

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

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

«До захисту в ЕК»

Директор інституту(декан факультету)

Наталія ГРЕГІРЧАК

(підпис)

(ім'я та прізвище)

« 08 » грудня 2025 р.

«До захисту допущено»

Завідувач кафедри

Віктор СТАБНІКОВ

(підпис)

(ім'я та прізвище)

« 08 » грудня 2025 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ МАГІСТРА

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код та назва спеціальності)

освітньо-професійної програми «Промислова та фармацевтична біотехнологія»

на тему: «Дріжджі *Kluuyveromyces marxianus* у сучасних біотехнологіях»

Виконала: здобувачка II курсу, групи ПФБ-2-1М

ОНИЩЕНКО Анастасія Анатоліївна

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Керівник СКРОЦЬКА Оксана Ігорівна

(прізвище, ім'я та по батькові повністю)

(підпис)

Консультанти

(прізвище та ініціали)

(підпис)

(прізвище та ініціали)

(підпис)

(прізвище та ініціали)

(підпис)

Рецензент Євген ХАРЧЕНКО

(прізвище та ініціали)

(підпис)

Я як здобувачка Національного університету харчових технологій розумію і підтримую політику університету з академічної доброчесності. Я не надавала і не одержувала недозволеної допомоги під час підготовки цієї роботи. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

Здобувачка _____

(підпис)

Київ – 2025 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь магістр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

Освітньо-професійна програма «Промислова та фармацевтична біотехнологія»

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і
мікробіології

Віктор СТАБНІКОВ

“ 01 ” жовтня 2025 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

ОНИЩЕНКО Анастасії Анатоліївни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи «Дріжджі *Kluyveromyces marxianus* у сучасних біотехнологіях»
керівник роботи СКРОЦЬКА Оксана Ігорівна, к.б.н., доцент,

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від 05.11.2025 року № 912-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 26.11.2025

3. Вихідні дані до роботи дріжджі *Kluyveromyces marxianus*

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) Вступ; РОЗДІЛ 1. Біотехнологічний потенціал природних штамів *Kluyveromyces marxianus*; РОЗДІЛ 2. Біосинтез практично цінних сполук рекомбінантними штамми дріжджів *Kluyveromyces marxianus*; РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування; РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору стадій технологічного процесу для одержання субстанції вірусоподібних частинок парвовірусу свиней; РОЗДІЛ 5. Опис технологічної схеми виділення і очищення вірусоподібних частинок парвовірусу свиней; РОЗДІЛ 6. Технологічні особливості отримання вакцини проти парвовірусу свиней на основі вірусоподібних частинок; РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва субстанції вірусоподібних частинок парвовірусу свиней; РОЗДІЛ 8. Проект заявки на корисну модель; Висновки.

5. Перелік графічного матеріалу Технологічна схема – 2 аркуші формату А1, апаратурна схема – 3 аркуші формату А1.

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 01 жовтня 2025 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	РОЗДІЛ 1. Біотехнологічний потенціал природних штамів <i>Kluyveromyces marxianus</i>	01.10.2025 – 05.10.2025	
2	РОЗДІЛ 2. Біосинтез практично цінних сполук рекомбінантними штамми дріжджів <i>Kluyveromyces marxianus</i>	05.10.2025 – 10.10.2025	
3	РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування	10.10.2025 – 15.10.2025	
4	РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору стадій технологічного процесу для одержання субстанції вірусоподібних частинок парвовірусу свиней	15.10.2025 – 21.10.2025	
5	РОЗДІЛ 5. Опис технологічної схеми виділення і очищення вірусоподібних частинок парвовірусу свиней	21.10.2025 – 30.10.2025	
6	РОЗДІЛ 6. Технологічні особливості отримання вакцини проти парвовірусу свиней на основі вірусоподібних частинок	30.10.2025 – 08.11.2025	
7	РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва субстанції вірусоподібних частинок парвовірусу свиней	08.11.2025 – 15.11.2025	
8	РОЗДІЛ 8. Проект заявки на корисну модель	15.11.2025 – 19.11.2025	
9	Оформлення технологічних та апаратурних схем	16.10.2025 – 09.11.2025	
10	Оформлення вступу, реферату, висновків та списку літературних джерел	19.11.2025 – 22.11.2025	
11	Оформлення презентації	22.11.2025 – 26.11.2025	

Здобувач _____
(підпис)

Анастасія ОНИЩЕНКО _____
(ім'я та прізвище)

Керівник роботи _____
(підпис)

Оксана СКРОЦЬКА _____
(ім'я та прізвище)

ABSTRACT

The qualification work is devoted to the justification, development and technological elaboration of the process of obtaining a vaccine against porcine parvovirus based on virus-like particles (VLPs) expressed by the yeast *Kluyveromyces marxianus*. The relevance of the study is due to the prevalence of parvovirus infection in livestock and the need for highly effective, safe and standardized vaccine preparations.

The work reviews the biotechnological properties of *K. marxianus*, in particular its ability to metabolize lactose and xylose, thermotolerance, high growth rate and expression of heterologous proteins. It is shown that these characteristics make yeast an effective bioreactor for the synthesis of the structural protein VP2, which self-assembles into VLPs and performs the function of the main antigen.

A complete technological scheme for obtaining VLPs has been formed: centrifugation, washing and destruction of cells, isolation and purification of the whole product. A material balance of the process was carried out and losses were calculated at key stages, which allowed determining the real yield of HPV from the culture fluid. It was established that, taking into account the average concentration of HPV in the culture medium and technological losses, it is possible to obtain about 84 – 85 g of purified virus-like particles from a production batch.

The work consists of an introduction, 8 sections, conclusions and a list of references (148 items in the list and 65 electronic sources in the text). The number of pages is 158. 18 figures and 20 tables are given. The graphic part is presented by 2 sheets of the technological scheme and 3 sheets of the A1 format apparatus scheme.

Keywords: *Kluyveromyces marxianus*, virus-like particles, VLPs, porcine parvovirus, VP2, vaccine, immunogenicity.

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена обґрунтуванню, розробленню та технологічному опрацюванню процесу отримання вакцини проти парвовірусу свиней на основі вірусоподібних частинок (ВПЧ), експресованих дріжджами *Kluveromyces marxianus*. Актуальність дослідження зумовлена поширеністю парвовірусної інфекції у тваринництві та потребою у високоефективних, безпечних і стандартизованих вакцинних препаратах.

У роботі проведено огляд біотехнологічних властивостей *K. marxianus*, зокрема його здатності до метаболізму лактози й ксилози, термотолерантності, високої швидкості росту та експресії гетерологічних білків. Показано, що ці характеристики роблять дріжджі ефективним біореактором для синтезу структурного білка VP2, який самозбирається у ВПЧ та виконує функцію основного антигену.

Сформовано повну технологічну схему одержання ВПЧ: центрифугування, промивання та руйнування клітин, виділення й очищення цільного продукту. Проведено матеріальний баланс процесу та розраховано втрати на ключових стадіях, що дозволило визначити реальний вихід ВПЧ з культуральної рідини. Встановлено, що з урахуванням середньої концентрації ВПЧ у культуральному середовищі та технологічних втрат можливо отримати близько 84 – 85 г очищених вірусоподібних частинок із партії виробництва.

Робота складається зі вступу, 8 розділів, висновків та списку літератури (148 позицій в списку та 65 електронних джерел в тексті). Кількість сторінок – 158. Наведено 18 рисунків та 20 таблиць. Графічна частина представлена 2 листами технологічної схеми та 3 листами апаратурної схеми формату А1.

Ключові слова: *Kluveromyces marxianus*, вірусоподібні частинки, ВПЧ, парвовірус свиней, VP2, вакцина, імуногенність.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	9
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	
РОЗДІЛ 1. БІОТЕХНОЛОГІЧНИЙ ПОТЕНЦІАЛ ПРИРОДНИХ ШТАМІВ <i>KLUYVEROMYCES MARXIANUS</i>	11
1.1. Синтез різних речовин.....	11
1.2. Синтез спиртів.....	15
1.3. Синтез ферментів.....	21
РОЗДІЛ 2. БІОСИНТЕЗ ПРАКТИЧНО ЦІННИХ СПОЛУК РЕКОМБІНАНТНИМИ ШТАМАМИ ДРІЖДЖІВ <i>KLUYVEROMYCES MARXIANUS</i>	28
2.1. Біопластики та біорозкладні матеріали	28
2.2. Біоетанол та біоенергетика.....	29
2.3. Ферменти.....	31
2.4. Вітаміни та антибіотики	33
2.5. Високовартісні хімічні сполуки.....	34
2.6. Вірусоподібні частинки.....	38
ІНЖЕНЕРНА ЧАСТИНА РОБОТИ	
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ.....	44
3.1. Характеристика вірусоподібних частинок парвовірусу свиней.....	44
3.2. Огляд ринку вакцин проти парвовірусу свиней.....	48
3.3. Розрахунок річної потужності виробництва.....	52
РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ СТАДІЙ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ СУБСТАНЦІЇ ВІРУСПОДІБНИХ ЧАСТИНОК ПАРВОВІРУСУ СВИНЕЙ.....	58
4.1. Обґрунтування вибору післяферментаційних процесів отримання субстанції вірусоподібних частинок парвовірусу свиней.....	58
4.1.1. Обґрунтування стадії відокремлення дріжджових клітин від культуральної рідини.....	58
4.1.2. Обґрунтування стадії промивання біомаси дріжджів.....	60

4.1.3. Обґрунтування стадії лізису дріжджових клітин для вивільнення вірусоподібних частинок парвовірусу свиней.....	62
4.1.4. Обґрунтування коригування рН для вивільнення більшої кількості вірусоподібних частинок парвовірусу свиней.....	65
4.1.5. Обґрунтування основної стадії очищення вірусоподібних частинок парвовірусу свиней.....	68
4.1.6. Обґрунтування стадії додаткового очищення вірусоподібних частинок парвовірусу свиней.....	71
4.1.7. Обґрунтування стадії сушіння вірусоподібних частинок парвовірусу свиней.....	76
4.2. Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях.....	78
4.3. Специфікація обладнання.....	86
РОЗДІЛ 5. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИДІЛЕННЯ І ОЧИЩЕННЯ ВІРУСОПОДІБНИХ ЧАСТИНОК ПАРВОВІРУСУ СВИНЕЙ...	92
РОЗДІЛ 6. ТЕХНОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ОТРИМАННЯ ВАКЦИНИ ПРОТИ ПАРВОВІРУСУ СВИНЕЙ НА ОСНОВІ ВІРУСОПОДІБНИХ ЧАСТИНОК.....	100
6.1. Обґрунтування кінцевої форми та упаковки вибору форми випуску вакцини на основі вірусоподібних частинок проти парвовірусу свиней.....	100
6.2. Обґрунтування технологічних особливостей одержання вакцини на основі вірусоподібних частинок проти парвовірусу свиней.....	103
6.3. Матеріальний розрахунок на серію виробництва вакцини на основі вірусоподібних частинок проти парвовірусу свиней.....	107
6.4. Специфікація обладнання.....	108
6.5. Опис технологічного процесу.....	111
РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА СУБСТАНЦІЇ ВІРУСОПОДІБНИХ ЧАСТИНОК ПАРВОВІРУСУ СВИНЕЙ.....	115
7.1. Підбір сучасних методів контролю виробництва вірусоподібних частинок парвовірусу свиней.....	115

7.1.1. Визначення антитіл методом ІФА (ELISA).....	116
7.1.2. Визначення інгібування гемаглютинації (HI).....	117
7.1.3. Проліферативна відповідь лімфоцитів.....	118
7.1.4. Визначення кількості цитокінів.....	119
7.1.5. Оцінка ступеня чистоти вірусоподібних частинок.....	121
7.1.6. Визначення розміру вірусоподібних частинок.....	122
7.1.7. Визначення вологості субстанції вірусоподібних частинок.....	123
7.2. Методи контролю вакцини проти парвовірусу свиней на основі вірусоподібних частинок.....	124
РОЗДІЛ 8. ПРОЄКТ ЗАЯВКИ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ.....	129
8.1. Галузь і застосування корисної моделі.....	129
8.2. Відомі аналоги та їх основні недоліки.....	129
8.3. Постановка задачі корисної моделі та її вирішення.....	132
8.4. Опис запропонованого способу	133
8.5. Формула корисної моделі	136
8.6. Реферат.....	136
ВИСНОВКИ.....	138
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	139

ВСТУП

Бурхливий розвиток біотехнології у XXI столітті сприяє активному впровадженню новітніх підходів у медицині, ветеринарії, фармацевтиці та агропромислового комплексу. Одним із пріоритетних напрямів є створення безпечних та високоефективних вакцин на основі вірусоподібних частинок (ВПЧ), які імітують природну структуру вірусів, але не містять їхнього генетичного матеріалу. Це забезпечує високу імуногенність та унеможлиблює інфікування організму. Вірусоподібні частинки вже зарекомендували себе як надійна платформа для створення вакцин проти гепатиту В, ВПЛ, SARS-CoV-2 та низки інших патогенів (Chattopadhyay, Jailani, & Mandal, 2023).

Серед значущих інфекційних агентів у тваринництві особливу небезпеку становить парвовірус свиней (Porcine Parvovirus, PPV), який спричиняє синдром репродуктивних порушень у свиней – ембріональну смертність, резорбцію плодів, муміфікацію та безпліддя. У зв'язку з цим, актуальним завданням сучасної ветеринарної біотехнології є створення ефективних засобів профілактики цього захворювання, зокрема вакцин нового покоління на основі ВПЧ VP2 – основного структурного білка капсиду парвовірусу (Donneschi et al, 2024).

Для біосинтезу ВПЧ застосовують різні експресійні системи, серед яких останнім часом все більше уваги приділяється нетрадиційним дріжджовим хостам. Особливе місце серед них посідає *Kluyveromyces marxianus* – термотолерантний, метаболічно пластичний і швидкорослий вид, який не лише витримує високі температури (до 45 – 52°C), але й здатен продукувати рекомбінантні білки з меншою енергетичною витратою на охолодження біореакторів. Завдяки GRAS-статусу, *K. marxianus* є безпечним для застосування у харчовій, фармацевтичній та ветеринарній галузях. Його потенціал як експресійного хоста для одержання складних білкових структур, зокрема ВПЧ,

					<i>НУХТ БТЕК 02.01.12 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Онищенко А.А.</i>			<i>ВСТУП</i>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Перевір.</i>		<i>Скроцька О.І.</i>					9	158
<i>Реценз.</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						

нині інтенсивно досліджується (Cernak et al, 2018).

Окрім експресії, важливими етапами є очищення та характеристика отриманих вірусоподібних частинок. Застосування сучасних методів – центрифугування, фільтрації, хроматографії, а також електронної мікроскопії – дає змогу ефективно контролювати якість біопродукту та визначати його фізико-хімічні й структурні характеристики (Yang et al, 2021).

Дана курсова робота присвячена аналізу можливостей використання термотолерантних дріжджів *Kluyveromyces marxianus* у біотехнологічному процесі одержання вірусоподібних частинок парвовірусу свиней, що є актуальним напрямом у розвитку біобезпечних вакцинних препаратів для потреб ветеринарної медицини. У межах цього проєкту розглядаються методи очищення ВПЧ парвовірусу свиней, а також сучасні методики контролю готової субстанції (Yang et al, 2021).

Новизною роботи є виробництво новітніх безпечних та ефективних вакцин проти парвовірусної інфекції свиней на основі вірусоподібних частинок, синтезованих рекомбінантними дріжджами *Kluyveromyces marxianus*, що будуть використовуватись для вакцинопрофілактики свиноматок, як найбільш ураженої групи виду.

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

РОЗДІЛ 1

БІОТЕХНОЛОГІЧНИЙ ПОТЕНЦІАЛ ПРИРОДНИХ ШТАМІВ

KLUYVEROMYCES MARXIANUS

1.1. Синтезу різних речовин

Природні штами *K. marxianus* є одними з найбільш універсальних і перспективних мікроорганізмів для використання у біотехнологіях. Їхній потенціал зумовлений унікальними фізіологічними, метаболічними та генетичними особливостями, які забезпечують ефективну реалізацію багатьох промислових процесів (Varela, Gethins, Stanton, Ross, & Morrissey, 2017).

K. marxianus є унікальними мікроорганізмами завдяки своїй здатності адаптуватися до різноманітних умов та використовувати широкий спектр субстратів для росту і метаболізму. Ця властивість визначає їхній біотехнологічний потенціал у різних галузях, від харчової промисловості до виробництва біопалива та біохімічних речовин (Baptista, & Domingues, 2022).

Природні штами *K. marxianus* здатні ефективно ферментувати такі поширені цукри (Nitiyon et al., 2016):

Глюкоза – основний субстрат у багатьох біотехнологічних процесах. Завдяки швидкому метаболізму, дріжджі забезпечують високу швидкість росту та продукції.

Фруктоза – використовується в процесах синтезу органічних кислот і поліолів.

Сахароза – розщеплюється до глюкози і фруктози за допомогою інвертази, яку продукують ці дріжджі, що дозволяє їх застосовувати у ферментації цукровмісної сировини, наприклад, тростинного або бурякового соку.

					НУХТ БТЕК 02.01.12 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Онищенко А.А.				РОЗДІЛ 1 БІОТЕХНОЛОГІЧНИЙ ПОТЕНЦІАЛ ПРИРОДНИХ ШТАМІВ <i>KLUYVEROMYCES</i> <i>MARXIANUS</i>	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.	Скороцька О.І.						11	158
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							

Однією з унікальних особливостей *K. marxianus* є їхня здатність ферментувати лактозу, яка є складним дисахаридом, що зустрічається у молочній сироватці. Ця здатність забезпечується ферментом бета-галактозидазою (лактазою), що дозволяє: утилізувати молочну сироватку – побічний продукт молочної промисловості, часто важкий для утилізації; виробляти біоетанол, органічні кислоти (наприклад, молочну кислоту), поліоли (наприклад, манітол) або біогаз; створювати безлактозні продукти для харчової промисловості, зокрема для людей з непереносимістю лактози (Park, Kim, Jang, Hong, & Ha, 2015).

Процес катаболізму лактози включає декілька ключових етапів (Saini, Beniwal, Kokkiligadda, & Vij, 2017):

1. Транспорт лактози в клітину. *K. marxianus* використовує специфічний білок-переносник (лактазний транспортер), який забезпечує перенесення лактози через клітинну мембрану. Цей процес залежить від градієнта протонів і енергії, що утворюється за рахунок роботи АТФази.

2. Гідроліз лактози. Після потрапляння в клітину лактоза розщеплюється на два мономерні – глюкозу та галактозу – за допомогою ферменту β-галактозидази (лактази). β-галактозидаза є одним із найважливіших ферментів *K. marxianus*, оскільки саме він дозволяє цим дріжджам утилізувати лактозу з таких джерел, як молочна сироватка та пермеат.

Хімічна реакція:



3. Метаболізм глюкози. Глюкоза, утворена в результаті гідролізу лактози, надходить у гліколіз, де вона окислюється до пірувату. Основні етапи гліколізу передбачають фосфорилування глюкози з утворенням глюкозо-6-фосфату, потім перетворення глюкозо-6-фосфату на фруктозо-6-фосфат та окислення до триозофосфатів, які надалі перетворюються на піруват. Піруват може бути перетворений у різні кінцеві продукти залежно від метаболічних умов: анаеробні умови передбачають утворення етанолу та CO₂; аеробні умови – повне окислення до CO₂ та води в циклі Кребса.

Галактоза, отримана при розщепленні лактози, включається в метаболічний шлях через *Leloir*. Даний шлях забезпечує повне використання галактози, тим самим підвищує енергоефективність катаболізму лактози (Saini, Beniwal, Kokkiligadda, & Vij, 2017).

Метаболізм лактози у *K. marxianus* залежить від концентрації субстрату, енергетичних потреб клітини та умов культивування. Аеробні умови сприяють зростанню біомаси та підвищенню продукції метаболітів, таких як органічні кислоти. Анаеробні умови стимулюють утворення етанолу як кінцевого продукту. Термотолерантність цих дріжджів дозволяє ефективно метаболізувати лактозу за високих температур, що знижує ризик контамінації (Karim, Gerliani, & Aider, 2020).

