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 100 л*	**Культуральна рідина** Температура, час, pH, концентрація розчиненого кисню, концентрація рекомбінантного альбуміну , мікробіологічна чистота,	Датчик температури, годинник, тахометр, датчик pO_2, ротаметр, мікробіологічний контроль	Температура, pH, частота обертів мішалки і концентрація розчиненого кисню контролюються автоматично під час вирощування, визначення концентрації рекомбінантного альбуміну і мікробіологічний контроль – кожні 4 год і після культивування	t = 37 °C, τ = 48 год, pH = 6,6-6,8, pO_2 = 20 – 30%, w = 220 об/хв відсутність сторонньої мікробіоти

7.2. Мікробіологічний контроль

Мікробіологічний контроль здійснюють з метою перевірки стерильності поживних середовищ для вирощування культури-продуцента. Також, мікробіологічний контроль проводять для середовищ біосинтезу цільового продукту. Основна мета – перевірка чистоти виробництва, та запобігання контамінації реакторів, для забезпечення GMP-відповідних умов виробництва.

Важливо зазначити, що з кожної виробленої серії готового цільового продукту, необхідно відбирати декілька зразків готового продукту, і зберігати у музеї, за зазначеними термінами придатності продукту, для контролю стабільності і якості виробництва. Методики мікробіологічного контролю на виробництві, мають бути валідовані, і протоколи контролю додаватися до протоколу виробничої серії препарату.

Таблиця 7.2.1. Етапи контролю на виробництві:

№ к.т.	***Об'єкт контролю та показник, що визначається***	***Засоби та методи контролю***	***Періодичність перевірки та відбору проб***	***Нормативні значення показника***
1.	Трансформація культури клітин	PCR-RT	Одноразово перед внесенням їх у реактор	Наявність в трансформованих клітинах плазмід; Наявність експресуючої активності
2.	Контроль чистоти композиції А (суміш гліцерин, глюкоза, лактоза, триптон та дріжджовий екстракт)	Висів у холосту пробірку; Мікроскопія	Мікробіологічний контроль після стерилізації суміші	Відсутність сторонньої мікрофлори
3.	Контроль чистоти середовища ZYM-5052	Висів у холосту пробірку; Мікроскопія	Мікробіологічний контроль після стерилізації середовища	Відсутність сторонньої мікрофлори

4.	Періодичний контроль чистоти культури	Висів на середовище з додаванням Ампіциліну	Мікробіологічний контроль у ході росту продуценту; Точка контролю 1 раз на 12 годин	Відсутність будь-якої мікрофлори, окрім *E.coli* Origami (DE3)
5.	Контроль чистоти цільового продукту	Контроль складу білку за методом електрофорезу.	Контроль здійснюється після фракціонування та осадження білку	Не більше 4 % білків можуть відрізнятись від альбуміну за електрофоретичною рухливістю (За п. 5, ДФУ/Eur.Ph. 2.2.3)
6.	Контроль чистоти цільового продукту	Контроль прозорості здійснюється після спиртового освітлення	Контроль здійснюється після фракціонування та осадження білку	Розчин має бути прозорим або за ступенем опалесценції не перевищувати еталон II (За п. 2, ДФУ/Eur.Ph. 2.2.1)
7.	Контроль чистоти цільового продукту	Контроль стерильності; Висів та мікроскопія; Контроль за допомогою фільтрації рідини на поживне середовище	Контроль здійснюється періодично на кожному етапі: Після фракціонування; Після фільтрації; Після розливу у флакони	Препарат повинен бути стерильним

Трансформація культури клітин - контроль трансформантів:

I. ***Опис.*** *Культура має трансформуватися після інсерції плазміди в неї.*
II. ***Ідентифікація.*** *Проводиться висів культури після трансформації, на середовище МПА з додаванням Ампіциліну.*

Контроль - висів частини культури до трансформації на середовище з ампіциліном - ріст має бути відсутній.

Облік результатів - наявність білих колоній з металевим блиском на середовищі з додаванням ампіциліну.

Трансформовані культури контролюються за допомогою методології проведення тесту ПЦ в реальному часі, з додаванням флюорисцентної мітки при ампліфікаціїї до плазміди.

Ч-ПЛ контролює кількість проби в кожному циклі. Це робиться за допомогою спеціальних зондів, що світяться. В отриманих результатах - можна побачити плато функціонування плазміди у відповідній культурі - та продукцію відповідного білку.

Якщо плато відсутнє - відбулось порушення при трансформації культури, необхідно провести повторну трансформацію.

Контроль чистоти

Усі контролі чистоти на відповідних точках контролю, проводять висівами на середовища - і перевірка наявності росту. Якщо росту немає - усе чисто. Наявність росту, буде свідчити про контамінацію і порушення на етапах виробництва.

Контролі чистоти приміщень - висівом методом сендиментації по Коху[53].

Контроль готового цільового продукту – Альбуміну. Опис методик електрофорезу:

I. ***Опис.*** *Прозора в'язка рідина від жовтуватого до світло-коричневого кольору, допускається зеленуватий відтінок. Визначають візуально.*

II. ***Ідентифікація.*** *Основний компонент має відповідати основному компоненту сироватки людини нормальної. У розчині можуть бути наявними невеликі кількості інших білків. Випробування проводять методом імуноелектрофорезу згідно з* ***ДФУ/Eur.Ph. 2.7.1.*** *[5]*

Випробовуваний розчин і є отриманим у ході синтезу альбуміном. Препарат розводять розчином 9 г/л натрію хлориду до концентрації білку 10 г/л[48].

Розчин порівняння.

Плазму крові людини нормальну, розводять водою до концентрації білку 10 г/л.

Електродний буферний розчин.