На рис.1.1 показано катаболізм лактози за допомогою дріжджів *K. marxianus*

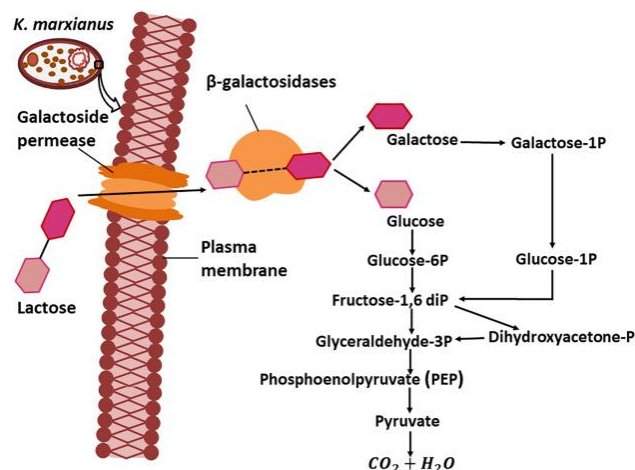


Рис.1.1. Катаболізм лактози дріжджами *K. marxianus* (Karim, Gerliani, & Aider, 2020)

K. marxianus має здатність ферментувати ксилозу – ключовий компонент лігноцелюлозних матеріалів (наприклад, відходів сільського господарства та лісової промисловості). Це розширює можливості їх застосування у таких напрямках (Baptista, Cunha, & Domingues, 2021; Nitiyon et al., 2016):

- Виробництво біоетанолу з недорогих і доступних лігноцелюлозних відходів (Amaya-Delgado et al., 2018).

- Синтез органічних кислот, наприклад, янтарної кислоти – для штаму-продуценту *K. marxianus* NBRC 1777 концентрація становить близько 10 г/л (Sakihama, Hidese, Hasunuma, & Kondo, 2019), а концентрація молочної кислоти при ко-культивуванні *L. paracasei* H4-11 та *K. marxianus* L1-1 становила $22,08 \pm 2,42$ г/кг субстрату (Liu, Qin, & Miao, 2021) для харчової, косметичної та фармацевтичної галузей.

- Утилізація відходів агропромислового комплексу, таких як кукурудзяні стебла, солома, тростинний жом та отримання продуктів з високою доданою вартістю (Ray, Mukherjee, & Ghosh, 2023).

На рис.1.2. продемонстровано узагальнену катаболітичну схему перетворення вищезгаданих субстратів.

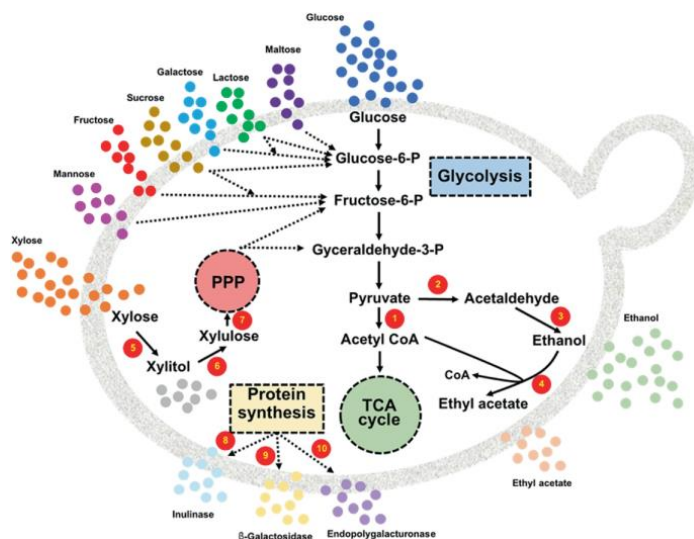


Рис.1.2. Узагальнена схема катаболізму різноманітних субстратів за допомогою дріжджів *K. marxianus* (Lertwattanasakul et al., 2022)

Гліцерин є побічним продуктом біодизельної промисловості і *K. marxianus* здатні ефективно його утилізувати (Zhang et al., 2020a), перетворюючи на такі цінні продукти:

Поліюли (наприклад, еритритол або сорбіт), які використовуються як підсолоджувачі у харчовій промисловості (Do, Theron, & Fickers, 2019).

Біоетанол для використання як екологічно чистого палива (наприклад, штам *K. marxianus* NBRC1777 здатен синтезувати 23,53 г/л етанолу, *K. marxianus*

DMB1 – 23,74 г/л, у той час як *S. cerevisiae* BY4743 – 24,09 г/л на середовищі з екстракту листя евкаліпту) (Goshima et al., 2013).

Ліпіди для створення біополімерів або біопластику (Estrela Curado, 2019).

Дріжджі *K. marxianus* здатні виробляти ароматичні сполуки під час ферментації. Це забезпечує їхнє застосування у харчовій промисловості для виробництва ферментованих напоїв, йогуртів або ароматичних добавок. Серед найбільш поширених продуктів 2-фенілетанол – натуральний аромат з квітковим запахом, який використовується в парфумерії та харчовій промисловості, та ефіри – для створення фруктових ароматів. Наприклад, штам *K. marxianus* CBS 600 здатен синтезувати до 1,4 г/л 2-фенілетанолу (Perpetuini, Rossetti, Rapagnetta, & Tofalo, 2024; Gao, & Daugulis, 2009).

1.2. Синтез спиртів

Унікальні фенотипові властивості природних штамів *K. marxianus* дозволяють використовувати їх для отримання високоцінних продуктів у різних галузях промисловості, зокрема для виробництва етанолу, багатоатомних спиртів і ароматичних сполук (Morrissey, Etschmann, Schrader, & de Billerbeck, 2015).

Одним із найбільш вивчених напрямків застосування *K. marxianus* є отримання етанолу. У порівнянні з класичними видами дріжджів, такими як *Saccharomyces cerevisiae*, *K. marxianus* має низку переваг. По-перше, ці дріжджі можуть ефективно ферментувати не тільки глюкозу, але й інші цукри, включаючи галактозу, фруктозу та навіть лактозу. Така здатність робить їх особливо привабливими для переробки побічних продуктів молочної промисловості, таких як сироватка, що містить велику кількість лактози. У процесі спиртового бродіння лактоза гідролізується за допомогою ферментів пермеази та β -галактозидази до моносахаридів, які потім включаються у метаболічні шляхи, що призводять до утворення етанолу. Варто зазначити, що *S. cerevisiae* не здатні катаболізувати лактозу через відсутність вищезазначеного ферментного комплексу (Moreno, Ibarra, Ballesteros, González, & Ballesteros, 2013).

Молочна промисловість спричиняє значне утворення побічних продуктів, головним чином сирної сироватки, яка є екологічно небезпечним органічним стоком через високу ХПК і БПК. Основну частину забруднень складають лактоза, жир і білки. Через відсутність сталих практик утилізації сироватка часто викидається як стічні води, що призводить до забруднення навколишнього середовища та втрати цінних поживних речовин і енергії. Для пом'якшення екологічного впливу та ефективного використання ресурсів, важливо спрямувати управління сироваткою на виробництво цінних продуктів. Тому розробка технологій біоремедіації даних відходів *K. marxianus* для великомасштабного виробництва спиртів є актуальною та перспективною концепцією, яка допоможе вирішити ряд проблем (Zandona, Blažić, & Režek Jambrak, 2021).

Окрім цього, *K. marxianus* може функціонувати за підвищених температур, до 45 – 50 °С, що сприяє зниженню ризику контамінації бактеріями під час ферментації. Така термотолерантність робить процес економічно вигіднішим, оскільки зменшується потреба в охолодженні. Отриманий етанол знаходить широке застосування як біопаливо, у виробництві алкогольних напоїв, фармацевтичній та косметичній промисловості (Castro, & Roberto, 2014).

У табл.1.1 вказана синтезувальна здатність деяких штамів *S. cerevisiae* та *K. marxianus* щодо етанолу.

**Порівняння біосинтезу етанолу різними штамами дріжджів
Kluveromyces marxianus та *Saccharomyces cerevisiae***

Штам	Концентрація, г/л	Джерело
Дріжджі <i>Kluveromyces marxianus</i>		
KHM89	10,59	Kwon, & Ha, 2022 Li et al., 2023
17694-DH1	13,4	Kwon Park, Hong, & Ha, 2019
SLP1	18,2	Flores-Cosio, Arellano-Plaza, Gschaedler, & Amaya-Delgado, 2018
CCEBI 2011	40	Serrat, Bermúdez, & Villa, 2004
DMKU3-1042	42,5	Li et al., 2023
Дріжджі <i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
INVSc1	0,3	Rasool, Ahmed, & Li, 2016
BY318	9	Funahashi et al., 2015
BY4741	9,2	Yatabe, Seike, Okahashi, Ishii, & Matsuda, 2023
ERD	17,6	Flores-Cosio, Arellano-Plaza, Gschaedler, & Amaya-Delgado, 2018
KL17	95	Kim et al., 2014

Іншим важливим продуктом метаболізму *K. marxianus* є гліцерин (гліцерол), який утворюється як побічний продукт під час анаеробного росту дріжджів. Гліцерин є цінною речовиною, що використовується у виробництві косметики, фармацевтичних препаратів та харчових продуктів. Утворення гліцерину відбувається як відповідь на осмотичний стрес або дисбаланс редокс-рівноваги. Ці дріжджі також здатні перетворювати залишковий гліцерин, що утворюється в процесі виробництва біодизеля, на цінні сполуки, що додатково підвищує їхню екологічну цінність (Zhang et al., 2020b).

Ще одним цікавим напрямком є виробництво ароматичних спиртів. Наприклад, 2-фенілетанол, який має характерний квітковий аромат, є цінним компонентом у парфумерії та харчовій промисловості. Цей спирт синтезується *K. marxianus* із амінокислотного попередника – L-фенілаланіну. Його виробництво за допомогою дріжджів вважається перспективною альтернативою хімічному синтезу завдяки екологічній безпечності та натуральному

походженню продукту (Perpetuini, Rossetti, Rapagnetta, & Tofalo, 2024; Gao, & Daugulis, 2009).

Найбільше сучасні дослідження спрямовані саме на біосинтез етанолу та 2-фенілетанолу, тому в табл.1.2 продемонстровані природні штами, що здатні синтезувати саме ці 2 спирти.

Таблиця 1.2

Біосинтез спиртів штамами *Kluuveromyces marxianus*

Штам	Склад поживного середовища, г/л	Параметри біосинтезу	Концентрація спирту, г/л	Джерело
Етанол				
CBS 6556	Лігноцелюлозний гідролізат, що містить 180 г/л глюканів, доповнений тетрацикліном – 0,04 г/л	43°C, 48 годин, 130 об/хв, рН 4,8	22,5	Sengupta et al., 2022
ССТ 7735	Біомаса слонової трави – 160 Дріжджовий екстракт – 2,5 Пептон – 2,5 NH ₄ Cl – 2 KH ₂ PO ₄ – 1 MgSO ₄ ×7H ₂ O – 0,3	38°C, 48 годин	45,5	Campos et al., 2019
KMR 1042	Глюкоза – 160 Пептон – 20 Екстракт дріжджів – 10	45°C, 24 години, 160 об/хв, рН 5,8	51,3 ± 3,4	Lertwattanasakul et al., 2023
KMR 118			52,3 ± 2,5	
SS 106	Попередньо оброблений сирий крохмаль маніоки – 200 Меляса цукрової тростини – 100 (NH ₄) ₂ HPO ₄ – 0,2 KH ₂ PO ₄ – 1,5 Na ₂ HPO ₄ – 1,8 MgSO ₄ ·7H ₂ O – 3,8	40°C, 72 години, 300 об/хв, рН 4,0	61,72	Malairuang, Krajang, Rotsattarat, & Chamsart, 2020

ITD 00262	Лактоза – 200 Пептон – 20 Екстракт дріжджів – 10	30°C, 96 годин, 180 об/хв, рН 4,8	23,71	Conde-Báez, Pineda-Muñoz, Conde-Mejía, Mas-Hernández, & López-Molina, 2024
MTCC 1389		37°C, 46 годин, 200 об/хв	110,51 ± 0,87	Pal, & Vij, 2022
URM 7404	Лактоза з молочної сироватки – 65 Екстракт дріжджів – 1 (NH ₄) ₂ SO ₄ – 0,1 KH ₂ PO ₄ – 0,1 MgSO ₄ – 0,1 CaCl ₂ – 0,2	35°C, 12 годин, 150 об/хв, рН 5,3	28,00 ± 0,11	Murari, Machado, Schuina, & Del Bianchi, 2019
EXF-5288	Лактоза з молочної сироватки – 100 Сечовина – 2,2 KH ₂ PO ₄ – 7 Na ₂ HPO ₄ – 2,50 MgSO ₄ ·7H ₂ O – 1,50 FeCl ₃ ·6H ₂ O – 0,15 CaCl ₂ ·2H ₂ O – 0,15 ZnSO ₄ ·7H ₂ O – 0,02 MnSO ₄ ·H ₂ O – 0,06	35°C, 72 години, 180 об/хв, рН 3,5	35,5 ± 0,2	Koukoumaki, Papanikolaou, Ioannou, Mourtzinis, & Sarris, 2024
ATCC 46537	Лактоза (з пермеату сироватки) – 100 Екстракт дріжджів – 6,26 (NH ₄) ₂ SO ₄ – 6,26	30°C, 24 години, 120 об/хв	50,04	Sousa, Gonçalves, & Falleiros, 2018
HM 36338	Лактоза з молочної сироватки – 141,4 Екстракт дріжджів – 59,67 (NH ₄) ₃ SO ₄ – 3	37°C, 96 годин, 500 об/хв, рН 4,5	59	Dhanker, Chaudhary, Tomar, & Goyal, 2019
WUT 240	Сухий пермеат молочної сироватки – 200	30°C, 96 годин, 240 об/хв	75	Drężek et al., 2023

2-Фенілетанол				
ССТ 7735	Глюкоза – 20 Дріжджова азотна основа без амінокислот – 6,7 MnCl ₂ – 2,52 Урацил – 0,56	30°C, 72 годин, рН 5,0	0,247	de Lima et al., 2021
DSM 5422	Глюкоза – 20 Сечовина – 17 KH ₂ PO ₄ – 20 CaCl ₂ – 0,1 NaCl – 0,1 MgSO ₄ ·7H ₂ O – 0,5 Біотин – 0,002 мг Кальцію пантотенат – 0,4 мг Фолієва кислота – 0,002 мг Інозит – 2 мг Ніацин – 0,4 мг п-Амінобензойна кислота – 0,2 мг Піридоксину гідрохлорид – 0,4 мг Рибофлавін – 0,2 мг Тіамін-НСl – 0,4 мг H ₃ BO ₃ – 0,5 мг CuSO ₄ ·5H ₂ O – 0,04 мг KI – 0,1 мг FeCl ₃ ·6H ₂ O – 0,2 мг MnSO ₄ ·H ₂ O – 0,4 мг Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O – 0,2 мг ZnSO ₄ ·7H ₂ O – 0,4 мг	30°C, 50 годин, рН 5,5	0,372	Dubencovs et al., 2021
CBS 6556	Глюкоза – 20 Дріжджова азотна основа без амінокислот – 6,7 Гідролізована біомаса <i>Piromyces indianae</i> – 10 CSM-порошок – 0,79	30°C, 24 години, 250 об/хв	0,55	Hillman et al., 2021
WUT240	Молочна сироватка – 200	30°C, 96 годин, 240 об/хв	1,8	Dreżek et al., 2023

Тож, з табл.1.2 можна зробити висновок про можливість застосування штамів *K. marxianus* в промисловому одержанні різноманітних спиртів, в першу чергу саме етанолу.

1.3. Синтез ферментів

Як зазначалося раніше, однією з основних ферментних систем, яку здатні синтезувати *K. marxianus*, є лактаза, фермент, що розщеплює лактозу до глюкози та галактози. Це важливий фермент для промислового застосування в молочній та харчовій промисловості, оскільки лактоза є основним компонентом молочних продуктів. Природні штами *K. marxianus* мають здатність ефективно виробляти лактазу, що дає можливість переробляти молочну сироватку і виробляти лактозівільні продукти. Висока продуктивність лактази також робить цей штам привабливим для біообробки молока, покращуючи переварюваність молочних продуктів у людей з непереносимістю лактози (Ren et al., 2017).

Процес синтезу лактази включає виробництво ферменту, що секретується в навколишнє середовище, де він каталітично розщеплює молекули лактози. Лактоза розщеплюється на два моносахариди – глюкозу та галактозу, які потім можуть бути використані для подальшого бродіння або переробки. Природні штами *K. marxianus* здатні до високоінтенсивного виробництва лактази навіть в умовах малої концентрації лактози, що робить цей процес економічно вигідним (Nettinga, 2019).

K. marxianus також має здатність синтезувати амілазу (наприклад, штам IF0 0288) – фермент, який розщеплює крохмаль і інші полісахариди до простих цукрів, таких як глюкоза. Амілолітичні ферменти цього виду можуть бути використані для виробництва етанолу з крохмалистих субстратів, таких як кукурудза, картопля або рис, що робить *K. marxianus* важливим інструментом для біоетанольної промисловості (Stergiou, Foukis, Theodorou, Papagianni, & Paramichael, 2014; Wang, Wang, Gao, & Hong, 2014).

Амілаза, яку синтезують дріжджі, може працювати за різних температур (від 30 °C до 50 °C), що дає можливість ефективно використовувати цей фермент у промислових процесах, де потрібно підвищити швидкість переробки

крохмалю. Крім того, високотемпературна стабільність амілази *K. marxianus* дає можливість здійснювати процеси бродіння при підвищених температурах, знижуючи ризик контамінації та підвищуючи економічність виробництва (Wang, Wang, Gao, & Hong, 2014).

Протеази – це ферменти, які каталітично розщеплюють білки до амінокислот. Штам *K. marxianus* IFO 0288 також синтезує різноманітні протеази, які мають важливе значення в промисловому виробництві пептидів та амінокислот. Вони використовуються для виробництва ферментованих кормів, зниження в'язкості в харчових продуктах, а також у процесах біодеградації. Протеази можуть бути корисними в біотехнологіях для отримання білкових добавок або спеціальних амінокислот, які знаходять застосування у фармацевтичній та косметичній промисловості (Foukis, Stergiou, Theodorou, Paragianni, & Paramichael, 2012).

Особливістю синтезу протеаз у *K. marxianus* є їх висока активність за різних значень рН і температури, що дозволяє використовувати ці ферменти в широкому спектрі умов. Вони є важливими для розщеплення білків і перетворення їх на більш прості молекули, які можуть бути далі використані в синтезі біопродуктів або кормових добавок (Foukis, Stergiou, Theodorou, Paragianni, & Paramichael, 2012).

Ще одним класом ферментів, який активно синтезують природні штами *K. marxianus* (наприклад, штам СЕСТ 10875), є целюлази – ферменти, що здатні розщеплювати целюлозу, складний полімер, що міститься в рослинних клітинах. Ці ферменти використовуються для біопереробки відходів агропромисловості та виробництва біоетанолу з лігноцелюлозних матеріалів, таких як солома, тростина або деревина (Tomás-Rejón, García-Aparicio, Negro, Oliva, & Ballesteros, 2009).

Синтез целюлаз *K. marxianus* дозволяє дріжджам ефективно використовувати лігноцелюлозні відходи як джерело вуглецю, що робить ці штами перспективними для біотехнологій, спрямованих на утилізацію біомаси і виробництво відновлювальних джерел енергії, зокрема біоетанолу (штами, що

здатні до синтезу етанолу на зазначених відходах: DMB1, NBRC1777, CBS6556) (Goshima et al., 2013; Tomás-Pejó, García-Aparicio, Negro, Oliva, & Ballesteros, 2009; Baptista, Cunha, & Domingues, 2021).

K. marxianus також здатні синтезувати ксиланази та інші геміцелюлазні ферменти, які розщеплюють ксилан, основний компонент лігноцелюлози (як наведено на рис.1.3.). Більшість штамів *K. marxianus* містять гени, що синтезують β-ксиланази (наприклад, *Xyn-CDBFV*), β-ксилозидази (наприклад, *RuXynI*) та інші геміцелюлолітичні ферменти (наприклад, сюди часто відносять β-манназу, що кодується геном *M330*). Ці ферменти сприяють розщепленню геміцелюлози, що міститься в рослинних відходах, і дозволяють покращити процеси ферментації за допомогою ксилози, що може бути використана для виробництва біоетанолу або інших біопродуктів. Завдяки здатності виробляти такі ферменти, *K. marxianus* можна використовувати для здійснення процесів біоконверсії в умовах безвідходного виробництва (Lan et al., 2021).