8.0 г N-трис(гідроксиметил)метилгліцину (Merck, 108602 або аналогічної якості) і 1.0 г натрію хлориду розчиняють у 600 мл води, встановлюють pH 8.2 1 М розчином натрію гідроксиду та доводять водою до об'єму 1000 мл. Термін придатності розчину 3 міс.

1% агарозний гель. До 1 г агарози (Merck, 101236 або аналогічної якості) додають 50 мл води і нагрівають на киплячій водяній бані до повного розчинення. Отриманий розчин доводять до об'єму 100 мл підігрітим електродним буферним розчином, додають 0.1 г мертіоляту натрію і перемішують. Гель повинен бути однорідної консистенції,

прозорий і не повинен містити механічних включень. Термін придатності гелю 2 міс.

Розчин для фарбування.

До 1 г амідо-чорного 10В додають невелику кількість води та 70 мл кислоти оцтової льодяної, доводять водою до об'єму 1000 мл і перемішують до повного розчинення барвника.

Розчин для відмивки.

До 25 мл кислоти оцтової льодяної додають 20 мл гліцерину і доводять водою до об'єму 1000 мл.

На знежирені прозорі скляні пластинки розміром 120´90 мм наносять розплавлений і охолоджений до температури (55±5) °С агар з розрахунку 20 мл розплавленого гелю на пластину. Після застигання в гелі вирізають лунки діаметром 2-3 мм.

Пластини встановлюють в приладі для електрофорезу та з'єднують з електродним буферним розчином в електродних камерах.

По 20 мкл випробовуваного розчину і розчину порівняння вносять у лунки пластинки з агарозним гелем.

Електрофорез проводять за напруги 70-150 В і силі струму 10-50 мА протягом 2-3 год. Процес електрофорезу зупиняють, коли фронт розчину порівняння буде знаходитися на відстані 20-25 мм від лунки. Після проведення електрофорезу дістають пластини з приладу, між доріжками вирізають поперечні канавки 10´2 мм, у які вносять розчинену сироватку для ІЕФ (Anti-Human Serum antibody produced in rabbit, H3383, Sigma або аналогічна). Пластини поміщають у вологу камеру і витримують при температурі (5±3) °С протягом 48 год[35].

Пластини фотографують контактним методом в транзитному світлі або висушують і фарбують розчином для фарбування. Для цього пластини поміщають у кювети, заливають розчином 9 г/л натрію хлориду і витримують протягом 16-18 год для відмивання від непреципітованих білків.

Потім пластини з гелем накривають фільтрувальним папером, змоченим у розчині 9 г/л натрію хлориду, і сушать на повітрі до перетворення агарозного гелю в тонку плівку. Висушені пластини поміщають в кювети з розчином для фарбування на 5-10 хв. Потім відмивають за допомогою розчину для відмивки протягом 30-40 хв. і знову висушують.

Оцінюють локалізацію і число ліній преципітації препарату відносно ліній преципітації плазми крові людини візуально.

III. ***Прозорість.*** *Препарат має бути прозорим у порівнянні з водою або розчином 9 г/л натрію хлориду або за ступенем опалесценції не перевищувати еталон II. Випробування проводять згідно з* ***ДФУ/Eur.Ph. 2.2.1.*** [5]

Склад білків у готовому продукті.

Не більше 5% білків можуть відрізнятись від альбуміну за електрофоретичною рухливістю. Випробування проводять згідно з ДФУ/Eur.Ph. 2.2.31, методом зонального електрофорезу на плівках з ацетату целюлози[42].

Випробовуваний розчин.

Препарат розводять розчином 9 г/л натрію хлориду до концентрації білку 20 г/л.

Розчин порівняння.

БСП альбуміну для електрофорезу (Human albumin for electrophoresis BRP або аналогічний) розводять розчином 9 г/л натрію хлориду до концентрації білку 20 г/л.

Перед аналізом, відбирають по 0.1 мл розчину порівняння і випробуваного розчину в окремі мікропробірки, додають по 2 мкл розчину бромфенолового синього і добре перемішують.

Розчин бромфенолового синього.

0.05 г бромфенолового синього розчиняють у 2.0 мл оцтової кислоти льодяної і доводять об'єм розчину водою до 100.0 мл.

Електродний буферний розчин.

8 г N-трис(гідроксиметил) метилгліцину (Merck, 1.08602 або аналогічної якості) та 1 г натрію хлориду розчиняють у 600 мл води, потенціометрично встановлюють pH 8.4 1 М розчином натрію гідроксиду та доводять водою до об'єму 1000 мл. Термін придатності при температурі від 2 ^{o}C до 8 ^{o}C – 3 міс.

Підготовка плівки.

У кювету поміщають 100 мл електродного буферного розчину. На поверхню буферного розчину гладкою стороною вверх кладуть плівку з ацетату целюлози, витримують протягом 2 хв. Плівку виймають пінцетом, надлишок вологи видаляють, промокнувши її між двома листами фільтрувального паперу. Плівки готують безпосередньо перед використанням.

Проведення випробування.

В електродні секції електрофоретичної камери вносять електродний буферний розчин. На зволожені електродним буферним розчином плівки з ацетату целюлози розміром 57×140 мм на стартове положення з матової сторони наносять за допомогою аплікатора випробовуваний розчин та розчин порівняння по 0.25 мкл/мм довжини смуги.

Зафіксовану в рамці плівку поміщають в камері так, щоб лінія нанесення зразків знаходилась ближче до катоду. Електрофоретичне розділення проводять впродовж 1 год при напрузі 110 В.

Після розділення плівку обробляють амідо-чорного 10В розчином впродовж 5 хв. Знебарвлюють сумішшю оцтова кислота льодяна – метанол (10:90) до знебарвлення тільки фону і обробляють сумішшю оцтова кислота льодяна – метанол (19:81). Плівку поміщають на скло, видаляють надлишок розчину і просушують при кімнатній температурі.