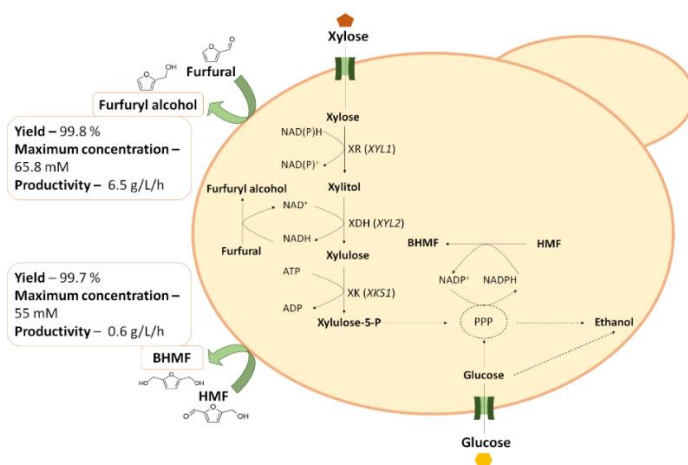


Рис.1.3. Схема біотрансформації ксилози (основного компоненту лігноцелюлозної маси) до глюкози та етанолу за допомогою *K. marxianus* (Baptista, Cunha, & Domingues, 2021)

Глюкозооксидаза – фермент, що окислює глюкозу до глюконової кислоти з виділенням перекису водню, також може синтезуватися штамом *K. marxianus* CBS712. Цей фермент має застосування в харчовій та фармацевтичній промисловості для консервування продуктів, а також у діагностичних тестах для

визначення концентрації глюкози в біологічних зразках (Signori, Passolunghi, Ruohonen, Porro, & Branduardi, 2014).

У табл.1.3 продемонстровані штами *K. marxianus*, що здатні до синтезу відповідних ферментів.

Таблиця 1.3

Здатність штамів *Kluveromyces marxianus* до біосинтезу ферментів

Штам	Склад поживного середовища, г/л	Параметри біосинтезу	Активність ферменту, Од/мл	Джерело
β-галактозидаза (лактаза)				
CGMCC 13907	Соєва окара – 30 Глюкоза – 20 Порошок яловичини – 8 Пептон – 10 Екстракт дріжджів – 4 K ₂ HPO ₄ – 2 (NH ₄) ₂ C ₆ H ₆ O ₇ – 2 CH ₃ COONa – 5 MgSO ₄ – 0,2 MnSO ₄ – 0,04 Tween 80 – 10	35°C, 15 годин, 150 об/хв, pH 5,0	71,4	Su et al., 2021
SY13	Целобіоза – 30 Екстракт дріжджів – 5 Дріжджова азотна основа без амінокислот – 1,7 (NH ₄) ₂ SO ₄ – 0,8	40°C, 24 години, 160 об/хв	120	Murata, Pattanakittivorakul, Manabe, Limtong, & Yamada, 2022
SLDY-005	Лактоза – 30 Екстракт дріжджів – 1 K ₂ HPO ₄ – 2 NH ₄ H ₂ PO ₄ – 1 (NH ₄) ₂ HPO ₄ – 1 MgSO ₄ ·7H ₂ O – 0,1	30°C, 36 годин, pH 5,5	277	Afolabi, Adewale, & Adeyemo, 2022
DIYS11	Пептон – 10 Екстракт дріжджів – 5 Хлорамфенікол – 0,1	40°C, 64 години, 250 об/хв, pH 3,0	4997	Al-Jazairi, Abou-Ghorra, Bakri, & Mustafa, 2015

Інуліназа				
NRRL Y-50799	Глюкоза – 20 Дріжджовий екстракт – 20 Пептон – 10	30°C, 96 годин, 100 об/хв	3,7	Galindo-Leva et al., 2016
ISO3	Агавін – 0,5 Екстракт дріжджів – 0,2 (NH ₄) ₂ SO ₄ – 0,1 KH ₂ PO ₄ – 0,1 KCl – 0,05	30°C, 15 годин, 150 об/хв, pH 5,0	17,5	Trapala, Bustos- Jaimes, Manzanares, Bárzana, & Montiel, 2020
KM Y179	Інулін – 114 Пептон – 20 Дріжджовий екстракт – 10	30°C, 36 годин, 150 об/хв	25,6	Gao et al., 2015
NRRL Y-7571	Яконове борошно – 70 Кукурудзяний екстракт – 20 KH ₂ PO ₄ – 15 NH ₄ Cl – 1,5 KCl – 1,2 MgSO ₄ ·7H ₂ O – 0,7	37°C, 24 годин, 150 об/хв	36,1	de Amorin Sathler, Contiero, & Cazetta, 2015
	Сироп агави – 50 Дріжджовий екстракт – 25 Пептон – 10,0 NH ₄ Cl – 1,5 MgSO ₄ – 0,7 KH ₂ PO ₄ – 5,0 KCl – 1,2	28°C, 96 годин, 150 об/хв	129,21	de Oliveira, de Oliveira, Contiero, & Cazetta, 2016
Ліпаза				
IFO 0288	Глюкоза – 20 Оливкова олія – 5 Пептон – 5 Екстракт дріжджів – 3 Екстракт солоду – 3	35°C, 65 годин, 150 об/хв, pH 6,5	0,168	Stergiou et al., 2012
L-2029	Глюкоза – 20 Олія авокадо – 35 Дріжджовий екстракт – 10 Пептон – 10	30°C, 12 годин, 200 об/хв	4,69	Martínez-Corona, Banderas- Martínez, Pérez- Castillo, Cortés- Penagos, & González- Hernández, 2019

β-фруктозидаза				
SLP1	Глюкоза – 20 КН ₂ РО ₄ – 3 (NH ₂) ₂ SO ₄ – 3 Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O – 1,5 Глутамат – 1 MgCl ₂ ·6H ₂ O – 0,4122 ZnCl ₂ – 0,0192 CaCl ₂ – 0,0174 FeCl ₂ ·4H ₂ O – 0,0117 MnCl ₂ ·4H ₂ O – 0,0044 CuCl ₂ ·2H ₂ O – 0,0006 CoCl ₂ ·6H ₂ O – 0,0005 (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O – 0,0004 Н ₃ ВО ₃ – 0,003 Вітамінний розчин (5 г/л) : Біотин – 0,000012 Тіамін НСІ – 0,005 Піридоксин – 0,005 Пантотенова кислота – 0,005 Нікотинова кислота – 0,005 Міоїнозит – 0,125 4-амінобензоєва кислота – 0,001	34°C, 24 години, рН 4,5	1,4	Barbosa-Hernández et al., 2023

Тож, з табл.1.3 можна зробити висновок, що сучасні дослідження щодо синтезувальної здатності *K. marxianus* по ферментам орієнтується на інулінази, галактозидази, фруктофуранозидази та ліпази.

Отже, підсумуємо, що природні штами *K. marxianus* є високопродуктивними і багатофункціональними організмами з величезним біотехнологічним потенціалом, який дозволяє використовувати їх у різних сферах, від харчової промисловості до медичних і фармацевтичних додатків. На основі численних досліджень та практичних застосувань можна зробити кілька ключових висновків щодо цих дріжджів.

K. marxianus демонструє високий рівень метаболічної гнучкості, здатний ефективно використовувати широкий спектр вуглеводів, таких як лактоза,

глюкоза, галактоза та інші моносахариди. Це дозволяє застосовувати їх у процесах ферментації, де потрібно переробляти різні види сировини, зокрема в агропромислових і харчових виробництвах, де важливі швидка адаптація до зміни джерела вуглецю та висока продуктивність. *K. marxianus* відомий своєю здатністю виробляти численні біопродукти, такі як етанол, органічні кислоти, ферменти, що робить цей штам надзвичайно важливим для біотехнологічних процесів. Його здатність виробляти ферменти, зокрема лактозу та інші ензими, має великі перспективи для створення функціональних харчових продуктів і терапевтичних препаратів.

Завдяки своїй здатності до швидкого росту при високих температурах, а також стабільності в умовах варіативних середовищ, *K. marxianus* може бути використаний для виробництва у великих промислових масштабах. Це дозволяє знизити витрати на виробництво і забезпечити високу ефективність процесів біопереробки і біосинтезу.

Використання природних штамів *K. marxianus* також вигідне з екологічної точки зору, оскільки вони є безпечними для навколишнього середовища і не створюють ризику патогенності при правильно організованому виробництві. Вони можуть бути застосовані в процесах біоінженерії для отримання біопродуктів, що не викликають небажаних екологічних наслідків.

РОЗДІЛ 2
БІОСИНТЕЗ ПРАКТИЧНО ЦІННИХ СПОЛУК
РЕКОМБІНАНТНИМИ ШТАМАМИ ДРІЖДЖІВ
KLUYVEROMYCES MARXIANUS

2.1. Біопластики та біорозкладні полімери

Біопластмаси та біорозкладні полімери представляють собою важливу категорію матеріалів, які можуть замінити традиційні нафтові пластмаси, зменшуючи негативний вплив на навколишнє середовище. Це стає можливим завдяки використанню біологічних матеріалів, отриманих з відновлювальних ресурсів, таких як рослинні біомаси або мікроорганізми, а також завдяки здатності цих матеріалів розкладатися в природних умовах без шкідливого впливу на екосистеми. Рекombінантні штами *K. marxianus* демонструють помітний інноваційний потенціал у виробництві таких матеріалів завдяки своїй метаболічній універсальності, здатності до синтезу вуглеводнів, полімерів та інших біохімічних сполук (Islam et al., 2024).

Біопластмаси – це пластмаси, які виробляються або з рослинних джерел, або за допомогою біотехнологічних процесів, зокрема за участю мікроорганізмів. Одним з таких матеріалів є полілактидна кислота (PLA), яка є одним з найбільш поширених біопластиків, отриманих з перероблених рослинних матеріалів, зокрема кукурудзяного крохмалю або цукрових буряків. Проте, сучасні біотехнології дозволяють створювати біопластмаси і за допомогою мікроорганізмів, зокрема шляхом метаболічної інженерії рекombінантних штамів дріжджів, таких як *K. marxianus*, що можуть синтезувати молочну кислоту (Islam et al., 2024).

Полі-3-гідроксибутират (PHB) – це біорозкладний полімер, що отримується з бактерій та дріжджів, зокрема *K. marxianus*. Вони здатні синтезувати PHB в результаті ферментаційних процесів при використанні

					НУХТ БТЕК 02.01.12 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докum.	Підпис	Дата			
Розроб.	Онищенко А.А.				РОЗДІЛ 2 БІОСИНТЕЗ ПРАКТИЧНО ЦІННИХ СПОЛУК РЕКОМБІНАНТНИМИ ШТАМАМИ ДРІЖДЖІВ <i>KLUYVEROMYCES MARXIANUS</i>		
Перевір.	Скроцька О.І.						
Реценз.							
Н. Контр.							
Затверд.	Стабніков В.П.						
					Літ.	Арк.	Аркушів
						28	158
					Кафедра БТМ		

вуглеводів як джерела вуглецю. *K. marxianus* проявляє здатність до накопичення PHB в умовах обмеженого постачання азоту або інших мінералів, що робить його перспективним для комерційного виробництва цього полімеру. PHB може бути використаний для виготовлення різноманітних біорозкладних виробів, таких як упаковка, фармацевтичні контейнери, медичні шви та інші біорозкладні матеріали (Philip, Sengupta, Keshavarz, & Roy, 2009).

Як і PHB, PLA є популярним біорозкладним полімером, що може бути виготовлений за допомогою рекомбінантних штамів *K. marxianus*. Виробництво PLA з дріжджів є більш економічно вигідним, оскільки *K. marxianus* може використовувати широкий спектр субстратів, таких як лактоза, що робить цей процес доступнішим для великих масштабів виробництва (Islam et al., 2024; Lee et al., 2017).

Рекомбінантні штами *K. marxianus* можуть бути використані для синтезу поліуретанів на основі біологічно розкладних компонентів, таких як жири, олії або лактоза. Ці полімери застосовуються для виготовлення екологічно чистих упаковальних матеріалів, ізоляційних матеріалів, а також у фармацевтичних і косметичних продуктах (López-Pérez, & Viniegra-González, 2016).

2.2. Біоетанол та біоенергетика

Рекомбінантні штами дріжджів *K. marxianus*, як і природні продуценти, є одним із найбільш перспективних мікроорганізмів для виробництва біопалива завдяки їхнім унікальним метаболічним властивостям. Висока швидкість росту, здатність до ферментації різноманітних субстратів, включаючи відходи харчової промисловості, та термотолерантність роблять їх ключовими у розробці стійких біоенергетичних технологій.

Один із найважливіших напрямів використання *K. marxianus* у біоенергетиці – це виробництво біоетанолу. Завдяки здатності цих дріжджів метаболізувати лактозу, вони ідеально підходять для переробки молочних відходів, таких як сироватка, яка часто створює проблему утилізації для молокопереробної галузі (Diniz, Silveira, Fietto, & Passos, 2012).

У процесі ферментації лактоза гідролізується до глюкози та галактози і врешті до етанолу. *K. marxianus* може проводити цей процес при підвищених температурах до 45 – 50°C, що значно знижує ризик контамінації сторонніми мікроорганізмами та зменшує енергетичні витрати на охолодження (Diniz, Silveira, Fietto, & Passos, 2012).

Крім лактози, ці дріжджі, як вже було раніше згадано, здатні переробляти лінгноцелюлозну біомасу – сировину, яка містить пентози, зокрема ксилозу та арабінозу. Завдяки цьому *K. marxianus* можна використовувати для отримання етанолу з соломи, деревини та інших аграрних відходів, що робить виробництво не лише ефективним, але й екологічно чистим. Генетичні модифікації штамів дозволяють підвищити їхню здатність до утилізації цих складних субстратів, роблячи процес більш продуктивним (Zhang et al., 2022).

Залишкові продукти ферментації, які утворюються при використанні *K. marxianus*, можуть слугувати сировиною для виробництва біометану за допомогою анаеробного зброджування. Органічні кислоти, утворені в процесі ферментації, є ідеальними попередниками для метаногенних бактерій, які перетворюють їх у метан. Дріжджі *K. marxianus* відіграють важливу роль на початкових етапах, оскільки вони здатні ефективно розщеплювати складні субстрати до простих органічних сполук, полегшуючи подальшу утилізацію відходів. Такий підхід дозволяє створювати інтегровані системи виробництва біопалива, які мінімізують кількість відходів і збільшують загальну ефективність біоенергетичних процесів (Osorio-González, Gómez-Falcon, Brar, & Ramírez, 2022).

Новітні дослідження показують, що *K. marxianus* можна використовувати у мікробних паливних елементах (MFC). У цих системах електрони, що утворюються в процесі метаболізму органічних сполук, перетворюються на електричну енергію. Перевагою *K. marxianus* є їхній швидкий ріст і здатність метаболізувати широкий спектр субстратів, зокрема ті, що отримані з харчових та агропромислових відходів. Крім того, ці дріжджі можна комбінувати з іншими

мікроорганізмами для підвищення загальної продуктивності системи (Verma, & Mishra, 2021).

2.3. Ферменти

Рекомбінантні штами *K. marxianus* володіють великим біосинтезувальним потенціалом завдяки здатності до ефективною генної інженерії та адаптації для виробництва різноманітних біопродуктів. (Bilal et al., 2022).

Рекомбінантні штами *K. marxianus* мають значний потенціал для виробництва різноманітних ферментів, які широко використовуються в промислових процесах. Завдяки своїй здатності до швидкого росту, метаболічній універсальності і здатності до генної модифікації, ці дріжджі стають потужним інструментом у виробництві ферментів, необхідних для різних промислових галузей. Ферменти, що виробляються рекомбінантними штамами *K. marxianus*, можуть мати широкий спектр застосувань у харчовій, хімічній, фармацевтичній та біоенергетичній промисловості (Bilal et al., 2022).

Оскільки багато виробництв, зокрема молочна промисловість, стикаються з проблемою лактозної непереносимості, *K. marxianus* використовується для виробництва лактозидаз, які гідролізують лактозу до глюкози та галактози. Цей процес дозволяє створювати продукти з низьким вмістом лактози або навіть без лактози. Рекомбінантні штами *K. marxianus*, які експресують лактозидазу, можуть бути застосовані для виробництва молочних продуктів, які безпечні для людей з лактозною непереносимістю. Крім лактози, *K. marxianus* здатний продукувати й інші типи глікозидаз для розщеплення складних вуглеводів, таких як целюлоза або геміцелюлоза, що відкриває можливості для використання в процесах переробки рослинних відходів або виробництва біоетанолу. Для підвищення метаболічної активності лактози було створено рекомбінантний штам *K. marxianus* UFV-3 до якого експресували гени *LAC4* (β -галактозидази), *RAG6* (піруватдекарбоксилази), *GAL7* (галактозо-1-фосфатуридилтрансферази) і *GAL10* (епімерази) з батьківського штаму *K. lactis* JA6. За рахунок цього спостерігався підвищений синтез етанолу з використанням

молочної сироватки як субстрату (Srimahaeak, Petersen, Lillevang, Jespersen, & Larsen, 2022; Diniz, Silveira, Fietto, & Passos, 2012).

Ліпази мають велике значення у багатьох галузях, зокрема в харчовій промисловості, виробництві біодизеля, а також в хімічній промисловості для синтезу біологічно активних молекул. Ліпази, які продукують рекомбінантні штами *K. marxianus*, можуть бути використані для переробки рослинних олій або жирових відходів у біодизель. Це дозволяє створювати стійкі і екологічно чисті джерела енергії на основі відновлюваних ресурсів. Природні штами містять в собі декілька генів синтезу ліпаз (наприклад, штам L2029 має гени *KmYJR107Wp* та *KmLIP3p* що можна експресувати в ті ж самі дріжджі шляхом збільшення самих генів синтезу в декілька разів для підвищення продуктивності штаму). Ліпази можуть бути використані для модифікації жирних кислот в оліях, що призводить до змін їх фізико-хімічних властивостей. Такий процес застосовується в харчовій промисловості для створення нових видів маргаринів, косметичних продуктів, а також для виробництва інгредієнтів для фармацевтичної промисловості. Ліпази також застосовуються для синтезу спеціальних хімічних сполук у косметиці та фармацевтиці. Наприклад, вони можуть бути використані для виробництва ароматичних естерів, які є важливими для виробництва парфумів і кремів (Martínez-Corona, Vázquez Marrufo, Cortés Penagos, Madrigal-Pérez, & González-Hernández, 2020).

Протеїнази широко використовуються в харчовій, хімічній і фармацевтичній промисловості для обробки білків, виробництва пептидів, а також для очищення білків з біотехнологічних культур. Протеїнази, вироблені рекомбінантними штамми *K. marxianus*, можуть бути застосовані для очищення рекомбінантних білків, що використовуються в медичних препаратах або харчових добавках. Завдяки своїм властивостям до селективного розщеплення білкових молекул, ці ферменти можуть допомогти у створенні чистих білкових препаратів. Протеїнази використовуються для гідролізу білків у харчових продуктах, таких як м'ясо, молочні продукти, а також для створення білкових добавок, що підвищують поживну цінність продуктів. До синтезу

рекомбінантної протеази здатен штам KMS-2, в якому видалені гени уреази (Raimondi et al., 2013; Galvão de Souza Júnior, MacDonald Ledingham, & Antônio de Moraes Júnior, 2001).

Амілази використовуються для гідролізу крохмалю до глюкози, що потім може бути використано для виробництва біоетанолу через процеси ферментації. Рекомбінантні штами *K. marxianus*, здатні синтезувати амілазу, можуть значно підвищити ефективність цих процесів, особливо при використанні сировини, багатой на крохмаль. Амілази застосовуються для виробництва солодких сиропів, пива, хліба та інших продуктів харчування. Вони покращують текстуру та смакові якості продуктів, розщеплюючи крохмаль і полегшуючи процеси гідролізу (Celińska, Borkowska, & Białas, 2016).

2.4. Вітаміни та антибіотики

Природні та рекомбінантні штами *K. marxianus* демонструють значний потенціал у виробництві біологічно активних речовин, таких як вітаміни та антибіотики (Lane, & Morrissey, 2010).

Рибофлавін є важливим водорозчинним вітаміном, необхідним для підтримки багатьох метаболічних процесів в організмі. *K. marxianus* може бути використаний для його виробництва завдяки здатності до природного або інженерного біосинтезу. Штами *K. marxianus* можуть бути модифіковані для посилення ферментативної активності шляхів, відповідальних за синтез рибофлавіну, наприклад через регуляцію активності ферментів GTP-циклогідролази II та рибулозо-5-фосфатної ізомерази. Рибофлавін, отриманий за допомогою *K. marxianus*, використовується в харчових добавках, кормах для тварин і фармацевтичних препаратах. *K. marxianus* може бути використаний для отримання інших вітамінів групи В, зокрема ніацину (В3) та пантотенової кислоти (В5). За допомогою генетичної модифікації можливе посилення метаболічних шляхів, відповідальних за їх синтез (Marcišauskas, & Nielsen, 2019).

Рекомбінантні штами *K. marxianus* здатні синтезувати певні види антимікробних сполук, які можуть використовуватися в медицині, сільському господарстві та харчовій промисловості для контролю росту патогенів.