Обробку електрофореграм проводять методом *денситометрії.*

Ідентифікацію білкових фракцій препарату проводять шляхом порівняння електрофореграм випробовуваного розчину і розчину порівняння.

Придатність системи.

На електрофореграмі розчину порівняння кількісне співвідношення білку в основній смузі має знаходитися в межах, зазначених у супровідній документації до стандартного препарату.

7.3. Показники росту і синтезу цільового продукту

7.3.1. Визначення концентрації джерела азоту та вуглецю

Ключовим джерелом карбону у поживному середовищі є гліцерин, лактоза та триптон.

Ключовим параметром контролю наявності джерела вуглецю при культивуванні промислового штаму є визначення гліцерину при культивації.

Метод визначення гліцерину[49]. Залишкову концентрацію гліцерину оцінюють за стандартним протоколом[23]. Тобто, 1,2 мл 10 мМ розчину перйодату натрію додають до 2 мл супернатанту культуральної рідини або еталонного розчину гліцерину в чистій скляній пробірці. Згодом до кожного флакона додають 1,2 мл 0,2 М розчину ацетилацетону. Пробірки інкубують на водяній бані при 70°С протягом 1 хв. Потім пробірки негайно охолоджують до кімнатної температури і реєструють поглинання при 410 нм. Абсолютне значення концентрації гліцерину визначають за допомогою рівняння калібрування, що отримують з графіка між відомою кількістю концентрації гліцерину та відповідним поглинанням при 410 нм.

$$Концентрація\ гліцерину(мг/л^{-1}) = A_{410}/13{,}492$$

Де A_{410} – поглинання при 410 нм

Розчин перйодату натрію готують додаванням 21 мг перйодату натрію в 5 мл 1,6 М основного розчину оцтової кислоти. Розчин перемішують, щоб розчинити перйодат, а потім до розчину додають 5 мл 4,0 М розчину ацетату амонію.

Ключовим джерелом нітрогену у поживному середовищі є триптон і дріжджовий екстракт.

Метод визначення азоту. Азот у цих сумішах міститься у вигляді амінокислот (амінний азот). Для визначення концентрації пептону та дріжджового екстракту визначають кількість амінного азоту (його вміст в цих компонентах 5 %). Далі використовують метод формольного титрування (Серенсена). До супернатанту з культуральної рідини об'ємом 20 мл додають 5 мл формальдегіду та залишають на 2 хв. Потім до розчину додають 3 краплі фенолфталеїну та здійснюють титрування 0,1 М розчином NaOH до появи стійкого блідо-рожевого забарвлення. За витраченим об'ємом лугу розраховують концентрацію амінного азоту в мг/мл (г/л)[2].

Кислотне число (КЧ) обчислюють за формулою:

$$X = V * C * k,$$

де V – кількість розчину лугу, використаного на титрування, мл;

С – концентрація розчину натрій гідроксиду;

k – коефіцієнт відповідності 1 мл розчину 1 М натрій гідроксиду та масі Нітрогену, що дорівнює 14 (мг)/(1 мл 1 М NaOH).

7.3.2. Визначення концентрації цільового продукту

Наприкінці періоду культивування нормалізовані (для перехресного порівняння брали однакову кількість клітин) об’єми індукованої клітинної суспензії на основі кількості клітин на одиницю об’єму збирали та центрифугували при 6000 об/хв при 4°C протягом 15–20 хв. Осад клітин ресуспендували в 10 мл холодного буферу для лізису клітин pH 7,4 (10 мМ Tris, 100 мМ NaCl і 1 мМ дитіотриїтол), що містить осмоліт, і інкубували у льодяній воді протягом 15 хв.

Ресуспендовані клітини піддавали впливу ультразвукового руйнівника клітин для вивільнення внутрішньоклітинних компонентів у буфері лізису. Оброблений ультразвуком клітинний лізат центрифугували при 10000 об/хв протягом 45 хвилин при 4°C. Супернатант ретельно відсмоктували, не порушуючи осад, і осад ресуспендували в рівному об’ємі буфера для лізису.

Після осадження альбуміну в ізоелектричній точці, фракціонуванні, очистці від клітин бактерій визначається його отримана концентрація, для того, щоб була можливість доводити його до необхідної концентрації під розлив у флакони.

Кількість згорнутого білка в клітині можна оцінити на основі принципу, згідно з яким білки з тривимірною структурою розчиняються в цитоплазмі та у водних буферах, тоді як денатуровані білки є нерозчинними і зустрічаються у вигляді агрегатів [59]. Крім того, щоб оцінити ступінь правильного внутрішньоклітинного згортання rHSA, індуковані клітини осадили, ресуспендували в буфері для лізису та лізували ультразвуком для вивільнення внутрішньоклітинних компонентів у буфері для лізису. Розчинні компоненти відокремлювали від нерозчинної маси центрифугуванням клітинного лізату. Супернатант і осад ресуспендували в буфері для завантаження SDS і аналізували за

допомогою SDS-PAGE. Білкові смуги візуалізували за допомогою фарбування кумасси Brilliant Blue R250. Відносну кількість білка в розчинній і гранульованій фракціях вимірювали шляхом вибору смуги цілого клітинного екстракту як еталонної смуги за допомогою параметра «кількісні інструменти» панелі інструментів аналізу за допомогою Image

Лабораторне програмне забезпечення в Bio-Rad Molecular Imager Gel Doc XR + апарат для денситометричного аналізу.

$$\text{Розчинність (\%)} = \frac{\text{Інтенсивність смуги } rHSA \text{ в розчинній фракції клітинного лізату}}{\text{Інтенсивність смуги } rHSA \text{ у всьому клітинному лізаті}} \times 100$$