Модифіковані штами *K. marxianus* демонструють потенціал у виробництві пептидних антибіотиків. Зокрема, штами можуть бути генетично сконструйовані для синтезу речовин, подібних до нігростатину або тиолутину, які мають широкий спектр дії проти грам-позитивних і грам-негативних бактерій (Marcišauskas, & Nielsen, 2019).

2.5. Високовартісні хімічні сполуки

Рекомбінантні штами *K. marxianus* активно досліджуються та застосовуються для біосинтезу високовартісних хімічних сполук завдяки їхній здатності до генетичних модифікацій, що дозволяє перенаправляти метаболічні потоки для отримання цільових продуктів. Їх характерні особливості роблять ці дріжджі конкурентоспроможними у порівнянні з іншими мікроорганізмами, такими як *S. cerevisiae*.

Рекомбінантні штами *K. marxianus* генетично модифікуються для підвищення продуктивності синтезу янтарної кислоти (сукцинату), яка є цінним продуктом для хімічної промисловості. Янтарна кислота використовується у виробництві біопластмас, фармацевтичних препаратів і харчових добавок. Шляхом інтродукції генів, відповідальних за посилений транспорт та акумуляцію янтарної кислоти, штами можуть досягати високих титрів продукту навіть із лінгноцелюлозної сировини (Zeng et al., 2024).

Також рекомбінантні штами цих дріжджів демонструють здатність до підвищеного виробництва лимонної кислоти (штам EXF-5288 синтезує близько 10,5 г/л цієї кислоти). Внесення змін у метаболічні шляхи трикарбонового циклу (ТСА) та оптимізація регуляції транспорту цитрату дозволяють підвищити вихід продукту з використанням недорогих субстратів, таких як відходи агропромисловості (Rocha, Abrahão-Neto, & Gombert, 2011).

Штами *K. marxianus*, модифіковані для експресії генів ферулової кислоти декарбоксилази та інших ензимів, здатні синтезувати ванілін із ферулової кислоти. Цей підхід забезпечує стійкий та екологічний метод виробництва ароматизаторів для харчової та парфумерної промисловості (Richard, & Merja, 2014).

Рекомбінантні штами *K. marxianus*, інженерно модифіковані для збільшення продуктивності шляхів синтезу фенілаланіну та фенілетанолу, здатні забезпечувати високу концентрацію іншої ароматичної сполуки із запахом троянди – 2-фенілетанол, навіть у відходах харчового виробництва (Richard, & Merja, 2014).

Рекомбінантні штами *K. marxianus* створюються для виробництва еритритолу, натурального підсолоджувача з низьким глікемічним індексом. Інженерія шляхів пентозофосфатного циклу (PPP) дозволяє штамам ефективно синтезувати еритритол із дешевих сировин, таких як лактоза або ксилоза (Li, J., Li, H., Liu, & Luo, 2023).

Генно-інженерні штами *K. marxianus* успішно використовуються для виробництва каротиноїдів, таких як бета-каротин і лікопін, які мають високий попит у харчовій і фармацевтичній промисловості. Інтродукція генів, відповідальних за синтез ізопреноїдних попередників, таких як геранілгеранілдифосфат, значно підвищує продуктивність цих сполук (Lin et al., 2017).

Рекомбінантні штами *K. marxianus* модифікуються для підвищення виробництва маннанів, які мають імуностимулюючі та пребіотичні властивості. Такі сполуки знаходять застосування у створенні функціональних харчових продуктів і фармацевтичних препаратів (Lukondeh, Ashbolt, & Rogers, 2003).

У табл.2.1 наведено біосинтезувальні можливості різних рекомбінантних штамів *K. marxianus*.

Синтезувальна здатність рекомбінантних штамів *Kluyveromyces marxianus*

Природний/ рекомбінантний штами	Плазміда	Вбудований ген синтезу	Склад поживного середовища, г/л	Параметри культивування	Концентрація продукту або активність	Джерело
Етанол						
DMB1 / DMB4	<i>pGK406</i>	<i>URA3</i> (кодує оротидин-5'-фосфат- декарбоксилазу)	Глюкоза – 40 Ксилоза – 20 Екстракт дріжджів – 10 Пептон – 20 Аденін – 0,02	40°C, 36 годин	24 г/л	Suzuki, Hoshino, & Matsushika, 2019
YZJ087 / YZJ088	<i>pZJ044</i>	<i>KmGLT1</i> (кодує глутамат-синтетазу)	Ксилоза – 118,39 Пептон – 20 Екстракт дріжджів – 10	42°C, 18 годин, 250 об/хв	44,95 г/л	Zhang et al., 2015
Ксилітол						
YZJ014 / YZJ017	<i>pZJ012</i>	<i>NcXyl1</i> (кодує ксилозо-редуктазу)	Ксилоза – 100 Гліцерол – 20	42°C, 24 години, 250 об/хв	100,02 г/л	Zhang J., Zhang B., Wang, Gao, & Hong, 2014
YZJQ005 / YZJQ016	<i>pZJ041</i>	<i>KmZWF1, ScURA3</i>	Ксилоза – 73,05 Пептон – 20 Екстракт дріжджів – 10	42°C, 84 години, 450 об/хв	105,22 г/л	Zhang et al., 2022
YZB181 / YZB194	<i>pZB085</i>	<i>ScGAL2^{N376F}</i> (ксилозо- специфічний транспортер), <i>NcXYL1</i> (кодує ксилозо-редуктазу)	Ксилоза – 205,33 Глюкоза – 121,01 Пептон – 20 Екстракт дріжджів – 10 Етанол – 20	42°C, 69 годин, 450 об/хв	203,57 г/л	Zhang et al., 2020b

2-Фенілетанол						
NBRC1777 / KmASR.129	<i>pUCC001</i>	<i>KmARO8</i> (кодує ароматичну амінотрансферазу)	Глюкоза – 20 (NH ₄) ₂ SO ₄ – 5 KH ₂ PO ₄ – 3 MgSO ₄ ·7H ₂ O – 0,5	30°C, 48 годин, 200 об/хв	850 мг/л	Rajkumar, & Morrissey, 2020
CBS 6556 / CBS 6556 eat1Δ his3Δ ura3Δ:: (<i>PKmTEF3</i>) <i>KmARO10</i> , <i>abz1</i> ::(<i>PKmTEF3</i>) <i>KmARO4K221L</i> - (<i>PKmPGK</i>) <i>KmARO7G141S</i> - (<i>PKmTEF3</i>) <i>KmPHA2</i>	<i>pCRISPR</i>	<i>ScARO4</i> , <i>ScARO7</i> , <i>KmARO4</i> , <i>KmARO7</i> (коднують ароматичну амінотрансферазу)	Глюкоза – 10 Екстракт дріжджів – 20 Пептон – 10 5-фторротова кислота – 1	37°C, 120 годин	1943 ± 63 мг/л	Li et al., 2021
Інуліназа						
KM-526 / KM-KN16	<i>pMD-rDNA-G418- INU1</i>	<i>INU1</i> (кодує інуліназсинтетазу)	Глюкоза – 41 Фруктоза – 256 Інулін – 30 Екстракт дріжджів – 15 KH ₂ PO ₄ – 10 (NH ₄) ₂ SO ₄ – 10 FeSO ₄ ·7H ₂ O – 0,5 CaCl ₂ ·2H ₂ O – 0,3 MgSO ₄ ·7H ₂ O – 0,3	28°C, 108 годин, 450 об/хв	18699,8 ± 736,4 Од/г	Zhang, Y., et al 2019
DSM 5418 / S124Y	<i>pPIC9K</i>	<i>KmINU</i> (кодує інуліназсинтетазу)	Пептон – 20 Екстракт дріжджів – 10 KH ₂ PO ₄ – 13,61 Азотні основи дріжджів – 13,4 Біотин – 0,004 Метанол – 5	30°C, 96 годин, 250 об/хв	568,93 Од/л	Wang et al., 2021

2.6. Вірусоподібні частинки

K. marxianus є одними з найбільш вивчених дріжджових організмів, що використовуються в біотехнології завдяки своїй здатності виробляти не тільки корисні біопродукти, такі як ферменти та органічні сполуки, але й вірусоподібні частинки, які мають важливе значення в ряді сучасних біотехнологічних та медичних додатків. Це стосується, зокрема, виробництва вірусоподібних частинок (VLPs), що є корисними для розробки вакцин, а також для інших біомедичних застосувань (Bilal et al., 2022).

Вірусоподібні частинки (ВПЧ/VLPs) – це молекули, що нагадують вірусні частинки, але не містять генетичного матеріалу, необхідного для їх реплікації. VLPs мають високу конформовану подібність до справжніх вірусів, що дозволяє використовувати їх як вакцини або в діагностиці, оскільки вони можуть стимулювати імунну відповідь, подібну до того, яку викликає справжній вірус (Nooraei et al., 2021).

Штами *K. marxianus* мають здатність до швидкого росту і стійкості до різних умов навколишнього середовища, що є основною його перевагою використання для виробництва VLPs. Вірусоподібні частинки можуть бути створені шляхом експресії в дріжджах структурних білків вірусу або його частин. Ці білки організм синтезує за допомогою своїх природних механізмів трансляції, після чого вони асоціюються і самоорганізуються в структури, подібні до вірусів. Одним з найбільш часто використовуваних прикладів є використання *K. marxianus* для виробництва VLPs, що імітують за своєю структурною характеристикою VLPs капсиду вірусу гепатиту В або папіломавірусів людини (Nooraei et al., 2021).

Переваги використання *K. marxianus* для виробництва VLPs (Nooraei et al., 2021):

- 1) експресія зовнішніх білків вірусу – *K. marxianus* здатний ефективно виражати вірусні білки, що дозволяє використовувати його для синтезу VLPs, при цьому штам може функціонувати в умовах ферментації, що значно знижує витрати на виробництво в порівнянні з іншими системами експресії, такими як

бактерії або ссавці; 2) вірусоподібні частинки формуються в результаті природної самоорганізації білків в складі дріжджових клітин, що дозволяє отримати стабільні ідентичні структури, які є схожими за своєю формою на вірусні частинки, але не містять їх генетичний матеріал; 3) важливою перевагою є те, що VLPs, вироблені в *K. marxianus*, не несуть патогенної загрози, оскільки не містять вірусної РНК або ДНК, що робить їх безпечними для використання в медичних цілях, зокрема для створення вакцин; 4) сумісність з технологіями молекулярного клонування – завдяки добре вивченим системам генетичної модифікації дріжджів, *K. marxianus* може бути адаптований для ефективного вбудовування генів, що кодують вірусні білки, ця здатність дозволяє контролювати кількість і тип вироблених VLPs, що робить процес більш гнучким і налаштовуваним; 5) *K. marxianus* швидко росте і здатний досягати високих щільностей клітин у культурах, що дозволяє ефективно збирати VLPs на великих масштабах, це особливо важливо для комерційного виробництва, де потрібні значні обсяги продукції за відносно короткий період часу.

VLPs, що виробляються *K. marxianus*, можуть бути використані для створення вакцин проти різних інфекційних хвороб. Наприклад, вакцини на основі VLPs вірусу папіломи людини (HPV), вже використовуються для профілактики раку шийки матки. Подібні підходи можуть бути адаптовані і для інших вірусів. VLPs є потужним інструментом для вивчення імунної відповіді та взаємодії антитіл з вірусними білками. Це може мати важливе значення для розвитку нових терапевтичних стратегій, включаючи моноклональні антитіла. VLPs можуть бути використані для доставки ліків, оскільки вони здатні досягати специфічних клітин організму, наприклад, для доставки генетичного матеріалу або лікарських сполук до клітин імунної системи (Nooraei et al., 2021).

Нині, відомо, що генно-інженерні штами цих нетрадиційних дріжджів можуть синтезувати 3 типи вірусоподібних частинок: білок PCV2 цирковірусу свиней, білок PPV – VP2 парвовірусу свиней та білок nvHVP2 бірновірусу курей (Duan et al., 2019; Yang et al., 2021a; Yang et al., 2021b).

Окрім цього, вищезазначені білкові молекули, що синтезуються *K. marxianus* також можуть продукуватися іншими мікроорганізмами. Але все ж у *K. marxianus* і концентрація VLP, і швидкість процесу значно вищі порівняно з іншими продуцентами. До прикладу, кишкова паличка є найпоширенішою бактеріальною системою для виробництва рекомбінантних білків. Генно-модифікований штам *Escherichia coli* BL21(DE3)-pET28a здатен досягати такої ж високої концентрації VLP типу VP2 за близько 45 год ферментації клітин як і дріжджі *K. marxianus*. Але процес передбачає використання дороговартісного багатокомпонентного середовища з періодичним підживленням та внесення індуктора, що ускладнює процес, підвищує витрати виробництва та ризик контамінації. І звісно ж головним недоліком використання бактеріальних систем експресії є необхідність видалення ендотоксинів у процесі виділення та очищення внутрішньоклітинних продуктів, так як у прокаріотичних продуцентів відсутня стадія посттрансляційних модифікацій (Wang et al., 2020).

У табл.2.2 продемонстровано рекомбінантні штами *K. marxianus*, що синтезують VLPs.

Окрім вищезазначених сполук, *K. marxianus* здатен до синтезу ще й інших наноструктур. Повідомляється, що було досягнуто наразі найбільшого виходу наночастинок рекомбінантного феритину людини (*hFTH*) за рахунок рекомбінантного штаму дріжджів *K. marxianus* порівняно з іншими біологічними агентами, а саме 11 г/л розчинної речовини. До того ж, дані структури відрізняються дуже важливими та бажаними характеристиками – демонструють фероксидазну активність, ефективне самозбирання, хелатні властивості заліза та секрецію цитокінів. Використання даних структур має великий потенціал у розвитку медицини та фармацевтичної промисловості, зокрема наночастинок феритину можуть бути використані у якості імунного ад'юванта для клінічного застосування ліків на основі феритину, або ж використовуючи здатність до інкапсуляції порожнини наноклітки та властивості феритину, спрямовані на пухлину, перспективним є їх використання для доставки хіміотерапевтичних препаратів (Lu et al., 2024).

Синтез вірусоподібних частинок рекомбінантними штамами *Kluyveromyces marxianus*

Штам	Склад поживного середовища, г/л	Параметри біосинтезу	Тип вірусоподібних частинок	Концентрація вірусоподібних частинок, г/л	Джерело
KM-PCV2	Глюкоза – 5, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 5 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5 KH_2PO_4 – 3 Етилендіамінтетраоцтова кислота (EDTA) – 0,015 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,0045 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,001 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,0003 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,0003 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,0004 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,0045 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,003 H_3BO_3 – 0,001 KI – 0,0001 Біотин – 0,0001 Кальцію пантотенат – 0,001 Нікотинова кислота – 0,001 Силіконовий піногасник – 0,15 мл	30°C, 16 годин, рН 5,5	Білок PCV2 цирковірусу свиней	1,91	Duan et al., 2019

Закінчення табл. 2.2

KM-VPL-VP2	<p>Глюкоза – 10 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 10 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 5 KH_2PO_4 – 20 EDTA – 0,75 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,225 $\text{MnCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,05 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,015 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,015 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,020 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,225 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,150 H_3BO_3 – 0,050 KI – 0,005 Біотин – 0,005 Кальцій пантотенат – 0,100 Нікотинова кислота – 0,100</p>	<p>30°C, 48 годин, 220 об/хв, pH 5,5</p>	<p>Білок PPV – VP2 парвовірусу свиней</p>	<p>2,5</p>	<p>Yang et al., 2021a</p>
IBDV BC6/85	<p>Глюкоза – 40 Дріжджовий екстракт – 20 *Мінеральне середовище ідентичне як для штаму KM-PCV2</p>	<p>30°C, 48 годин, 220 об/хв</p>	<p>Білок pVNP2 бірновірусу курей</p>	<p>1,89</p>	<p>Yang et al., 2021b</p>

Отже, аналізуючи наукові джерела останніх років, можна підсумувати:

Штами *K. marxianus* демонструють унікальні властивості, які роблять їх цінним об'єктом для біотехнологічних досліджень та промислового застосування, зокрема стають перспективною платформою для виробництва ферментів, органічних кислот, ароматичних сполук, вакцин, біопластмас і навіть біопалива.

Природні штами *K. marxianus* демонструють значний потенціал для інтеграції в концепцію циркулярної економіки, забезпечуючи ефективну утилізацію проблемних відходів молочної промисловості, зменшення вуглецевого сліду виробництва та одночасний синтез цінних метаболітів, таких як етанол і 2-фенілетанол.

Синтез рекомбінантних сполук, зокрема вірусоподібних частинок (ВПЧ), є ключовим етапом розвитку наномедицини у створенні безпечних та ефективних вакцин. Окрім цього, свиногосподарство є стратегічною галуззю вітчизняного тваринництва, що формує значну частку м'ясного ринку країни. Найбільші збитки галузі свинарства спричиняють саме вірусні інфекції, зокрема найпоширенішою є парвовірусна, тому детальне опрацювання та розгляд процесів виділення та очищення ВПЧ VP2 парвовірусу свиней є дуже актуально у контексті розробки протипарвовірусної вакцини з покращеними властивостями.

ІНЖЕНЕРНА ЧАСТИНА РОБОТИ

РОЗДІЛ 3

ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

3.1. Характеристика вірусоподібних частинок парвовірусу свиней

Вірусоподібні частинки (ВПЧ) є синтетичними структурами, що повторюють морфологію справжніх вірусів, але не містять генетичного матеріалу. Вони складаються з вірусних капсидних білків, які самостійно збираються у нанорозмірні частинки з ікосаедричною або спіральною симетрією. Завдяки відсутності вірусного геному ВПЧ не здатні до реплікації, що робить їх абсолютно безпечними, проте зберігається їхня здатність стимулювати імунну відповідь. Саме ці характеристики забезпечують їхню цінність для створення вакцин, діагностичних тестів та інших біотехнологічних розробок (Nooraei et al, 2021).

Отримання ВПЧ базується на використанні *різних експресійних систем*.

Найчастіше використовують:

Бакуловірусну систему (інфікування клітин комах бакуловірусом, що містить гени вірусних білків) (Gopal & Schneemann, 2018);

Дріжджові експресійні системи (*Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*), що забезпечують високу продуктивність та можливість посттрансляційних модифікацій білків (Brachelente, Galli & Cervelli, 2023);

Клітини ссавців (НЕК293, СНО), які дають найбільш подібні до нативних вірусних білків структури, але є технологічно складними (Wu et al, 2010).

Завдяки своїй стабільності ВПЧ широко застосовуються у розробці вакцин проти вірусних захворювань, таких як гепатит В, вірус папіломи людини, вірус сказу, парвовірусні інфекції тощо. Також, їх використовують як платформи для доставки антигенів або терапевтичних молекул (Nooraei et al, 2021).

					<i>НУХТ БТЕК 02.01.12 КР ПЗ</i>			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Онищенко А.А.				РОЗДІЛ 3 ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ	Лім.	Арк.	Аркушів
Перевір.	Скροцька О.І.						44	158
Реценз.						<i>Кафедра БТМ</i>		
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							

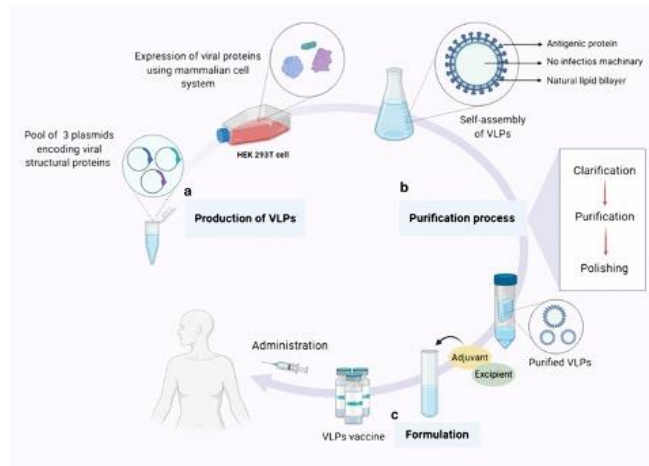


Рис.3.1. Виробництво ВПЧ вакцини за допомогою системи експресії клітин савців [<https://www.creative-biolabs.com/virus-like-particles-vlps-production-in-mammalian-cell-system.html>]

Парвовірус свиней (PPV, Porcine Parvovirus) є представником родини *Parvoviridae*, що має одноланцюговий ДНК-геном довжиною близько 5 – 6 кб. Він має ікосаедричний капсид діаметром 18 – 26 нм і не містить ліпідної оболонки, що робить його надзвичайно стійким до впливу фізичних та хімічних чинників, зокрема високих температур, змін рН та дезінфікуючих засобів [<https://www.ivami.com/en/molecular-veterinary-microbiology/5552-porcine-parvovirus-ppv-diagnostico-molecular-pcr>].

PPV є одним із найважливіших патогенів, що впливають на репродуктивну систему свиней. Він викликає так званий "синдром SMEDI" (Stillbirth, Mummification, Embryonic Death, and Infertility – мертвонародження, муміфікація плодів, ембріональна смертність і безпліддя). Інфікування плоду на ранніх стадіях вагітності призводить до його загибелі, тоді як на пізніших термінах можливий розвиток слабких або нежиттєздатних поросят (Eddicks et al, 2023).

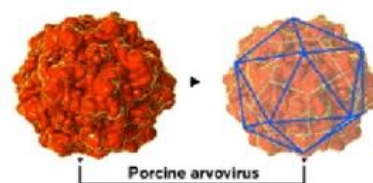


Рис.3.2. Структурний вигляд парвовірусу свиней (Nader Manrique et al, 2020)

Основний механізм передачі вірусу – фекально-оральний шлях. Свині заражаються через інфіковані корми, воду, предмети догляду або контакт із хворими тваринами. Вірус також має здатність проникати через плаценту, що забезпечує його вертикальну передачу [<https://www.ivami.com/en/molecular-veterinary-microbiology/5552-porcine-parvovirus-ppv-diagnostic-molecular-pcr>].

Через значний економічний збиток, пов'язаний із парвовірусною інфекцією, у ветеринарній практиці широко використовуються вакцини для профілактики PPV. Більшість із них є інактивованими, але активно досліджуються нові рекомбінантні вакцини на основі ВПЧ (Jóźwik et al, 2009).

Вірусоподібні частинки парвовірусу свиней (ВПЧ PPV) є наноструктурами, що імітують морфологію природного вірусу. Вони мають ікосаедричну форму та складаються з капсидних білків VP1, VP2 і VP3, які самозбираються у стабільну білкову оболонку без включення вірусного генетичного матеріалу. Діаметр ВПЧ PPV становить 18 – 26 нм, що відповідає розмірам природного парвовірусу свиней (Nooraei et al, 2021; Gao et al, 2022).

Завдяки своїй будові ВПЧ PPV мають високу структурну стабільність, що забезпечує їхню довговічність у зовнішньому середовищі. Вони стійкі до змін температури та зберігають свою конформацію у широкому діапазоні рН, що є важливим фактором для їхнього використання у ветеринарних препаратах (Nooraei et al, 2021; Gao et al, 2022).

Однією з ключових властивостей ВПЧ PPV є їхня здатність ефективно стимулювати імунну відповідь у свиней. Оскільки їхня структура ідентична натуральному вірусу, організм сприймає їх як інфекційний агент, що призводить до активації як гуморального, так і клітинного імунітету (Nooraei et al, 2021; Gao et al, 2022).

Гуморальна імунна відповідь – ВПЧ PPV активують В-клітини, що сприяє утворенню специфічних антитіл, таких як IgG та IgA. Антитіла блокують проникнення природного парвовірусу у клітини, запобігаючи реплікації вірусу у випадку інфікування (Nooraei et al, 2021; Gao et al, 2022).

Клітинний імунітет – активація дендритних клітин та Т-лімфоцитів (CD4+ та CD8+) сприяє формуванню довготривалої імунної пам'яті. CD8+ цитотоксичні Т-клітини забезпечують знищення заражених клітин у випадку контакту з вірусом (Nooraei et al, 2021; Gao et al, 2022).

Завдяки такому механізму ВПЧ PPV забезпечують надійний захист свиней від інфекції, що має вирішальне значення для зменшення економічних втрат у свинарстві (Gao et al, 2022).

Традиційні вакцини проти парвовірусу свиней базуються на інактивованих або живих атенуйованих вірусах. Однак вони мають низку обмежень, таких як можливість залишкової вірулентності або необхідність складних умов зберігання. ВПЧ PPV позбавлені цих недоліків і мають значні переваги (Gao et al, 2022):

Абсолютна безпечність – відсутність генетичного матеріалу унеможливорює реплікацію або реверсію вірусу до патогенного стану.

Висока стабільність – частинки зберігають свою структуру без необхідності використання спеціальних умов транспортування та зберігання.

Потужна імуногенність – стимулюють комплексну імунну відповідь без додаткових ад'ювантів.

Гнучкість у розробці вакцин – можливість комбінування ВПЧ PPV з іншими вірусоподібними частинками для створення багатокомпонентних вакцин.

Застосування ВПЧ PPV у ветеринарній медицині (Gao et al, 2022):

1. Створення вакцин – ВПЧ PPV є перспективною основою для сучасних вакцин, що забезпечують тривалий імунітет проти парвовірусу свиней; окрім цього, поєднання ВПЧ із іншими антигенами може розширити захист проти інших репродуктивних та респіраторних інфекцій свиней.

2. Діагностика парвовірусної інфекції – ВПЧ PPV використовуються у серологічних тестах (ELISA) для виявлення антитіл до парвовірусу свиней; такі тести допомагають контролювати імунний статус тварин, оцінювати ефективність вакцинації та виявляти інфікованих особин.

3. Інноваційні дослідження у ветеринарній біотехнології – використання ВПЧ PPV як носіїв для доставки інших антигенів або імуностимуляторів; поєднання ВПЧ із нанотехнологіями для створення нових типів ветеринарних препаратів.

Вірусоподібні частинки парвовірусу свиней є високотехнологічним інструментом у ветеринарній медицині. Вони мають значний потенціал для розробки ефективних вакцин та діагностичних тестів, що допомагають знизити економічні збитки, пов'язані з парвовірусною інфекцією. Завдяки безпечності, стабільності та високій імуногенності ВПЧ PPV можуть стати основою нових підходів у боротьбі з вірусними захворюваннями у тваринництві.

3.2. Огляд ринку вакцин проти парвовірусу свиней

Ринок ветеринарних вакцин проти парвовірусу свиней представлений переважно інактивованими вакцинами, які містять убитий вірус або його компоненти. Ці вакцини стимулюють імунну відповідь у тварин, забезпечуючи захист від інфекції.

Основні вакцини на ринку:

Порциліс® Epi+Парво

[\[http://www.neovac.com.ua/portsylis-erie-vaccine-inactivated-parvo\]](http://www.neovac.com.ua/portsylis-erie-vaccine-inactivated-parvo)

Ця вакцина від компанії MSD Animal Health призначена для активної імунізації свиноматок та ремонтних свинок проти бешихи та парвовірусної інфекції. Вона містить антигени *Erysipelothrix rhusiopathiae* (збудника бешихи) та парвовірусу свиней, що забезпечує захист від обох захворювань. Вакцина вводиться внутрішньом'язово, забезпечуючи імунітет проти бешихи протягом не менше 6 місяців та проти парвовірусної інфекції не менше 12 місяців.

Порциліс® Epi+Парво+Лепто

[\[https://www.msd-animal-health.com.ua/products/porcilis-eryparvolepto/\]](https://www.msd-animal-health.com.ua/products/porcilis-eryparvolepto/)

Це комбінована вакцина від тієї ж компанії, яка додатково до компонентів проти бешихи та парвовірусу включає антигени кількох сероварів лептоспір, забезпечуючи захист також від лептоспірозу. Вакцинація цією вакциною

забезпечує комплексний захист репродуктивної системи свиней від кількох патогенів.

Парвоеризін

[<https://zoo-vet.com.ua/parvoeryzyn-vaktsyna-protyv-parvovyroza-y-rozhy-svynei>]

Інактивована вакцина, призначена для профілактичної вакцинації ремонтних свинок, свиноматок та хряків проти парвовірозу та бешихи свиней. Випускається у флаконах по 20 мл (10 доз).

Парворувакс

[<https://www.ceva.ua/Produkcija/Perelik-preparativ/PARVORUVAKS>]

Вакцина, розроблена компанією Ceva Santé Animale (Франція), є асоційованою інактивованою вакциною проти парвовірозу та бешихи свиней. Вона призначена для активної імунізації свиней віком від 6 місяців, оскільки наявність материнських антитіл у молодших тварин може знизити ефективність вакцинації.

Суїмун Парво-Ері

[<https://www.biotestlab.ua/ua/products/suimun-parvo-ery-inac>]

Вакцина, призначена для свиней віком від 2 місяців та вагою від 15 кг. Підходить для регулярної вакцинації та може використовуватися в домашніх умовах під наглядом ветеринара або після консультації зі спеціалістом.

Ерісенг Парво

[<https://www.vetfactor.com/ua/product/vaktcina-eryseng-parvo/>]

Ця інактивована вакцина, вироблена іспанською компанією Hipra, призначена для профілактики парвовірусної інфекції та бешихи свиней. Вона забезпечує надійний захист та широко використовується в багатьох країнах.

У табл.3.1 більш детально продемонстровані вакцини проти парвовірусу свиней.

Ринок вакцин проти парвовірусу свиней

Назва вакцини	Тип вакцини	Концентрація вірусу	Дозування	Спосіб введення	Джерело
Порциліс® Ері+Парво	Інактивована	9 log ₂ /дозу або >552 EU/доза	2 мл	В/м	[http://www.neo-vac.com.ua/port-sylis-erie-vaccine-inactivated-parvo]
Парворувакс	Інактивована	2 log ₁₀ /дозу або 2 HAI U/доза	2 мл	В/м	[https://www.ceva.ua/Produkcija/Perelik-preparativ/PARVORUVAKS]
Парвоеризін	Інактивована	4 log ₂ /дозу	2 мл	В/м	[https://zoo-vet.com.ua/ua/p-arvoeryzyn-vaktsyna-protyv-parvovyroza-y-rozhy-svynei]
Парвозін- Оль	Інактивована	4 log ₂ /дозу	2 мл	В/м	[https://www.bioveta.cz/ua/preparaty-1/zdorove-zhivotnyh-1/parvozn-ol-parvosin-ol.html]
Суімун Парво Ері інак	Інактивована	9 log ₂ /дозу	2 мл	В/м	[https://www.biotechlab.ua/ua/products/suimun-parvo-ery-inac/]
Ерісенг Парво	Інактивована	RP > 1,15	2 мл	В/м	[https://www.vetfactor.com/ua/product/vaktsina-eryseng-parvo/]
Біосуіс Парво Л (6)	Інактивована	4 log ₂ /дозу	2 мл	В/м	[https://www.bioveta.cz/ua/preparaty-1/zdorove-zhivotnyh-1/bosus-parvo-l6-biosuis-parvo-l6.html]

Тож, з табл.3.1 можна зробити висновок, що переважна кількість вакцин проти парвовірусу свиней є інактивованими. Проблема порівняння цих вакцин криється в концентрації вірусу (вірусних частинок) в препараті.

Інактивовані вакцини містять знешкоджений парвовірус, який не здатний до реплікації. Вони забезпечують формування імунної відповіді без ризику зараження (Robinson, 2016).

Переваги інактивованих вакцин (Robinson, 2016): високий рівень безпеки, оскільки вірус повністю інактивований; тривалий імунітет після правильної вакцинації; використовуються протягом багатьох років і мають добре вивчену ефективність; не потребують особливих умов біобезпеки під час виробництва.

Недоліки (Robinson, 2016): потребують ад'ювантів для посилення імунної відповіді; менший рівень активації клітинного імунітету, оскільки вірус не здатний до реплікації; зазвичай потребують ревакцинації для підтримання імунітету; складний процес виробництва, що включає культивування вірусу та його інактивацію.

ВПЧ-вакцини містять структури, які імітують вірус, але не мають генетичного матеріалу і не здатні до реплікації. Вони створюють імунну відповідь, подібну до природної інфекції, без ризику зараження (Gao et al, 2022).

Переваги ВПЧ-вакцин (Gao et al, 2022): викликають сильну як гуморальну, так і клітинну імунну відповідь; не містять генетичного матеріалу вірусу, що виключає ризик повернення до патогенності; стабільніші та можуть зберігатися при ширшому діапазоні температур, що полегшує логістику; мають нижчий ризик викликати побічні реакції через відсутність вірусних білків, пов'язаних із патогенністю.

Недоліки (Gao et al, 2022): виробництво ВПЧ є складнішим, ніж інактивованих вакцин; потребують сучасних біотехнологічних платформ для створення високоякісних вірусоподібних частинок; деякі ВПЧ-вакцини можуть потребувати додаткових ад'ювантів для оптимальної імунної відповіді; досі ведуться дослідження щодо їх тривалої ефективності у ветеринарній медицині.

У табл.3.2 показано порівняння вищезгаданих типів вакцин.

Порівняння класичних інактивованих вакцин та вакцин на основі вірусоподібних частинок

Характеристика	Інактивовані вакцини	Вакцини на основі вірусоподібних частинок
Принцип дії	Інактивований вірус	Вірусоподібні частинки без генетичного матеріалу
Імунна відповідь	Переважно гуморальна	Гуморальна та клітинна
Безпека	Висока	Дуже висока, немає ризику інфікування
Тривалість імунітету	Зазвичай потребує ревакцинації	Триваліший захист, але залежить від ад'ювантів
Виробництво	Культивування вірусу та його інактивація	Біотехнологічне створення білкових структур
Потреба в ад'ювантах	Так, для посилення імунної відповіді	Можливо, але менше ніж для інактивованих вакцинах
Логістика	Вимагає холододового ланцюга	Стабільніші, можуть мати ширший діапазон температур зберігання
Ризик інфікування	Можливий	Відсутній
Вартість виробництва	Відносно нижча	Вища через складність виробництва
Досвід використання	Широко застосовується	Ведуться активні дослідження

Примітка: таблиця складена автором самостійно

Інактивовані вакцини проти парвовірусу свиней є традиційним методом профілактики та мають доведену ефективність, але потребують регулярної ревакцинації та містять ад'юванти. Вакцини на основі ВПЧ є перспективною альтернативою, оскільки викликають сильнішу імунну відповідь, безпечніші та стабільніші, але їх виробництво є дорогим та складним. Перехід до ВПЧ-вакцин може стати важливим кроком у ветеринарній медицині, проте поки що вони потребують подальшого вивчення та широкомасштабного впровадження.

3.3. Розрахунок річної потужності виробництва

Оскільки основну імунізацію свиней проти парвовірусу проводять за допомогою інактивованих вакцин, пропонується спиратися на інформацію від виробників таких препаратів. За протоколом першу вакцинацію для свинок та свиноматок проводять у віці 5 місяців (150 днів), другу – через 2-3 тижні. Для

свиноматок з ризиком персистенції материнських антитіл вакцинацію проводять двічі перед спаровуванням – за 4 та за 2 тижні, і передбачається третя вакцинація – через 2-3 тижні. Для кнурів схема трохи відрізняється, вакцинують один раз за 2 тижні до спаровування, а потім – кожні 6 місяців [<https://eurovet.com.ua/ru/novosti/vakcini-bioveta-a-s-proti-parvovirusnoi-infekcii-svinej-efektivna-profilaktika-statevih-rozladiv-viklikanij-parvovirus-suis-2/>]. Проте, мова йде про інактивовані вакцини, а за вищенаведеними даними пропонується виготовляти рекомбінантну вакцину, що буде мати свої особливості.

За даними роботи 2021 року мишей жіночої статі віком в 6 тижнів вакцинували ВПЧ парвовірусу з рекомбінантного штаму *K. marxianus*. Була визначена оптимальна концентрація ВПЧ для вакцинації мишей, що становила 40 мкг/дозу. При імунізації саме такою кількістю ВПЧ спостерігалась висока активність антитіл до інгібітора гемаглютинації у сироватці крові мишей, який був стабільно високим протягом 49 діб (Yang et al, 2021). Враховуючи те, що далі активну імунну відповідь не було перевірено, пропонується для вакцинації використовувати стандартну схему подвійної вакцинації свиней – на 5 місяці та через 2-3 тижні для формування активного імунітету проти парвовірусу свиней. Для забезпечення пропонується обрати лише одну групу свиней, а саме ту, яка може потенційно бути найбільш ураженою (спостерігаються найбільш негативні наслідки), а саме свиноматок.

Відповідно до даних Державної служби статистики України, на 1 січня 2023 року загальне поголів'я свиней становило 4,95 млн голів, з яких свиноматок було 351,7 тис. голів. Це становить приблизно 7,1% від загальної кількості свиней (Бублик, 2023).

Станом на 1 січня 2024 року за Держстатистикою загальне поголів'я свиней становило 5,094 млн голів. На жаль, статистики щодо конкретної кількості свиноматок на цю дату наведено не було [<https://www.ukrstat.gov.ua/>]. Тому, будемо використовувати відсоток, вирахований за 2023 роком. Отже, кількість свиноматок, які потенційно можна імунізувати ВПЧ вакциною, становить:

$$5,094 \times 0,071 = 0,361674 \text{ млн} = 361\,674 \text{ голів свиноматок}$$

Проте, 40 мкг/дозу – це дозування для лабораторних мишей серії SPF Balb/c віком в 6 тижнів (42 доби) (Yang et al, 2021). За статистикою вага таких мишей становить від 11 до 20 г (середнє значення – 15,5 г) [<https://www.ozgene.com/mice-weights/>], в той час, як п'ятимісячне порося в середньо важить від 75 до 90 кг (середнє значення - 82,5 кг) [<https://ukr.media/garden/421343/>]. Тому, пропонується здійснити відповідний перерахунок на масу молодої свиноматки:

$$15,5 \text{ г} - 40 \text{ мкг}$$

$$82,5 \text{ кг} - x$$

$$\frac{82\,500 \times 40}{15,5} = 212\,903 \text{ мкг/дозу} \approx 213 \text{ мг/дозу}$$

Знаючи дозування (213 мг/доза), можемо визначити загальну потребу у ВПЧ:

$$213 \times 361\,674 = 77\,036\,562 \text{ мг} \approx 77,1 \text{ кг}$$

Оскільки запропонована вакцина є новою, а також за наявності конкуренції на ринку, пропонується забезпечувати лише 10% від заявленої кількості. Крім того, розрахунок ведеться по молодняку, який не є основною частиною поголів'я свиноматок:

$$77,1 \times 0,10 = 7,71 \text{ кг/рік}$$

Враховуючи відсотки на втрати при виділенні та очищенні, які складають близько 40% (Yang et al, 2021; Taylor et al, 2019; Carvalho et al, 2018), оскільки виробництво передбачає виготовлення вакцини, тоді річна потреба в ВПЧ становитиме:

$$\frac{7,71}{0,6} \approx 12,85 \text{ кг/рік}$$

Кількість культуральної рідини на рік становитиме (концентрація ВПЧ становить 2,5 г/л (Yang et al, 2021)):

$$\frac{12\,850}{2,5} = 5,14 \text{ м}^3$$

Припустимо, що кількість трудоднів нашого виробництва сягає близько 230 діб. Тоді, за одну добу кількість ВПЧ складе:

$$5,14/230 = 22,4 \text{ л}$$

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

$$V_{\text{крц}} = K_1 \cdot V_d \cdot T_{\text{цф}} / 24 = 1,1 \times 22,3 \times 55 / 24 \approx 56,2 \text{ л},$$

де $T_{\text{цф}}$ – цикл роботи ферментера, який включає: мийку та огляд – 1,5 год, перевірку на герметичність – 0,5 год, підігрів та стерилізацію апарату – 1,5 год, охолодження ферментеру – 1 год, завантаження поживного середовища – 1,5 год, засів культурою – 0,5 год, ферментацію – 48 год, та вивантаження – 0,5 год, і становить 55 годин. K_1 – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій ($K_1 = 1,1$).

За виробничий цикл отримують $V_{\text{кр}} = 56,2$ л культуральної рідини.

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

$$V_{\text{роб.1}} = V_{\text{кр}} / (1 - E_{\text{ф}}) = 56,2 / (1 - 0,1) = 62,4 \text{ л},$$

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

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері з робочим об'ємом $V_{\text{роб.1}} = 62,4$ л.

При вибраному коефіцієнті заповнення $K_{\text{зап}} = 0,6$ можливий геометричний об'єм ферментера $V_{\text{ф.1}} = 62,4 / 0,6 = 104$ л. Приймаємо найближчий за об'ємом ферментер $V_{\text{сф}} = 100$ л та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап.1}} = V_{\text{роб.1}} / V_{\text{сф}} = 62,4 / 100 = 0,62$$

Уточнений коефіцієнт дозволяється для ферментерів з аерацією.