Сироватковий альбумін людини виявляє естеразоподібну активність [52]. Естеразну активність супернатанту, отриманого з фракціонованого клітинного лізату, проводили в 1 мл реакційної суміші при 25 °C, що містить 1 мкМ п-нітрофенілацетату (pNPA, забуферений 50 мМTріс, 50 мМ NaCl і 1 мМ DTT, pH 7,4) як субстрат для rHSA. Утворення р-нітрофенолу (pNP) вимірювали спектрофотометрично при довжині хвилі 410 нм після додавання нормалізованого об'єму (однакова кількість клітин на одиницю об'єму) клітинного лізату, що містить рівну кількість загальних білків, визначених методом Бредфорда, в реакції суміші та записували кожні 5 с протягом 10 хв, використовуючи застосування кінетики/часу в спектрофотометрі DU 800 Beckman Coulter. Нахил Te (ΔC/Δt), який представляє швидкість утворення продукту (п-нітрофенолу), визначали з початкової лінійної області кривої. Коефіцієнт екстинкції (ε) 18,3 мМ−1см−1 використовувався для п-нітрофенолу при 410 нм. Тут одна одиниця активності HSA відповідає 1 нмоль pNP, виробленого з pNPA за хвилину. Активність HSA виражається як наномоль вивільненого pNP/хв/г маси сухої клітини.

$$\text{Естеразна активність } HSA = \frac{(\frac{\Delta C}{\Delta t} - \frac{\Delta C}{\Delta t}\text{чистий}) \times V_r \times D \times 1000}{\varepsilon \times V_S \times d}$$

де

- (ΔC/Δt) – нахил кривої аналізу активності в мМ/хв при 410 нм;
- (ΔC/Δt чистий) — нахил кривої аналізу активності за відсутності ферменту в мМ/хв при 410 нм;
- ε – коефіцієнт екстинкції pNP у $мМ^{-1}$ см−1;
- Vr – об’єм реакційної суміші в мл;
- Vs – об’єм використаного клітинного лізату в мл;
- D — кореляція між OD600 нм і сухою вагою клітини на грам DCW;
- d — довжина шляху в см

РОЗДІЛ 8. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ

8.1. Аналіз технологічної схеми виробництва альбуміну на місця емісії твердих, рідких та газоподібних відходів

Технологічна схема виробництва альбуміну включає доферментаційні процеси (санітарна підготовка виробництва, приготування і стерилізація поживного середовища для культивування), ферментаційні процеси (отримання посівного матеріалу, виробниче культивування).

1. Санітарна підготовка виробництва. На зазначеному етапі проводиться щоденне та генеральне прибирання приміщень з використанням мийно-дезинфікуючого засобу «Славін-Дельта». Після використання робочого розчину мийно-дезинфікуючого засобу проводиться його злив в каналізацію.

Миття ємнісного обладнання здійснюється за допомогою використання CIP-мийки мийно-дезинфікуючим засобом «Фамідез® Комбі». Після процесу обробки відпрацьований розчин надходить до збірника та може бути використаний ще раз, а промивну воду зливають до каналізації. *Даний етап є місцем емісії рідких відходів*.

2. Приготування та стерилізація поживного середовища для отримання посівного матеріалу та виробничого біосинтезу

Даний етап характеризується наступними діями:

- ✓ перевірка компонентів складу поживного середовища на відповідність показникам якості;
- ✓ у випадку невідповідності встановленим показникам - відбракування сировини.

На цьому етапі зазвичай утворюються тверді відходи, а саме пакувальні матеріали від сировини. *Даний етап є місцем емісії твердих відходів.*

3. Підготовка посівного матеріалу

На цьому етапі здіснюється вирощування посівного матеріалу в інокуляторах. Так як посівний матеріал використовується для засіву наступного ферментера, відходи посівного матеріалу не враховуються.

Оскільки біологічний агент *Escherichia coli* DE3 є факультативним анаеробом, необхідним процесом при культивуванні є аерація поживного середовища. З цієї причини під час культивування буде утворюватись великий об`єм відпрацьованого повітря. *Даний етап є місцем емісії великої кількості газоподібних відходів.*

4. Виробничий біосинтез

На цьому етапі відбувається культивування *Escherichia coli* DE3 для отримання рекомбінантного льбуміну (процес культивування також включає аерацію поживного середовища). Після завершення біосинтезу культуральна рідина надходить до збірника перед виділенням альбуміну, тому рідкі відходи на даному етапі не враховуються. Д*аний етап також є місцем емісії великої кількості газоподібних відходів.*

8.2. Перспективи впровадження системи екологізації виробництва

8.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів

Розрахунок об`ємів відходів.

Для щоденного та генерального прибирання готують розчин «Славін-Дельта» концентрацією 0,03%. За один цикл виробництва (58 год) витрачається 87 л робочого розчину «Славін-Дельта», який після миття зливається у каналізацію. Обладнання миють 0,05%-им розчином «Фамідез® Комбі» за допомогою CIP-мийки, об`єм відходів за один цикл 317 л. Мийно-дезинфікуючі засоби «Славін-Дельта» та «Фамідез® Комбі» мають клас безпеки IV, а тому є безпечними для навколишнього середовища. Узагальнена характеристика рідких відходів виробництва наведена у табл. 8.2.1.

Таблиця 8.2.1

Характеристика рідких відходів під час виробництва

Назва складової рідких відходів	**Речовини, які входять до складу відходів**	**Приблизний об'єм відходів на 1 цикл виробництва (л)**	**Клас небезпеки**
0,03% розчин «Славін-Дельта»	глутаровий альдегід — 3,0%, полігексаметиленгуанідин гідрохлорид — 2,5%, алкилдиметил-бензиламонию хлорид - 2,5% (діючі речовини) хелатний комплекс, антикорозійний комплекс, миючі компоненти, інші функціональні добавки, вода де-мінералізована — до 100,0%.	87	IV
0,05% розчин «Фамідез® Комбі»	**100 г засобу містить:** 16,0 г діметилбензилкокосжирноалкіламонію хлориду 9,6 г кокоспропілендіамін-1,5-бігуанідину діацетату	317	
Всього		404	

Утилізацію рідких відходів пропонується здійснювати за допомогою біологічної очистки – аеротанків. Аеротанк являє собою резервуар прямокутного перерізу глибиною 3-6 м, виготовлений з металу, монолітного або збірного залізобетону або пластмаси [9].