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

$$V_{\text{пс1}} = V_{\text{роб.1}} / (1 + X_{\text{ф}}) = 62,4 / (1 + 0,1) = 56,73 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить:

$$V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб.1}} - V_{\text{пс1}} = 62,4 - 56,73 = 5,67 \text{ л}$$

Для одержання 5,67 л інокуляту в інокуляторі враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря (10%). Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу в інокуляторі становить:

$$V_{\text{роб.2}} = V_{\text{пм1}} / (1 - E_{\text{ф}}) = 5,67 / (1 - 0,1) \approx 6,3 \text{ л}$$

Можливий геометричний об'єм інокулятора $V_{\text{ін}} = 6,3 / 0,6 = 10,5 \text{ л}$. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний посівний апарат $V_{\text{сін}} = 10 \text{ л}$ та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап.2}} = V_{\text{роб.2}} / V_{\text{сін}} = 6,3 / 10 = 0,63$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у дозволених межах.

Кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{пс2}} = V_{\text{роб.2}} / (1 + X_{\text{ін}}) = 6,3 / (1 + 0,1) \approx 5,72 \text{ л}$$

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пс2}} = 6,3 - 5,72 = 0,58 \text{ л}$$

0,58 л посівного матеріалу ми можемо отримати використовуючи колби об'ємом 750 мл та коефіцієнтом заповнення $K_{\text{зк}} = 0,2$. Кількість колб становитиме:

$$N_{\text{колб}} = V_{\text{пм4}} / (V_{\text{колб}} \times K_{\text{зап}}) = 580 / (750 \times 0,2) \approx 4 \text{ шт.}$$

Таким чином, для одержання посівного матеріалу необхідно 4 колб.

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого культивування у ферментері об'ємом 100 л з коефіцієнтом заповнення 0,62 буде проходити у 2 етапи.

Узагальнена схема наших розрахунків наведена на рис.3.3.

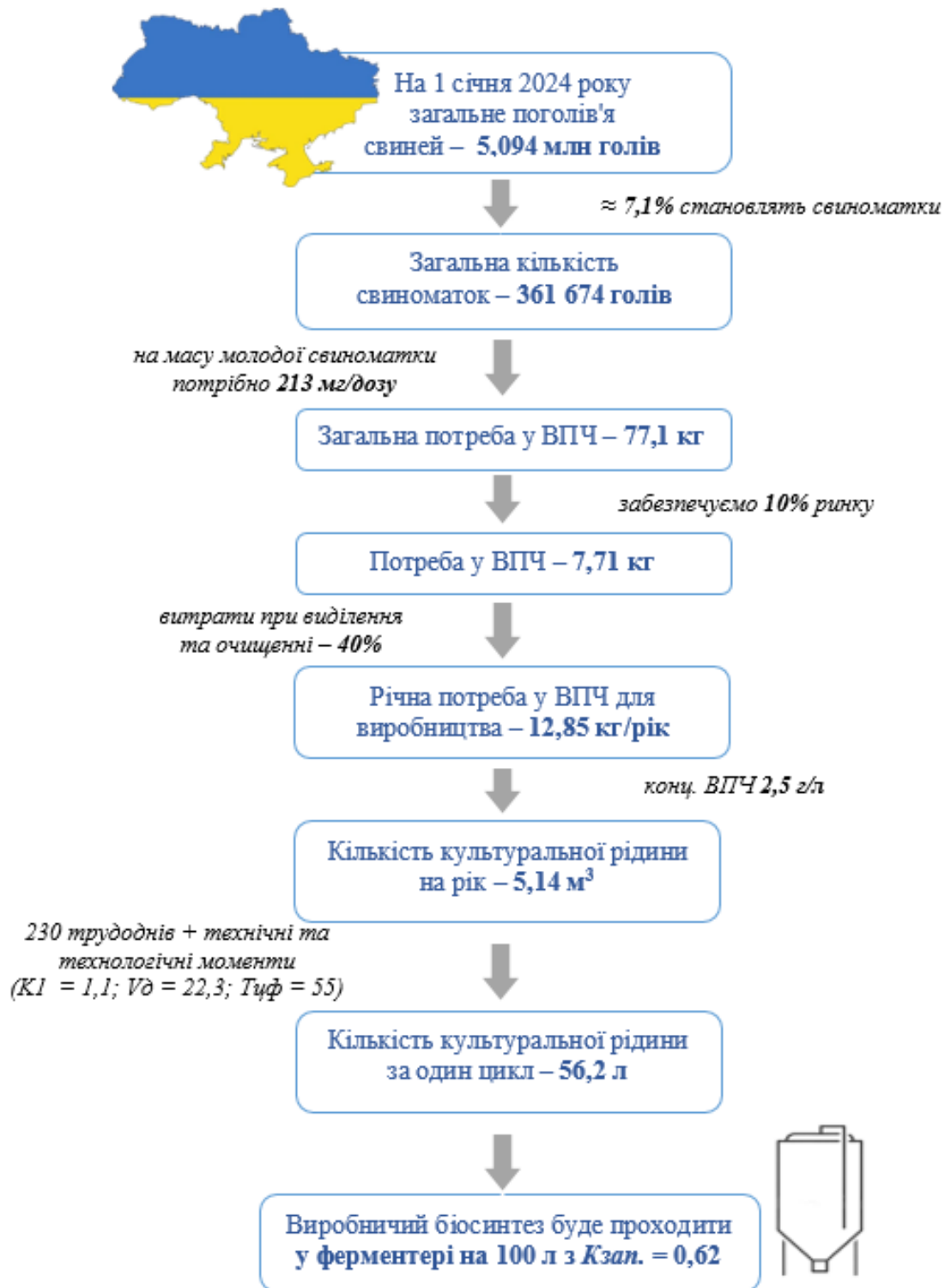


Рис.3.3. Узагальнена схема розрахунків техніко-економічного обґрунтування

РОЗДІЛ 4

ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ СТАДІЙ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ СУБСТАНЦІЇ ВІРУСПОДІБНИХ ЧАСТИНОК ПАРВОВІРУСУ СВИНЕЙ

4.1. Обґрунтування вибору післяферментаційних процесів отримання субстанції вірусподібних частинок парвовірусу свиней

Для одержання ВПЧ парвовірусу свиней передбачається високоступенева очистка, оскільки ця субстанція буде використовуватись в якості ветеринарної вакцини для свиноматок. Для обґрунтування стадій виділення та очищення пропонується звернути увагу на схему очистки ВПЧ саме з основної статті.

4.1.1. Обґрунтування стадії відокремлення дріжджових клітин від культуральної рідини

Після культивування дріжджів *K. marxianus*, у яких експресується вірусний білок VP2, перший крок полягає у відділенні клітинної біомаси від культурного середовища. Для цього застосовується центрифугування при 10 000 об/хв протягом 30 хв при температурі 4 °C (Yang et al, 2021).

Метою цього процесу є відділення клітинної біомаси, в якій знаходиться рекомбінантний білок VP2 у складі ВПЧ. Отримання супернатанту, який може містити незначну кількість білка, не передбачається, оскільки основна маса (понад 95% білка) знаходиться саме в клітинах дріжджів, через що надосад в подальшому передається на утилізацію (Yang et al, 2021).

Центрифугування – найпоширеніший метод для цієї мети у лабораторних та промислових умовах. Воно забезпечує високу швидкість та ефективність осадження клітин за допомогою сили відцентрового прискорення. Для *K. marxianus*, які мають порівняно велику клітинну масу, цей метод є особливо ефективним. Центрифугування дозволяє отримати компактний осад з мінімальною кількістю клітин у супернатанті, що сприяє кращій концентрації

					НУХТ БТЕК 02.01.12 КР ПЗ					
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата						
Розроб.		Онищенко А.А.			РОЗДІЛ 4 ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ СТАДІЙ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ СУБСТАНЦІЇ ВІРУСПОДІБНИХ ЧАСТИНОК ПАРВОВІРУСУ СВИНЕЙ					
Перевір.		Скороцька О.І.						Лім.	Арк.	Аркушів
Реценз.									58	158
Н. Контр.								Кафедра БТМ		
Затверд.		Стабніков В.П.								

біомаси для подальшої обробки (Карлаш, 2022).

Фільтрація (зокрема мікрофільтрація) використовується як альтернатива центрифугуванню, особливо у випадках, коли потрібно зменшити енергоспоживання або уникнути механічного навантаження на клітини. Однак дріжджі, зокрема *K. marxianus*, можуть швидко закупорювати пори фільтрувальних мембран, що ускладнює роботу і вимагає частого очищення або заміни фільтрів. До того ж, фільтрація менш ефективна при обробці великих об'ємів густої культуральної рідини (Карлаш, 2022).

Флокуляція – це метод, що передбачає додавання хімічних агентів для агрегації клітин у більші згустки, які потім легше осадити або відфільтрувати. Цей метод дешевий і широко застосовується у пивоварінні або біоетанольному виробництві. Проте, у випадку *K. marxianus*, флокуляція часто є недостатньо ефективною, оскільки ці дріжджі мають слабку природну здатність до агрегації. Крім того, хімічні флокулянти можуть ускладнити подальше очищення білка, забруднюючи зразок (Карлаш, 2022).

Осадження за допомогою полімерів або солей (наприклад, поліетиленгліколю чи сульфату амонію) іноді застосовується для прискорення осадження клітин, але цей метод частіше використовується для осадження білків, а не самих клітин. До того ж він не є оптимальним для біомаси дріжджів, оскільки додає сторонні хімічні речовини до зразка та може погіршити чистоту наступних етапів ізоляції (Карлаш, 2022).

Узагальнену інформацію для порівняння методів відокремлення клітин дріжджів показано в табл.4.1.

Порівняння методів відокремлення біомаси дріжджів

Метод	Принцип дії	Переваги	Недоліки	Джерело
Центрифугування	Відділення частинок за густиною	Швидко Масштабовано Зберігає білки	Висока енерговитратність Потребує спецобладнання	(Карлаш, 2022)
Мембранна фільтрація	Розділення клітин через пори	Дешева Проста у використанні	Може закупорюватися Менш ефективна при великому об'ємі	
Осадження PEG (поліетиленгліколь)	Осадження клітин полімером	Простота Не потребує дорогого обладнання	Довготривала Може впливати на білки/викликати агрегацію	
Флокуляція (наприклад, сіллю)	Використання реагентів для згущення клітин	Ефективно при великих об'ємах	Ризик домішок Не підходить для лабораторних масштабів	

Центрифугування є найбільш доцільним методом на цій стадії, оскільки забезпечує високу швидкість і ефективність осаження, дозволяє зберегти структурну цілісність клітин і чутливих до температури рекомбінантних білків, масштабується до промислових рівнів.

4.1.2. Обґрунтування стадії промивання біомаси дріжджів

Після збору дріжджової біомаси за допомогою центрифугування, наступним етапом є ретельне промивання осаду, щоб видалити залишки культурального середовища, зменшити кількість забруднюючих білків, пептидів, іонів та залишкових субстратів (наприклад, глюкози, що була в складі поживного середовища), підвищити чистоту майбутнього лізату для виділення вірусподібних частинок VP2 (Yang et al, 2021).

Мета промивання деіонізованою водою передбачає не тільки видалення залишків культурального середовища, а й уникнення введення зайвих іонів, що могли б конкурувати з ВПЧ за зв'язування з іонообмінними смолами. Також,

промивання деіонізованою водою передбачає створення контрольованого середовища, яке дозволяє надалі ресуспендувати клітини вже у строго заданому буфері (PBS для катіонного обміну або Tris-HCl для аніонного). Осмотичне зневоднення клітин частково підвищує ефективність механічного лізису (високим тиском), роблячи клітинні стінки більш чутливими, що є особливо важливим для подальшого лізису клітин (Yang et al, 2021).

Деіонізована вода забезпечує високу ступінь очищення клітинної поверхні без внесення фонових домішок. Зазвичай, у подібних біотехнологічних схемах використовують також альтернативні розчини, зокрема фосфатно-сольовий буфер (PBS) або буфер Tris-HCl, залежно від специфіки наступних операцій (Desai et al, 2008).

Застосування PBS запобігає осмотичному стресу, який може призводити до передчасного часткового лізису або втрати цілісності клітин. Іншою альтернативою є буфер Tris-HCl, який часто застосовують у протеїнових препаративних схемах, особливо коли подальше очищення здійснюється за допомогою аніон-обмінної хроматографії. Tris-HCl підтримує стабільний рН і має добру сумісність з аніонними смолами. Однак цей буфер містить аміногрупи, які можуть взаємодіяти з білками або смолами, викликаючи фонове зв'язування або неселективну конкуренцію за місця зв'язування. До того ж, як і PBS, Tris-базовані розчини є буферизованими і можуть залишатися на поверхні клітин після промивання, що потребує ретельного контролю. Варто зазначити, що PBS гарний буфер для катіонообмінного зв'язування, а Tris-HCl – для аніонної хроматографії. Внесення того чи іншого буферу для промивання буде напряду в подальшому впливати на зв'язування ВПЧ з супернатанту та осаду на колонки, що може призвести до непередбачуваних результатів (Desai et al, 2008; Yang et al, 2021).

Узагальнена інформація порівняння розчинів для промивання біомаси дріжджів показана в табл.4.2.

Порівняння різних розчинів для промивання біомаси дріжджів

Метод	Опис	Переваги	Недоліки	Джерело
Деіонізована вода	Промивання двічі чистою H ₂ O без солей	Максимальне усунення іонів; дешевий; сумісний із подальшою хроматографією	Може спричинити осмотичний стрес клітин (не критично для дріжджів)	(Desai et al, 2008)
PBS (фосфатно-сольовий буфер)	Ізотонічне середовище, що підтримує рН 7.4	Зберігає осмотичну стабільність клітин; можна одразу переходити до лізису	Залишки фосфатів/іонів можуть заважати при хроматографії	(Yang et al, 2021)
Tris-HCl буфер, рН 8,0	Підготовка до лізису й аніонної хроматографії	Добра сумісність з аніонними смолами; стабільний рН	Необхідне точне регулювання; не підходить для катіонного обміну	

Хоча буферні системи забезпечують стабільні фізіологічні умови для клітин, вони можуть бути небажаними на етапі попереднього очищення, коли важлива максимальна чистота й відсутність сторонніх іонів. Саме тому деіонізована вода є кращим вибором у випадку, коли подальша стратегія очищення передбачає тонке розділення за допомогою іонообмінної хроматографії. Вона не впливає на рН, не залишає слідів реагентів, не створює фонових домішок і не змінює структуру клітин, забезпечуючи ефективну підготовку до лізису.

Для відокремлення використаної води передбачається центрифугування, перевагу якого було наведено вище (див.п.4.1.1.). Оскільки саме цей метод був попередньо обрано для відокремлення біомаси, пропонується залишити його і для даної стадії. Кількість промивань згідно основної статті становить 2 цикли.

4.1.3. Обґрунтування стадії лізису дріжджових клітин для вивільнення вірусоподібних частинок парвовірусу свиней

Після того, як дріжджові клітини були промиті деіонізованою водою та повторно суспендовані у PBS рН 7,4, наступним критичним етапом є розрив

клітин для вивільнення внутрішньоклітинного білкового продукту – вірусподібних частинок VP2 (Yang et al, 2021).

У цьому процесі застосовано гомогенізацію під високим тиском (1500 бар, 4 °С, дворазовий цикл) за допомогою апарату JN-02C Homogenizer (Yang et al, 2021). Такий метод заснований на створенні сильного гідродинамічного зсуву, що виникає при протискуванні суспензії клітин через вузький канал під високим тиском. У результаті цього зсуву та миттєвого перепаду тиску відбувається механічний розрив клітинних оболонок, що особливо ефективно для дріжджів з жорсткою клітинною стінкою, як *K. marxianus* [https://sist.sathyabama.ac.in/sist_coursematerial/uploads/SBT1306.pdf].

Щодо буферу, що застосовується для ресуспендування клітин, як було раніше вказано (див.п.4.1.2.), PBS є гарним лізуючим агентом, через що зрозуміло саме його використання. Крім того, в основній статті порівнювали й інші розчини (ацетатний буфер та буфер на основі Tris-HCl), але вони не призводили до максимального розчинення білків ВПЧ. При цьому, буфер на основі Tris-HCl використовувався для вилучення нерозчинних залишків білків з лізованої біомаси. Хоча в статті немає чіткого пояснення, можна припустити, що це пов'язано зі зміною ізоелектричної точки за допомогою зрушення рН, а також через можливу агрегацію білків, що залишилися в осаді. Буфер на основі Tris-HCl в такому випадку буде м'яко діяти на білки ВПЧ, призводячи до мінімального їх пошкодження, а отже, до зменшення втрат цільового продукту. Також, варто зазначити, що за даними статті використання PBS для ресуспендування зруйнованої клітинної маси в гомогенізаторі потребує врівноваження рН до 4,0 для цієї суспензії, що буде обґрунтовано нижче (див.п.4.1.4.) (Yang et al, 2021).

Перевагою високотискової гомогенізації є високий вихід клітинного вмісту, включаючи цільові ВПЧ, при збереженні їхньої структурної цілісності, що надзвичайно важливо для продуктів, призначених для використання у вакцинах або діагностиці. Проведення процесу при низькій температурі (4 °С) запобігає тепловій денатурації білків, а повторне гомогенізування (двічі)

забезпечує повноцінний лізис без надмірного руйнування чи фрагментації [https://sist.sathyabama.ac.in/sist_coursematerial/uploads/SBT1306.pdf].

У промисловій біотехнології існує декілька підходів до лізису клітин, кожен з яких має свої сильні та слабкі сторони. Основними альтернативами до гомогенізації під тиском є [https://sist.sathyabama.ac.in/sist_coursematerial/uploads/SBT1306.pdf].

1. Фізичні методи:

Сонікація (ультразвук) – ефективна для бактерій і дрібних клітин, але мало підходить для дріжджів, оскільки їхня клітинна стінка є значно міцнішою. До того ж, цей метод часто призводить до локального нагрівання і може спричиняти денатурацію чутливих білків.

Механічне подрібнення (наприклад, з використанням скляних кульок) – використовується для дріжджів, але ефективність сильно залежить від масштабу та рівномірності впливу. Трудомісткий при масштабуванні.

2. Хімічні методи:

Лізис буферами з детергентами (SDS, Triton X-100) або осмотичне шокування – часто застосовуються для м'яких клітин, однак залишки реагентів у лізаті можуть негативно впливати на подальше очищення, зокрема на іонообмінну хроматографію та ультрафільтрацію.

Ензиматичний лізис (наприклад, за допомогою лізоциму чи зімолази) – дозволяє акуратно виділяти білки, але надзвичайно дорогий при масштабуванні, а також потребує додаткових стадій очищення ферментів із кінцевого продукту.

У табл. 4.3 наведено узагальнене порівняння методів руйнування дріжджових клітин з метою вивільнення ВПЧ.

У контексті виділення вірусподібних частинок із *K. marxianus*, гомогенізація високим тиском є найоптимальнішим методом. Вона забезпечує ефективний розрив дріжджових клітин, збереження структури ВПЧ, мінімізацію додаткових домішок у лізаті, можливість масштабування без втрати якості продукту.

Порівняння методів руйнування дріжджових клітин

Метод лізису	Переваги	Недоліки	Джерело
Гомогенізація під високим тиском	Висока ефективність розриву клітин Підходить для дріжджів Збереження структури ВПЧ Легко масштабувати Мінімальні залишкові домішки	Висока вартість обладнання Потребує охолодження під час процесу	[https://sist.sathyabama.ac.in/sist_coursematerial/uploads/SBT1306.pdf]
Сонікація (ультразвук)	Добре підходить для бактерій та дрібних клітин Просте лабораторне обладнання	Недостатньо ефективна для дріжджів Генерація тепла може денатурувати білки	
Механічне подрібнення (з кульками)	Висока ефективність для дріжджів Простота реалізації у лабораторії	Низька відтворюваність Складне масштабування Високий рівень забруднення з абразивних матеріалів	
Хімічний лізис (детергенти)	Швидко й ефективно для чутливих клітин Простота в реалізації	Залишки реагентів у лізаті Несумісність з подальшою хроматографією	
Ензиматичний лізис	М'який вплив на білки Може бути високоселективним	Висока вартість ферментів Складність очищення продукту від ферменту Повільний процес	

4.1.4. Обґрунтування коригування рН для вивільнення більшої кількості вірусподібних частинок парвовірусу свиней

Після руйнування клітин *K. marxianus* високотисковою гомогенізацією утворюється складна суміш клітинного вмісту: білки, нуклеїнові кислоти, клітинні фрагменти, залишки стінок та ВПЧ. Щоб попередньо зменшити

кількість домішок і зосередити ВПЧ у розчині або осаді – лізат піддають регулюванню рН. У цьому випадку (Yang et al, 2021):

При використанні катіонного обміну – рН регулюють до 4,0, додаючи оцтову кислоту.

При подальшій роботі з аніонною хроматографією – лізати (зруйновану біомасу) розчиняють у 20 мМ Tris-HCl, рН 8,0, як це було згадано вище.