Перед подачею стічних вод для очищення до аеротанків необхідно довести їх pH до значення 6,5 – 7,5, щоб запобігти інактивації активного мулу, і, як наслідок, недостатньому очищенню.. Цей процес буде здійснюватися за використання розчину гідроксиду натрію.

Пропонується застосування аероцистерн-віджимок (рис. 8.2.1), у передню частину якого подаються вода і мул, а в кінці суміш скидається. У таких аеротанках можна досягти високої глибини очищення, однак при залповому викиді забруднюючих речовин, який зазвичай характерний для промислових стоків, активний мул перевантажується, втрачає свою активність, набухає і виноситься з вторинних відстійників. Але оскільки обсяги рідких відходів порівняно невеликі, ця загроза невелика [9].

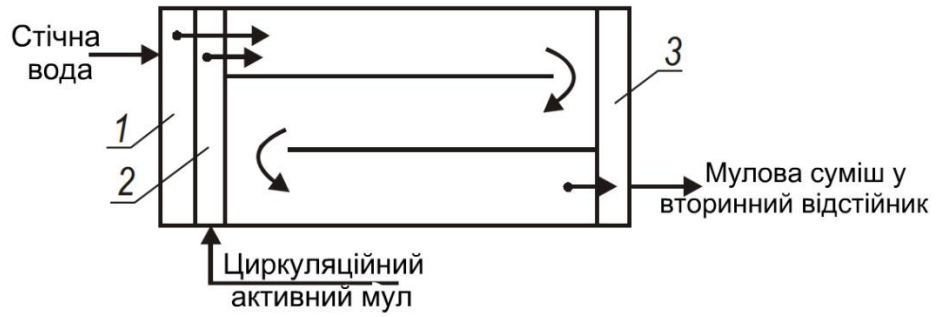


Рис. 8.2.1. Аероцистерна-віджимка: 1 – канал стічних вод; 2 – канал циркуляційного активного мулу; 3 – канал мулової суміші.

Далі на рис. 8.2.2 наведена схема установки для біологічного очищення стічних вод, в якій використовуються аеротанки [3].

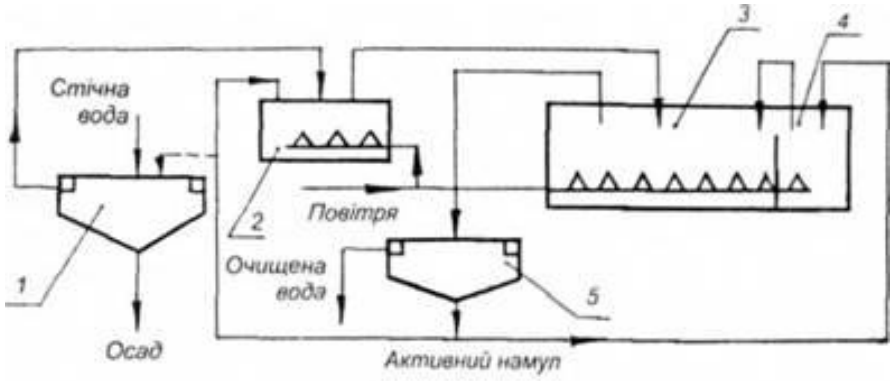


Рис. 8.2.2. Схема установки для біологічного очищення стічних вод із використанням аеротенків: 1 — первинний відстійник; 2 — передаератор; 3 — аеротенк; 4 — регенератор; 5 — вторинний відстійник.

Установка працює наступним чином: стічні води подається у первинний водозбірник, де видаляються збурені частинки забруднюючих речовин. Для поліпшення седиментації у водозбірник подається частина надлишкового мулу. Згодом освітлена вода проходить у преаератор. У данний апарат також надходить достатньо велика частина надлишкового мулу із вторинного відстійника, де стічні води попередньо аеруються повітрям протягом 15-20 хв. Також зазвичай рекомендується внесення до преаератора нейтралізуючих добавок і поживних речовин.

Із попередньої стадії очистки стічна вода подається в аеротанк, по якому також циркулює активний мул. Біохімічні процеси в аеротанку протікають у два етапи:

1) адсорбція органічних речовин поверхнею активного мулу та мінералізація легкоокислюваних речовин з інтенсивним споживанням кисню;

2) доокислення повільно окислюваних органічних речовин і регенерація активного мулу. На цьому етапі кисень споживається досить повільно.

Аеротанк розділений на дві частини: регенератор (25 % від загального об'єму) й аеротанк, в якому проходить основний процес очищення. Більш концентровані стічні води можуть очищатися із вищою продуктивністю та швидкістю при попередньому використанні регенератора. Тим самим покращується можливість щодо поліпшення продуктивності агрегата.

Потім стічні води з мулом надходять у вторинний відстійник, де мул відділяється від води. Велика частина осаду повертається в аеротенк, а надлишки – в преаератор [3].

8.2.2. Система знешкодження та утилізації твердих відходів

Розрахунок об`ємів відходів.