Зниження або підвищення рН сприяє (Ahlström et al, 2022): осадженню деяких білків за ізоелектричним принципом (при наближенні рН до їхнього рI); змінам розчинності ВПЧ – частина може залишатися в надосадовій рідині, частина – осідати; фракціонуванню білкових та небілкових домішок.

Після цього проводиться центрифугування (10 000 об/хв, 4°C, 30 хв) для розділення фракцій (Yang et al, 2021): надосадова рідина – багата на ВПЧ, які залишилися у розчині; осад – також може містити ВПЧ, тому його переробляють повторно в буфері рН 8,0 (як це було вказано вище) для вилучення залишкової кількості ВПЧ на аніонних смолах.

Зазначений метод базується на зміні розчинності білків і частинок у залежності від рН середовища. Наприклад, зниження рН до 4,0 у середовищі PBS призводить до осадження більшості ендогенних білків дріжджів, які мають ізоелектричну точку в діапазоні 4 – 6. Водночас вірусподібні частинки парвовірусу, завдяки своїй специфічній будові, можуть залишатися в розчині або, залежно від умов, частково випадати в осад – тому осад також переробляють повторно (Ahlström et al, 2022).

Цей підхід вирізняється простотою, низькою вартістю та можливістю масштабування без складного обладнання. Втім, він не забезпечує високої селективності, і частина ВПЧ може бути втрачена разом з іншими білками, якщо умови не оптимізовані (Ahlström et al, 2022).

На відміну від цього, методи осадження солями, наприклад, з використанням сульфату амонію, мають давню історію в протеоміці та вірусології. Вони дозволяють концентрувати білки з високим виходом, однак вимагають подальшого діалізу чи діафільтрації, оскільки сіль у високих

концентраціях заважає подальшим етапам очищення. Крім того, сульфат амонію може спричиняти часткову агрегацію або денатурацію ВПЧ, що знижує біологічну активність частинок (Moore, & Kery, 2009).

Ще один підхід – ультрафільтрація, яка дозволяє розділити компоненти за розміром. Зазвичай цей метод використовують на пізніших етапах, але в деяких випадках він може застосовуватись одразу після гомогенізації. Основна перевага – відсутність хімічних домішок у продукті, але недолік – низька селективність за зарядом та потреба в мембранах певного молекулярного порогу. Це робить метод менш придатним для фракціонування складного білкового лізату (Dhineshkumar, & Ramasamy, 2017).

Теплова денатурація також іноді застосовується з метою видалення ферментів або білків-інгібіторів, але вона несе ризик порушення структурної цілісності ВПЧ, оскільки вірусоподібні частинки часто чутливі до нагрівання. Це особливо критично для парвовірусів, чия капсидна оболонка може втратити форму вже при температурі вище 45 – 50°C (Zhang, Zhou, Zhang, & Zhou, 2021; Yang et al, 2021).

Останній з поширених методів – осадження поліетиленгліколем (PEG). Це ефективна стратегія концентрування вірусоподібних частинок, особливо у виробництві вакцин, однак вона має кілька недоліків: залишки PEG можуть накопичуватись у зразку та ускладнювати подальшу хроматографію або аналітику. Крім того, PEG не завжди дозволяє селективно виділити тільки ВПЧ, тож потрібна ретельна оптимізація (Pons, & Jungbauer, 2025).

У табл.4.4 показано порівняння вищевказаних методів для відокремлення ВПЧ.

**Порівняння з альтернативними підходами до фракціонування білків
перед основною очисткою**

Метод	Переваги	Недоліки	Джерело
Регулювання рН + центрифугування	Простий та дешевий Дає початкове розділення білків Підвищує ефективність наступної хроматографії	Може втрачатися частина ВПЧ при осадженні Не є високоселективним методом	(Ahlström et al, 2022)
Осадження солями (наприклад, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)	Ефективне концентрування білків Дешево та доступно	Вимагає подальшого діалізу або діяфільтрації Може призводити до агрегації ВПЧ	(Moore, & Kery, 2009)
Ультрафільтрація перед хроматографією	Концентрування ВПЧ Видалення низькомолекулярних домішок	Потребує мембран, не селективне за зарядом Не розділяє білки між собою	(Dhineshkumar, & Ramasamy, 2017)
Теплова денатурація домішок	Дешево Частина ферментів-інгібіторів денатурується	Може денатурувати ВПЧ або знизити їхню біологічну активність	(Zhang, Zhou, Zhang, & Zhou, 2021)
Преципітація поліетиленгліколем (PEG)	Висока ефективність концентрування ВПЧ Часто застосовується у вірусології	Може залишати PEG як забруднювач Не повністю селективна для ВПЧ	(Pons, & Jungbauer, 2025)

Отже, у контексті виділення ВПЧ парвовірусу свиней з дріжджових клітин *K. marxianus*, регулювання рН із подальшим центрифугуванням є оптимальним стартовим методом фракціонування, оскільки поєднує простоту, дешевизну та достатню ефективність для попередньої очистки. Він може бути успішно скомбінований з подальшими більш селективними підходами, як-от іонообмінна або гель-фільтраційна хроматографія.

4.1.5. Обґрунтування основної стадії очищення вірусоподібних частинок парвовірусу свиней

Іонообмінна хроматографія ґрунтується на взаємодії заряджених молекул із зарядженими функціональними групами на поверхні хроматографічного носія. У випадку ВПЧ, які складаються з білків, можна керувати зарядом їх поверхні,

змінюючи рН буферного розчину. Відтак можна обрати оптимальний тип смоли: катіон-обмінну (негативно заряджену, притягує позитивно заряджені білки) або аніон-обмінну (позитивно заряджену, зв'язує негативно заряджені білки) (Yang et al, 2021).

У цьому процесі було використано (Yang et al, 2021): Capto S ImpAct – сильна катіон-обмінна смола (для ВПЧ у PBS, рН 4,0); Capto Q XP – сильна аніон-обмінна смола (для повторної обробки осаду у Tris-HCl, рН 8,0).

Як було наведено раніше, поверхневий заряд ВПЧ змінюється залежно від рН: при рН 4,0 більшість сторонніх білків із дріжджових клітин осаджується, або не зв'язується з катіонною смолою, тоді як ВПЧ мають позитивний заряд і можуть бути зв'язані (Yang et al, 2021).

Для максимального відновлення ВПЧ, осад також обробляли повторно у буфері Tris-HCl (рН 8,0), і ВПЧ, які не вилучились при першому проходженні, могли зв'язатись уже з аніонною смолою Capto Q XP (Yang et al, 2021).

Гідрофобна хроматографія (ГХ) базується на взаємодії між гідрофобними ділянками білків і гідрофобними групами смоли. Для ВПЧ це може бути застосовано, але зазвичай менш специфічно – капсидні білки мають складну поверхневу структуру, де гідрофобні області не завжди доступні. Крім того, ГХ потребує високих концентрацій солей, що знову ж може призвести до часткової агрегації частинок (Queiroz, Tomaz, & Cabral, 2001).

Афінна хроматографія (наприклад, His-tag або антитіла) – дуже селективний і ефективний метод, але потребує або рекомбінантного тегування білків (що не завжди бажано з точки зору вакцинної чистоти або імуногенності), або дорогих афінних лігандів, як от антитіла проти капсидного білка VP2. Цей метод частіше використовується у лабораторних умовах або для аналітики, ніж для виробничого масштабу (Randolph, 2012).

Селективне осадження (наприклад, PEG) – може використовуватись для попереднього концентрування, але не забезпечує достатньої селективності. Крім того, поліетиленгліколь може залишати залишки у фракції, які заважають подальшій аналітиці чи знижують якість ВПЧ (Pons, & Jungbauer, 2025).

Селективна фільтрація (ультрафільтрація) – дає можливість розділити компоненти за розміром, але не зарядом. У випадку ВПЧ, розмірна селекція недостатня – сторонні білки можуть мати подібні габарити (Dhineshkumar, & Ramasamy, 2017).

Узагальнена інформація щодо очистки ВПЧ продемонстровано в табл.4.5.

Таблиця 4.5

Порівняння методів очистки ВПЧ

Метод очищення	Принцип розділення	Переваги	Недоліки	Джерело
Іонообмінна хроматографія (ІХ)	Розділення за зарядом молекул	Висока роздільна здатність Масштабованість Економічно доцільна Можна використовувати послідовно катіонну та аніонну смоли	Чутлива до рН і іонної сили Потребує точного підбору умов для ВПЧ	(Yang et al, 2021)
Гідрофобна хроматографія (ГХ)	Розділення за гідрофобністю білків	М'які умови для білків Добре працює у комбінації з ІХ Може видаляти білкові домішки	Низька селективність Висока іонна сила в елюювальному буфері може шкодити ВПЧ	(Queiroz, Tomaz, & Cabral, 2001)
Афінна хроматографія (His-tag, антитіла)	Специфічна взаємодія ліганд-білок	Висока селективність Дуже чисті фракції Високий ступінь очищення за один крок	Потребує специфічних міток або антитіл Дорого Можлива контамінація лігандом	(Randolph, 2012)
Селективне осадження (PEG, сіль)	Розділення за розчинністю	Простий і недорогий метод Добре підходить для концентрування	Низька селективність Ризик агрегації ВПЧ Можливе забруднення реагентами	(Pons, & Jungbauer, 2025)
Селективна фільтрація/ Ультрафільтрація	Розділення за розміром молекул	Добре концентрує ВПЧ Може видалити дрібні білки та солі Сумісна з діалізацією	Не відділяє білки подібного розміру Може не усунути хостові білки або нуклеїнові кислоти	(Dhineshkumar, & Ramasamy, 2017)

Іонообмінна хроматографія (особливо у комбінації з регуляцією рН та двома типами смол) надає оптимальний баланс між селективністю, виходом та економічністю, що робить її ключовим етапом у протоколі очищення ВПЧ з дріжджових клітин.

4.1.6. Обґрунтування стадії додаткового очищення вірусоподібних частинок парвовірусу свиней

Після двоетапного іонообмінного очищення (супернатант на Capto S ImpAct та оброблений лізат на Capto Q XR), отримані фракції містять вже збагачені вірусоподібні частинки, однак все ще можуть містити залишкові солі, буфери, низькомолекулярні домішки, а також фрагменти білків або нуклеїнових кислот. Для очищення та концентрації ВПЧ з супернатанту зруйнованих клітин застосовується діафільтрація (Yang et al, 2021).

Використовується установка ÄKTA flux (GE Healthcare) з колонкою Sephacryl S-500 HR. Розмір пор мембрани становив 750 кДа, що дозволяє затримувати великі комплекси (як ВПЧ, які мають розміри 20 – 30 нм), але пропускати (Yang et al, 2021): буферні компоненти (Tris, NaCl), залишки лізисних агентів, дрібні білки і нуклеїнові кислоти.

Також використовувався 10 об'ємів PBS, для вилучення (елюювання) ВПЧ з діафільтраційної установки. Буфер стабілізує білок, що дозволяє його очищати в менш жорстких умовах, що призводить до менших втрат цільового продукту (Yang et al, 2021).

Діафільтрація обрана на цьому етапі з таких причин [<https://www.creative-proteomics.com/resource/diafiltration-in-protein-purification.htm>]: концентрація з одночасною буферною заміною дозволяє підготувати ВПЧ для подальшої гель-фільтрації або аналітичних досліджень; на відміну від деяких осаджувальних методів або екстракції, фільтрація не руйнує капсид, тобто структура ВПЧ зберігається; ефективне видалення низькомолекулярних домішок, зокрема солей, які могли залишитися після ІХ; забезпечується швидкість і масштабованість, так як установка ÄKTA дозволяє працювати як з аналітичними, так і з підготовчими об'ємами.

На відміну від цього методу, осадження поліетиленгліколем (PEG), хоча й використовується для концентрування вірусних частинок, має низьку селективність, часто супроводжується ко-преципітацією домішок і може викликати агрегацію або денатурацію ВПЧ. Крім того, його важко контролювати для отримання високої відтворюваності в промислових масштабах (Pons, & Jungbauer, 2025).

Ще один класичний метод – центрифугування у градієнті щільності (наприклад, сахарози або CsCl) – дозволяє розділяти частинки за розміром і щільністю, однак є повільним, потребує ультрацентрифуг, складно масштабується, а високі концентрації солей (як CsCl) можуть порушити цілісність ВПЧ, зокрема їхніх поверхневих білків. Такий підхід часто застосовується для лабораторних масштабів, але не рекомендований для виробництва препаратів (Choi, & Barrientos, 2020; Nasukawa et al, 2017).

Також можливий пасивний діаліз, який полягає у використанні напівпроникної мембрани та дифузійного обміну буфера. Цей процес, хоча і простий, є надзвичайно повільним і не забезпечує достатнього видалення домішок у випадку складних матриць, як лізати дріжджів (Obermeyer, & Olsen, 2015).

Поширеним у лабораторних умовах є також центрифугування з використанням конусів ультрафільтрації (Vivaspin, Amicon), проте цей метод не підходить для масштабного виробництва через низьку продуктивність і підвищений ризик агрегації білків при високих концентраціях (Johnsen et al, 2016).

У табл.4.6 показано порівняння різних методик щодо відокремлення менших частинок від ВПЧ.

Порівняння методів відокремлення низкомолекулярних часток від ВПЧ

Метод	Принцип	Переваги	Недоліки	Джерело
Мембранна діяфільтрація	Фільтрація під тиском через мембрану (750 кДа)	Висока продуктивність Стерильні умови Збереження структури ВПЧ	Ризик зворотного тиску при забрудненні мембрани	(Yang et al, 2021)
Центрифугування з ультрафільтраційними конусами (Amicon, Vivaspin)	Розділення за молекулярною масою в індивідуальних пробірках	Простота Низька вартість	Низька масштабованість Тривалий час Можлива агрегація ВПЧ	(Johnsen et al, 2016)
Ультра центрифугування з градієнтом сахарози або CsCl	Розділення за щільністю та розміром	Висока точність Можна відокремити пусті капсиди	Складне масштабування, може порушити структуру, тривалість процесу	(Choi, & Barrientos, 2020)
Осадження поліетиленгліколем (PEG)	Осадження білків полімером	Швидко Дешево Концентрація зразка	Низька селективність Можлива ко-преципітація домішок, структурні порушення	(Pons, & Jungbauer, 2025)

Таким чином, мембранна діяфільтрація за допомогою АКТА flux забезпечує оптимальний баланс між ефективністю, селективністю, стерильністю та масштабованістю процесу очищення. Саме тому її було обрано як найкращий варіант для очищення ВПЧ у процесі, який базується на дріжджах *K. marxianus*.

Після катіонної хроматографії ВПЧ також піддаються остаточному очищенню шляхом розділення за розміром. Методики для ВПЧ можуть відрізнятися через різницю рН елюентів, що може призводити до непередбачуваних реакцій, через що автори використовували 2 різні методи. На цій стадії використовують колонку Sephacryl S-500 HR, яка має фракційний

діапазон для глобулярних білків до 20 МДа, що дозволяє чітко відділити вірусподібні частинки (~25 – 28 нм) від агрегованих форм, білкових домішок, димерів або нуклеїнових кислот (Yang et al, 2021).

Колонка підключається до хроматографічної системи ÄKTA Purifier, і пробу (близько 4 мл концентрату) елюють фізіологічним буфером (PBS) зі швидкістю 0.5 мл/хв. Ця м'яка хроматографічна методика дозволяє зберегти нативну структуру ВПЧ, зокрема їхній білковий зовнішній шар, що критично важливо для подальшого використання у вакцинах або діагностикумах (Yang et al, 2021).

Гель-фільтрація (SEC) була обрана з кількох причин (Yang et al, 2021):

1. Принцип дії SEC базується виключно на розмірі частинок. Це дозволяє ефективно розділити цільові вірусоподібні частинки (~25 нм) від білкових домішок, димерів VP2 або їх агрегатів, залишкових ДНК/РНК фрагментів.

2. М'які умови елюції – на відміну від афінних методів, ГХ чи градієнтного центрифугування, SEC працює в фізіологічному буфері (PBS) без різких змін рН, іонної сили або підвищення тиску. Це надзвичайно важливо для збереження сферичної структури ВПЧ, яка є ключовою для їхньої імуногенності (Yang et al, 2021).

Висока селективність саме на фінальному етапі. SEC не може бути використана як перший крок через обмеження об'ємів та пропускної здатності, проте як завершальна стадія – ідеальний вибір: після попереднього концентрування та часткового очищення вона дозволяє отримати максимальну чистоту препарату (Yang et al, 2021).

Ультрацентрифугування у градієнті щільності незважаючи на історично успішне застосування для вірусів, надто жорстке середовище (висока щільність середовища, високе прискорення), що може призвести до часткового пошкодження оболонки ВПЧ. Крім того, важко масштабувати в промислових умовах – обладнання дороге, цикл тривалий, підвищений ризик забруднення (Nasukawa et al, 2017).

Гідрофобна хроматографія – може бути використана для видалення білкових домішок, але високі концентрації солей у буфері викликають агрегацію ВПЧ, що погіршує вихід і активність. Після ГХ майже завжди потрібна буферообмінна стадія (Queiroz, Tomaz, & Cabral, 2001).

Афінна хроматографія – потребує специфічного ліганду (наприклад, антитіла проти VP2), що значно ускладнює та здорожчує процес. Є ризик зв'язування неспецифічних домішок, якщо ліганд недостатньо селективний (Randolph, 2012).

У табл.4.7 показано узагальнене порівняння вищенаведених методів.

Таблиця 4.7

Порівняння методик для полірування ВПЧ

Метод очищення	Принцип дії	Переваги	Недоліки	Джерело
SEC (гель-фільтрація)	Розділення за розміром (гідродинамічним)	М'які умови (PBS, низький тиск) Добре відокремлює агрегати Висока чистота	Низька пропускна здатність Не ефективна як первинний метод	(Yang et al, 2021)
Ультрацентрифугування в градієнті	Розділення за щільністю	Висока роздільна здатність Добре підходить для аналітичних задач	Трудомісткий Низька масштабованість Ризик пошкодження ВПЧ	(Nasukawa et al, 2017)
Гідрофобна хроматографія	Взаємодія гідрофобних ділянок білка	Може видаляти білкові домішки Простий у використанні	Використання високих солей Ризик агрегації ВПЧ	(Queiroz, Tomaz, & Cabral, 2001)
Афінна хроматографія	Специфічне зв'язування з лігандом	Дуже висока селективність Висока ефективність	Дорого Потребує специфічного ліганду Ризик неспецифіки	(Randolph, 2012)

Найкращий вибір для полірування ВПЧ у біофармацевтиці – гель-фільтрація, оскільки він забезпечує і високу чистоту, і збереження структури вірусподібних частинок без впливу на їхню імуногенність чи стабільність.

Оскільки обидва елюенти наносяться на фільтраційні установки, а потім відокремлюються за допомогою PBS, їх рН зрушується до нейтрального, що дозволяє об'єднати одержані зразки в один.

4.1.7. Обґрунтування стадії сушіння вірусоподібних частинок парвовірусу свиней

Сушіння вірусоподібних частинок – є критично важливою для забезпечення стабільності, зручності транспортування та довготривалого зберігання біопродукту.

Після полірувального очищення ВПЧ зазвичай зберігаються в рідкій формі. Проте така форма є нестабільною, особливо за кімнатної температури, і вимагає постійного охолодження, що ускладнює логістику (Yang et al, 2021). Щоб уникнути денатурації, агрегації або втрати біологічної активності при тривалому зберіганні, застосовують сушіння.

Основні цілі сушіння ВПЧ (Ahmed et al, 2013): підвищення стабільності – у висушеній формі ВПЧ менш схильні до гідролізу, окиснення чи бактеріального забруднення; полегшення транспортування та зберігання – продукт не потребує охолодження, зменшується об'єм та маса; можливість інкапсуляції або створення фармацевтичної форми – ліофілізат легко перетворити на порошок для ін'єкцій або інші лікарські форми (таблетки, капсули тощо).

У випадку з ВПЧ парвовірусу свиней, структура є складною та делікатною – вона нагадує капсид вірусу, і навіть часткове порушення її тривимірної організації може повністю нівелювати імуногенність. Саме тому найбільш доцільним є ліофільне сушіння, яке забезпечує мінімальну втрату біоактивності (López-Astacio, Adu, Lee, Hafenstein, & Parrish, 2023).

Розпилювальне сушіння зазвичай використовується для термостабільніших продуктів. Однак для ВПЧ цей метод менш придатний через високу температуру, яка виникає в процесі випаровування. Частинки білка

можуть денатуруватися або агрегувати. Деякі ВПЧ можна сушити таким чином за наявності ефективних стабілізаторів, але ризик втрати активності залишається високим. Метод є швидким і підходить для промислових масштабів, проте не є ідеальним для чутливих білкових структур (Ameri, & Maa, 2006).