Тверді відходи, які утворюються на етапах санітарної підготовки виробництва та приготування поживного середовища, являють собою упаковки, в якій поставляються мийно-дезинфікуючі засоби та компоненти середовища. Упаковка від засобів «Славін-Дельта» та «Фамідез® Комбі» виготовлена з поліетилену високої щільності і піддається вторинній переробці. Упаковка від дріжджового екстракту (25 кг) складається з мішкового паперу і також піддається вторинній переробці. Компоненти поживного середовища (триптон, лактоза, глюкоза та ін.) постачаються у мішках з полівінілхлориду. У зв'язку з тим, що полівінілхлорид відрізняється від звичайного пластику, даний вид матеріалу пакування потребує окремої вторинної переробки.

Таблиця 8.2.2

Характеристика твердих відходів під час виробництва

Назва складової твердих відходів	**Речовини, які входять до складу відходів**	**Приблизний об'єм відходів на 1 цикл виробництва (кг)**	**Клас небезпеки**
Упаковка «Славін-Дельта» та «Фамідез® Комбі»	Поліетилен високої щільності	0,98	IV
Упаковка дріжджового екстракту	Мішковий папір	2,78	
Упаковка компонентів поживного середовища	Полівінілхлорид	1,86	
Всього		5,62	

Упаковки від миючих засобів та компонентів середовища сортують (окремо поліетилен, полівінілхлорид та папір) та відправляють на подальшу переробку до пунктів прийому вторинної сировини.

8.2.3. Система знешкодження газоповітряних викидів

Розрахунок об`ємів відходів.

Газоподібні відходи утворюються на етапах підготовки посівного матеріалу та виробничого культивування.

Тривалість підготовки посівного матеріалу в інокуляторі становить 12 год, а виробничий біосинтез займає 48 год. Аерацію здійснюють зі швидкістю 1 л/лКР/хв. Для підготовки інокуляту використовують посівний апарат з робочим об’ємом: 5 л, а для виробничого біосинтезу 1 ферментер з робочим об’ємом 50 л. Отже, приблизний об`єм відпрацьованого повітря за цикл ферментації становить:

$$(12 \cdot 5) + (48 \cdot 50) = 2460 \text{ л} = 2{,}46 \text{ м}^3$$

Таблиця 8.2.3

Характеристика газоподібних відходів під час виробництва

Назва складової газоподібних відходів	**Речовини, які входять до складу відходів**	**Приблизний об’єм відходів на 1 цикл виробництва ($м^3$)**	**Клас небезпеки**
Відпрацьоване повітря після ферментації	Вуглекислий газ	2,46	IV

Очищення газоподібних викидів пропонується здійснювати за використання скруберів.

Такі агрегати вловлюють пил та зважені частинки за рахунок дифузійних і електростатичних сил, що утворюються при турбулентності середовища, яке потрібно очистити. Через вхідну трубку, розташовану внизу скрубера, надходить середовище для очищення. Вона проходить через вхідний патрубок, потім під тиском йде вгору по корпусу. Далі потік зустрічається з зрошувальними ярусами, де за рахунок розпилення

води або впливу хімічних реагентів відбувається очищення. Тут осідають домішки, крім того, середовище охолоджується.

Після очищення та охолодження газоповітряний потік надходить через верхню трубу в атмосферу або знову прямує в технологічний вузол.

У бункері (відстійнику) накопичується шлам. Його або утилізують, або повторно використовують у виробничому циклі. Скруббер для очищення може конструюватися вертикально чи горизонтально. Система розробляється таким чином, щоб заощадити робочий простір. Об'єм камери також відрізняється. Ступінь очищення установок сягає 99,9% [15].

8.2.4. Заходи щодо зменшення об’ємів відходів

**Заходи для зменшення об`ємів рідких відходів.** З метою зменшення об`ємів стічних вод процес миття здійснюється за використання CIP-мийки.Це дає змогу витрачати меншу кількість мийно-дезинфікуючого засобу та використовувати розчин кілька разів після його очищення.

Заходи для зменшення об`ємів газоподібних відходів. Відпрацьоване аераційне повітря після фільтрування можна повторно використовувати у процесах на виробництві, наприклад як теплоагент.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Апарати стальні емальовані з механічним змішуючим пристроєм. [Електронний ресурс] – режим доступу: http://euromash.kiev.ua/ua/aparati_emal_mehanicheskim_perem_ustroystvom_ua.php.
2. Безуглий П. О. и др. Фармацевтична хімія //Вінниця: Нова книга. – 2006. – С. 68-69.
3. Біологічне очищення стічних вод [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://pidruchniki.com/1333122241666/ekologiya/biologichne_ochischennya_stichnih_vod
4. Варламова С. І. Екологізація промисловості в Україні: проблеми та перспективи. *Ефективна економіка*. 2016; 1: 2-5.
5. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». — 2-е вид. — Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2016. — 360 с. ISBN 978-966-97390-2-5
6. Державний реєстр лікарських засобів України. [Електронний ресурс] – режим доступу: http://www.drlz.com.ua/
7. Дозатор ваговий автоматичний шнековий обліковий ДВП-3У. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://asvik.kiev.ua/ua/catalog/group/product/32.
8. Дозатор води та рідин. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://agro-teh.com.ua/p370228267-dozator-vody-zhidkostej.html?source=merchant_center&gclid=Cj0KCQjwtrSLBhCLARIsACh6Rmg3hZ-cvrBWpA8goQ-8Oxmi2D6GbLGCLWzYTABpFEqO4zkhM4ft2A4aArhCEALw_wcB.
9. Екологічна біотехнологія: Конспект лекцій з дисципліни для студ. спец. 6.070800 “Екологія та охорона навколишнього середовища” напряму 0708 „Екологія” ден. форми навч. / Уклад. Н.О.Бублієнко. – К.: НУХТ, 2005. [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://dspace.nuft.edu.ua/handle/123456789/2704

10. Насос поверхностный Speroni CAM INOX 80-HL. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://teploradost.com.ua/nasos-poverhnostnyj-speroni-cam-inox-80hl.
11. Перистальтичні насоси TapFlo. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://tapflo.ua/images/pt_ptl_ua_rev1_2019.pdf.
12. Повітрозабірник. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://klimatkomplekt.com.ua/ru/produkciya/ffhec/.
13. Ресивери ZELKO. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://www.zelko.ua/vozduhopodgotovka/resivery?gclid=CjwKCAjw49qKBhAoEiwAHQVTo3bIMXMTbTvK7Ytv9QptHJcJ7JPXTFOv9ZlUH1KtZ2kqsVZ5UHSp6xoC4LIQAvD_BwE.
14. Розпорядження КМУ від 07.05.2022 р. № 355-р. «Про тимчасове зупинення експорту препаратів крові». [Електронний ресурс] – режим доступу: https://www.apteka.ua/article/634381
15. Скрубер – очищення повітря від шкідливих домішок та аерозолів [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://arsenalsystems.ua/skrubber/
16. Теплообмінник нагрівач. [Електронний ресурс] – режим доступу: http://www.systemair-ukraine.com/ua/air-heaters.html
17. Турбокомпресори ID TURBO COMPRESSOR серії T2 (IHI-DALGAKIRAN). [Електронний ресурс] – режим доступу: https://dalgakiran.ua/uk/products/centrobizhni-kompresory-ihi-dalgakiran-seriyi-t2/.
18. Фільтр кишеньковий прямокутний Турбовент ВКФ 900х500. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://turbovent.com.ua/ua/p1581210021-filtr-karmannyj-pryamougolnyj.html.
19. Фільтр кишеньковий тонкої очистки повітря F5-F9. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://air-klimat.prom.ua/ua/p206908809-filtr-karmannyj-tonkoj.html.
20. Центробежный поверхностный насос Speroni CS 50-160 D 3 кВт. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://teploradost.com.ua/centrobezhnyj-poverhnostnyj-nasos-speroni-cs-50160-d-3-kvt.
21. Центробіжні насоси. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://techbaza.ua/ua/p1279277080-nasos-tsentrobezhnyj-055kvt.html.
22. Центробіжні насоси. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://techbaza.ua/ua/p1279277138-nasos-tsentrobezhnyj-380v.html.
23. An alternative spectrophotometric method for the determination of free glycerol in biodiesel Eur. J. Lipid Sci. Technol., 107 (2005), pp. 153-157, [Електронний ресурс] – режим доступу: https://doi.org/10.1002/ejlt.200401054

24. Australian and New Zealand Intensive Care Society (ANZICS) Adult Patient Database (APD) Management Committee, et al. "The outcome of patients with sepsis and septic shock presenting to emergency departments in Australia and New Zealand." *Critical Care and Resuscitation* 9.1 (2007): 8-18.

25. Bécamel, C., Galéotti, N., Poncet, J. *et al.* A proteomic approach based on peptide affinity chromatography, 2-dimensional electrophoresis and mass spectrometry to identify multiprotein complexes interacting with membrane-bound receptors. *Biol Proced Online* 4, 94–104 (2002). [Електронний ресурс] – режим доступу: https://doi.org/10.1251/bpo39

26. BF серія, фільтри у стальному сварному корпусі, 16 бар. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://compressory.org.ua/catalog_2/sistemy-podgotovki-szhatogo-vozduha/filtry/seriia-bf/.

27. Biostat® Cplus. The Stainless Steel Fermenter|Bioreactor for Your Laboratory. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://www.sartorius.com/download/9612/broch-biostat-cplus-sbi1505-e-data.pdf.

28. Borg JP, Straight, SW, Kaech, SM, de Taddeo-Borg, M, Kroon, DE, Karnak, D, Turner, RS, Kim, SK, Margolis, B. Identification of an evolutionarily conserved heterotrimeric protein complex involved in protein targeting. *J Biol Chem* 1998;273:31633–31636.

29. Chen Z, He Y, Shi B, Yang D. Human serum albumin from recombinant DNA technology: challenges and strategies. Biochim Biophys Acta. 2013;1830:5515–25

30. Douglas K. et al. Clinical Guidelines for Human Albumin Use / Developed for Scotland by the National Plasma Product Expert Advisory Group; 2018.

31. Echelard Y, Williams JL, Destrempes MM, Koster JA, Overton SA, Pollock DP, Rapiejko KT, Behboodi E, Masiello NC, Gavin WG, Pommer J, VanPatten SM, Faber DC, Cibelli JB, Meade HM. Production of recombinant albumin by a herd of cloned transgenic cattle. Transgenic Res. 2009;18:361–76.

32. Evidence-based guideline update: Plasmapheresis in neurologic disorders Report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology I. Cortese, V. Chaudhry, Y.T. So, F. Cantor, D.R. Cornblath, A. Rae-Grant Neurology Jan 2011, 76 (3) 294-300; DOI: 10.1212/WNL.0b013e318207b1f6

33. Fanalia G, Masib A, Trezzab V, Marinob M, Fasanoa M, Ascenzib P. Human serum albumin: from bench to bedside. Mol Aspects Med. 2012;33:209–90.

34. Juneja, R., Gahne, B. Post albumin variants in pig plasma detected by polyacrylamide gel electrophoresis. *Genet Sel Evol* 10, 603a (1978). [Електронний ресурс] – режим доступу: https://doi.org/10.1186/1297-9686-10-4-603A
35. Khoudoli, G.A., Porter, I.M., Blow, J.J. *et al.* Optimisation of the two-dimensional gel electrophoresis protocol using the Taguchi approach. *Proteome Sci* 2, 6 (2004). [Електронний ресурс] – режим доступу: https://doi.org/10.1186/1477-5956-2-6
36. Kobayashi Kaoru. Summary of recombinant human serum albumin development. Biologicals. 2006;34:55–9
37. Lehmann, R. H. (2001). Synergism in Disinfectant Formulation. In S. S. Block (Ed.), Disinfectant, sterlization and preservation (5th ed., pp. 459-472). PA, USA: Lipincott Williams and Wilkins
38. Leibly DJ, Nguyen TN, Kao LT, Hewitt SN, Barrett LK, et al. Stabilizing additives added during cell lysis aid in the solubilisation of recombinant proteins. PLoS ONE. 2012. doi:10.1371/journal.pone.0052482.)
39. Lim JY, Yoon J, Hovde CJ. A brief overview of Escherichia coli O157:H7 and its plasmid O157. J Microbiol Biotechnol. 2010 Jan;20(1):5-14. PMID: 20134227; PMCID: PMC3645889.
40. Malakar P, Venkatesh KV. Effect of substrate and IPTG concentrations on the burden to growth of Escherichia coli on glycerol due to the expression of Lac proteins. Appl Microbiol Biotechnol. 2012;93:2543–9.
41. Melia D., Post B. Human albumin solutions in intensive care: A review / Journal of the Intensive Care Society 0(0) 1-7; 2020.
42. Molloy MP, Herbert BR, Slade MB, Rabilloud T, Nouwens AS, Williams KL, Gooley AA: Proteomic analysis of the Escherichia coli outer membrane. *Eur J Biochem* 2000, 267: 2871–2881. 10.1046/j.1432-1327.2000.01296.x
43. Peters T. All about albumin: biochemistry, genetics, and medical applications. 1st ed. San Diego: Academic Press; 1996
44. Pfaudler DIN AE Reactors. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://www.gmmpfaudler.com/uploads/files/A_Pfaudler-DIN-AE-Reactors-622-4E.pdf.
45. Pfaudler DIN BE Reactors. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://www.pfaudler.com/uploads/files/pfaudler-din-be-reactors-1.pdf.
46. Pfaudler DIN RWA BE Reactors. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://www.thaletec.com/fileadmin/user_upload/_DOWNLOADS/Broschuren_und_Flyer/K005_06E_08_2016_Broschuere_RWA_BE__04_08_2016__ANSICHT.pdf.

47. Quirk AV, Geisow MJ, Woodrow JR, Burton SJ, Wood PC, Sutton AD, Johnson RA, Dodsworth N. Production of recombinant human serum albumin from *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnol Appl Biochem. 1989;11(3):273–87.
48. Rabilloud T: Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but it still climbs up the mountains. *Proteomics* 2002, 2: 3–10. 10.1002/1615-9861(200201)2:1<3::AID-PROT3>3.3.CO;2-I page94–104 (2002)
49. Rana M. S., Prajapati S. K. Stimulating effects of glycerol on the growth, phycoremediation and biofuel potential of Chlorella pyrenoidosa cultivated in wastewater //Environmental Technology & Innovation. – 2021. – Т. 24. – С. 102082. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.102082
50. Romanelli, Roberto Giulio, et al. "Long-term albumin infusion improves survival in patients with cirrhosis and ascites: an unblinded randomized trial." *World journal of gastroenterology: WJG* 12.9 (2006): 1403. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4124318/
51. Rosano GL, Ceccarelli EA. Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges. Front Microbiol. 2014;5:172.
52. Salvi A, Carrupt PA, Mayer JM, Testa B. Esterase-like activity of human serum albumin toward prodrug of nicotinic. Drug Metab Dispos. 1997;25(4):395–8.
53. Sharma, A., Chaudhuri, T.K. Revisiting *Escherichia coli* as microbial factory for enhanced production of human serum albumin. *Microb Cell Fact* 16, 173 (2017). [Електронний ресурс] – режим доступу: https://doi.org/10.1186/s12934-017-0784-8
54. Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 1996;68:850–858.
55. Standard models for 5 ltr autoclave. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://amarequip.com/docs/500ml-5ltr%20Stirred%20Pressure%20Reactor%20Catalog.pdf.
56. Tomar AK, Kumar S, Chhillar S, Kumaresan A, Singh S, Yadav S. Human serum albumin and prolactin inducible protein complex J Proteins Proteom. 2016;7(2):107–13.
57. Tripathi NK, Sathyaseelan K, Jana AM, Rao PVL. High yield production of heterologous proteins with *Escherichia coli*. Defence Sci J. 2009;59:137–46.
58. Wetlaufer DB. Nucleation, rapid folding, and globular intrachain regions in proteins. Proc Natl Acad Sci USA. 1973;70:697–701.
59. Yanase H, Moriya K, Mukai N, Kawata Y, Okamoto K, Kato N. Efects of GroESL coexpression on the folding of nicotinoprotein

formaldehyde dismutase from Pseudomonas putida F61. Biosci Biotechnol Biochem. 2002;66:85–91.
60. Yasumura S. et al. Evidence-based Guidelines for the Use of Albumin Products / Japan Society of Transfusion Medicine and Cell Therapy / Japanese Journal of Transfusion and Cell Therapy, Vol. 63. No. 5 63(5):641-663, 2017.
61. Yoo, S.H.; Jeong, H.; Kwon, S.-K.; Kim, J.F. *Genomics, Biological Features, and Biotechnological Applications of Escherichia coli B: Is B for better*; Springer: Berlin, Germany, 2009.
62. Грегірчак Н.М. Мікробіологія, санітарія і гігієна виробництв з основами НАССР [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобувачів освітнього ступеня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» освітньо-професійної програми «Біотехнологія» денної та заочної форм навчання / Н.М.Грегірчак – К.: НУХТ, 2020. – 177 с.
63. Славін-Дельта. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://lavernamarket.com.ua/ua/p42668208-slavin-delta-dezinfektsiya.html.
64. Фамідез® Комбі. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://famidez.ua/index.php/produktsiya/dezinfektsiya/poverkhni/famidez-kombi