Вакуумне сушіння передбачає видалення води під зниженим тиском, але без фази заморожування. Він менш агресивний, ніж розпилювальне сушіння, і може використовуватись для продуктів, які не потребують тривалого зберігання. Проте на відміну від ліофілізації, він не забезпечує такого ж рівня структурної стабільності, особливо для ВПЧ, які можуть бути чутливими до залишкової вологи або деформації білкової оболонки. Також не всі стабілізатори працюють однаково ефективно в умовах такого сушіння (Osanió et al, 2024).

У табл.4.8 показане узагальнене порівняння методів сушіння ВПЧ.

Таблиця 4.8

Порівняння методів сушіння ВПЧ

Метод сушіння	Принцип	Переваги	Недоліки	Джерело
Ліофілізація	Заморожений зразок сушиться шляхом сублімації льоду у вакуумі	Зберігає білкову структуру та активність Довгий термін зберігання	Дорогий та тривалий процес	(López-Astacio, Adu, Lee, Hafenstein, & Parrish, 2023)
Вакуумне сушіння	Вода випаровується при зниженому тиску та температурі	Менш затратний, ніж ліофілізація Добре підходить для термочутливих речовин	Може частково змінити структуру білків Менш ефективно консервування	(Ameri, & Maa, 2006)
Розпилювальне сушіння	Розчин розпилюється у гарячому повітрі, волога швидко випаровується	Швидкий процес Промислово масштабований	Висока температура може денатурувати білки Можливі втрати біоактивності Великі втрати	(Osanió et al, 2024)

На основі даних з основної статті ми одержуємо розчин ВПЧ, базований на PBS. Таку субстанцію можна використовувати для виробництва вакцин, проте не дуже довго, оскільки рідка форма не може забезпечити стабільність препарату на тривалий термін, тож варто розглянути стадію, сушіння.

Ліофілізація – це процес, що включає заморожування продукту, а потім видалення води шляхом сублімації під зниженим тиском. Цей метод уникає впливу високої температури, яка є критичною для тендітних білкових структур, та дозволяє включення стабілізаторів, які фізично захищають ВПЧ під час переходу в тверду фазу, у зв'язку з чим, пропонується обрати саме ліофілізацію як основний метод сушіння ВПЧ.

Тож, узагальнена схема виділення та очищення показана на рис.4.1 (див. наступну сторінку).

4.2. Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях

Вихідні дані:

1. Об'єм культуральної рідини з однієї ферментації ($V_{кр}$) = 56,2 л;
2. Концентрація вологої біомаси *K. marxianus* KM-PCV2 в культуральній рідині ($C_{біом}$) = 120 г/л (в статті наведено що така концентрація відповідає АБС, але з теоретичного розрахунку за азотом такої кількості біомаси вийти не може; за одержаними результатами при вологості біомаси в 80% його кількість складає близько 106 г/л (саме вологої біомаси), оскільки цей показник близький до значення, що вказано в статті, приймаємо, що автори могли помилитися і залишаємо 120 г/л вологої біомаси);
3. Концентрація ВПЧ в культуральній рідині ($C_{ВПЧ}$) = 2,5 г/л;
4. Втрати на стадіях виділення і очищення = 40 %;

Теоретична кількість ВПЧ, яку можна отримати із 56,2 л культуральної рідини становить: $2,5 \times 56,2 \approx 140,5$ г. Враховуючи 40% втрат на виділення і очищення ВПЧ з культуральної рідини, отримаємо $140,5 \times 0,6 = 84,5$ г ВПЧ. Розподіл втрат по усім стадіям виділення і очищення наведено в таблиці 4.9.

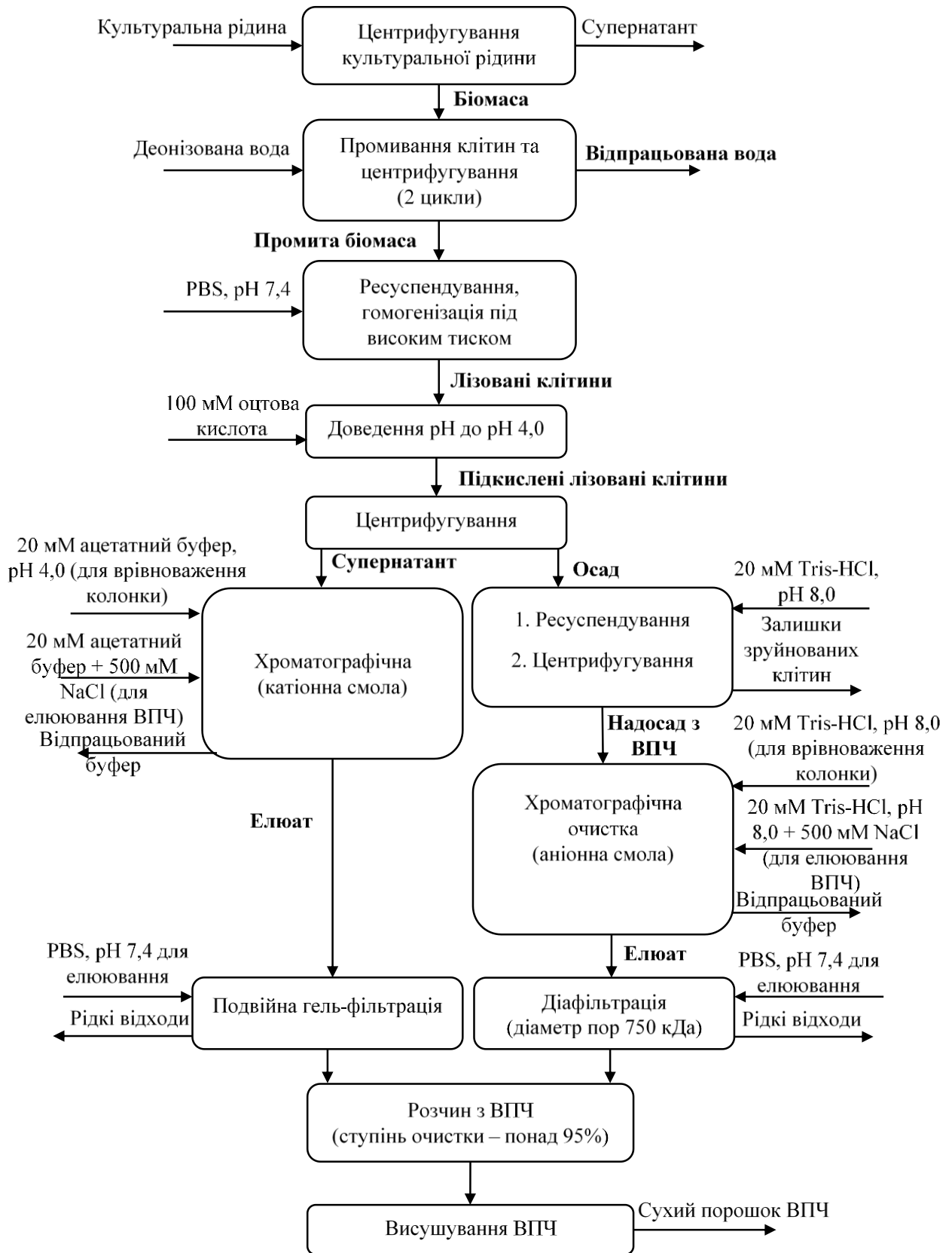


Рис.4.1. Узагальнена схема виділення та очищення ВПЧ (VP2) парвовірусу свиней

**Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних
потоків по стадіям**

№ п/п	Назва стадії (операції)	Матеріальні потоки на стадії	Кількість по стадіям			Необхідне обладнання
			Надійшло	Втрати (разом 40 %)	Вийшло	
1	2	3	4	5	6	7
ТП 2 Зберігання культуральної рідини						
1	ТП 2 Зберігання культуральної рідини	Культуральна рідина	56,2 л	-	56,2 л	Збірник культуральної рідини об'ємом 80 л
ТП 3 Центрифугування						
2	ТП 3 Центрифугува ння	Культуральна рідина	56,2 л	-	-	Центрифуга проточного типу продуктивніс тю 100 л/год
		Біомаса	6,75 кг АСБ (120×56,2), з врахування м вологості 60% = 16,87 кг	2,5%	≈ 16,5 кг	До реактора на 80 л
		Супернатант	-	-	≈ 39,33 л	На утилізацію
ТП 4 Промивання біомаси						
ТП 4.1. Ресуспендування біомаси дріжджів в деіонізованій воді						
3	ТП 4.1. Ресуспендуван ня біомаси дріжджів в деіонізованій воді	Біомаса	16,5 кг	-	-	Реактор на 80 л
		Деіонізована вода (двічі по 40 л)	80 л	-	-	
		Ресуспендова на біомаса	-	-	86,5 кг	
ТП 4.2. Центрифугування ресуспендованої біомаси						
4	ТП 4.2. Центрифугува ння ресуспендова ної біомаси	Ресуспендова на біомаса	86,5 кг			Проточна центрифуга продуктивніс тю 100 л/год
		Відпрацьована вода	-	-	80 л	На утилізацію
		Промита біомаса	-	5% (≈ 0,82 кг)	15,68 кг	До реактора на 80 л

ТП 5 Ресуспендування біомаси						
5	ТП 5 Ресуспендування біомаси	Промита біомаса	15,68 кг	-	-	Реактор на 80 л
		PBS, рН 7,4	40 л	-	-	
		Ресуспендована біомаса	-	-	55,68 л	До промислового гомогенізатору на 60 л продуктивність до 25 л/год
ТП 6 Руйнування дріжджових клітин						
6	ТП 6 Руйнування дріжджових клітин	Ресуспендована біомаса	55,68 л	-	-	Промисловий гомогенізатор на 60 л
		Гомогенізатор	-	2,5 % (1,39 л)	≈54,29 л	До реактору об'ємом 80 л
ТП 7 Підкислення						
7	ТП 7 Підкислення	Гомогенізатор	54,29 л	-	-	В реакторі об'ємом 80 л
		100 мМ оцтова кислота	1,4 л	-	-	
		Підкислений гомогенізатор	-	-	55,69 л	До центрифуги проточного типу продуктивністю 100 л/год
ТП 8 Центрифугування						
8	ТП 8 Центрифугування	Підкислений гомогенізатор	55,69 л	-	-	В центрифугі проточного типу продуктивністю 100 л/год
		Супернатант	41,4-0,67 (половина з минулої стадії)=40,73 л	2,5% (1,02 л)	≈39,71 л	До реактора об'ємом 50 л
		Осад	15,68-0,67 (половина з минулої стадії)=15,01 кг	2,5% (0,38 кг)	≈14,63 кг	До реактора об'ємом 50 л

ТП 9 Виділення та очищення вірусоподібних частинок (ВПЧ)						
ТП 9.1 Виділення та очищення ВПЧ VP2 з супернатанту						
ТП 9.1.1 Хроматографічне виділення ВПЧ VP2						
9	ТП 9.1.1 Хроматографічне виділення ВПЧ VP2	Супернатант (містить на цій стадії близько 80,81 г ВПЧ, з врахуванням що 2/3 перейшло до супернатанту)	39,71 л	-	-	З реактору об'ємом 50 л до промислової іонообмінної колонки об'ємом завантаження 3 л
		20 мМ ацетатний буфер, рН 4,0 (для врівноваження колонки)	20 л	-	-	Промислова іонообмінна колонка об'ємом завантаження 3 л
		20 мМ ацетатний буфер+500 мМ NaCl (для елюції)	20 л	-	-	
		Катіонообмінна смола Capto S ImpAct	2 л	-	-	
		Відпрацьований супернатант	-	-	≈39,7 л	На знешкодження відходів
		Відпрацьований буфер для врівноваження	-	-	20 л	
		«Мертвий об'єм» буфера для елюції (складає близько 35% від початкового)	-	-	7 л	
		Відпрацьована катіонообмінна смола Capto S ImpAct	-	-	2 л	На регенерацію
		Елюат	≈23 л	5%	21,85 л	До реактору об'ємом 30 л, а після на гельфільтраційну установку продуктивністю 50 л/год

ТП 9.1.2 Очищення ВПЧ VP2						
10	ТП 9.1.2 Очищення ВПЧ VP2	Елюат (кількість ВПЧ в розчині становить близько 73,79 г)	21,85 л	-	-	На гельфільтраційній установці продуктивністю 50 л/год
		PBS, рН 7,4 (для елюції ВПЧ) (двічі по 20 л)	40 л	-	-	
		«Мертвий об'єм» буфера для елюції (складає близько 30% від початкового)	-	-	12 л	
		Відпрацьований елюат	-	-	≈21,85 л	
		Розчин І з очищеними ВПЧ	-	2,5% (1,7 л)	27,3 л	До збірника об'ємом 80 л
ТП 9.2. Виділення та очищення ВПЧ VP2 з лізату						
ТП 9.2.1. Ресуспендування лізату						
11	ТП 9.2.1. Ресуспендування лізату	Лізовані клітини (містять близько 38,8 г ВПЧ з врахуванням, що в осад перейшло 1/3 від загальної кількості)	14,63 кг	-	-	В реакторі об'ємом 50 л
		20 мМ Tris-HCl, рН 8,0	15 л	-	-	
		Ресуспендовані лізовані клітини	-	-	29,64 л	До центрифуги проточного типу з продуктивністю 40 л/год
ТП 9.2.2. Центрифугування						
12	ТП 9.2.2. Центрифугування	Ресуспендовані лізовані клітини	29,64 л	-	-	Центрифуга проточного типу з продуктивністю 40 л/год
		Осад з клітинними залишками	-	-	≈14,63 кг	На утилізацію
		Супернатант з ВПЧ	-	2,5% (0,37 л)	14,63 л	До збірника об'ємом 20 л

ТП 9.2.3. Хроматографічне виділення ВПЧ VP2						
13	ТП 9.2.3. Хроматографічне виділення ВПЧ VP2	Супернатант з ВПЧ (з врахуванням втрат містить близько 35,3 г ВПЧ)	14,63 л	-	-	З збірника об'ємом 20 л до промислової іонообмінної колонки об'ємом завантаження 1 л
		20 мМ Tris-HCl, рН 8,0 (для врівноваження колонки)	5 л	-	-	Промислова іонообмінна колонка об'ємом завантаження 1 л
14	ТП 9.2.3. Хроматографічне виділення ВПЧ VP2	20 мМ Tris-HCl, рН 8,0 +500 мМ NaCl (для елюції)	5 л	-	-	Промислова іонообмінна колонка об'ємом завантаження 1 л
		Аніонообмінна смола Carpo Q XP	0,5 л	-	-	
		Відпрацьований супернатант	-	-	≈14,63 л	На знешкодження відходів
		Відпрацьований буфер для врівноваження	-	-	5 л	
		«Мертвий об'єм» буфера для елюції (складає близько 35% від початкового)	-	-	1,75 л	На знешкодження відходів
		Відпрацьована катіонообмінна смола Carpo Q XP	-	-	0,5 л	На регенерацію
Елюат	≈4,15 л	2,5%	≈4,05 л	До реактора на 10 л, а потім на діафільтраційну установку продуктивністю 10 л/год		

ТП 9.2.4 Очищення ВПЧ VP2						
15	ТП 9.2.4 Очищення ВПЧ VP2	Елюат (кількість ВПЧ в розчині становить близько 31,78 г)	4,05 л	-	-	На гельфільтраційні й установці продуктивністю 50 л/год
		PBS, рН 7,4 (для елюції ВПЧ) (двічі по 4 л 10 раз)	40 л	-	-	
		Відпрацьований елюат	-	-	≈4 л	На знешкодження відходів
		Розчин II з очищеними ВПЧ	-	2,5% (1 л)	39 л	До збірника об'ємом 80 л
ТП 10 Об'єднання розчинів ВПЧ VP2						
16	ТП 10 Об'єднання розчинів ВПЧ	Розчин I з очищеними ВПЧ (містить 70,28 г ВПЧ)	27,3 л	-	-	В реакторі об'ємом 80 л
		Розчин II з очищеними ВПЧ (містить 28,27 г ВПЧ)	39 л	-	-	
		Об'єднаний розчин з очищеними ВПЧ	-	-	66,3 л	До ліофільної сушарки об'ємом завантаження 100 л
ТП 11 Сублімаційне сушіння						
17	ТП 11 Сублімаційне сушіння	Об'єднаний розчин з очищеними ВПЧ (містить близько 99,55 г АСР ВПЧ)	66,3 л	-	-	В ліофільній сушарці об'ємом завантаження 100 л
		Висушені ВПЧ	101,41 г (при врахув анні 5% волого сті)	5% (5 г по волог ій масі)	96,34 г ВПЧ (близько 91,52 АСР)	До лабораторного фармацевтичного млина

ТП 12 Подрібненні ВПЧ VP2						
18	ТП 12 Подрібненні ВПЧ VP2	Висушені ВПЧ	96,34 г ВПЧ (≈91,52 АСР)	-	-	В лабораторному фармацевтичному у млині
		Подрібнені ВПЧ	-	2,5% (3,7 г по вологій масі)	92,64 г (≈88,01 г АСР)	До лабораторного вібросита
ТП 12 Просіювання ВПЧ VP2						
19	ТП 13 Просіювання ВПЧ VP2	Подрібнені ВПЧ	92,64 г (≈88,01 г АСР)	-	-	У лабораторному віброситі
		Просіяні ВПЧ	-	2,5% (3,7 г по вологій масі)	88,94 г (≈84,5 г АСР)	В ємність з коричневого скла об'ємом 200 мл на склад (зберігання при 4°C)

4.3. Специфікація обладнання

Таблиця 4.10

Специфікація обладнання для виробництва субстанції ВПЧ парвовірусу свиней

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
Д-1 Д-8 Д-11 Д-14 Д-17 Д-20 Д-26 Д-30 Д-46 Д-54	Об'ємно-ваговий дозатор	10	Дозатор рідин поршневий LF-2000. Дозування 200-2000 мл. Швидкість дозування 10-18 доз/хв. Габарити (ДхШхВ): 1120x250x770 мм. Похибка дозування – 1% [1]
30-2	Установка зворотнього осмосу	1	Зворотний осмос OSFIL-500. Продуктивність – 500 л год. Ступінь видалення солей - до 99,7%. Оснащений насосом високого тиску, мембраною для видалення солей. Габарити (ДхШ): 500x560 мм [2]

К-3	Іонообмінна колонка	1	Промислова іонообмінна колонка для одержання води очищеної. Виконана з нержавіючої сталі. Об'єм завантаження – 2 л. Виконана з нержавіючої сталі L304. Габарити не наведено [3]
3-4	Збірник для деіонізованої води	1	Реактор SS 350L. Об'єм апарату – 350 л. Виконана з нержавіючої сталі L316. Габарити (ДхШхВ): 1016x1016x1651 мм [4]
Н-5 Н-9	Перистальтичний насос	2	Перистальтичний насос низького тиску серії РТ 15. Робочий тиск – до 10 бар. Продуктивність до 465 л/год (регульований). Безперервна робота до 70 об/хв [5]
Д-6	Ваговий дозатор	1	Дозатор шнековий ваговий ШД-1. Дозування до 10 кг. Виконана з нержавіючої сталі L304. Швидкість: до 5 доз/хв. Габарити (ДхШхВ): 1730x950x1350 мм [6]
Р-7	Реактор для приготування PBS	1	Реактор Vsf -150 lex. Виконаний з нержавіючої сталі L316. Реактор об'ємом 150 л. Оснащений сорочкою та перемішуючим пристроєм. Всі параметри встановлюються та відслідковуються відповідним датчиком контролю. Габарити не вказано [7]
Р-10 3-22 Р-25 Р-29 Р-34 Р-43	Реактор для приготування 20 мМ ацетатного буферу Збірник для зберігання культуральної рідини Реактор для промивання біомаси Реактор для ресуспендування біомаси Реактор для підкислення гомогенізату Реактор для об'єднання розчинів ВПЧ	6	Реактор Т-80L. Виконаний з нержавіючої сталі L304. Реактор об'ємом 80 л. Оснащений сорочкою та перемішуючим пристроєм. Всі параметри встановлюються та відслідковуються відповідним датчиком контролю (рН). Габарити не вказано [8]

Н-12 Н-15 Н-18 Н-23 Н-27 Н-31 Н-33 Н-35 Н-38 Н-46 Н-55	Насос перистальтичний	11	Перистальтичний насос низького тиску серії РТ 10. Робочий тиск – до 10 бар. Продуктивність до 108 л/год (регульований). Безперервна робота до 37 об/хв [5]
Н-5 Н-9	Перистальтичний насос	2	Перистальтичний насос низького тиску серії РТ 15. Робочий тиск – до 10 бар. Продуктивність до 465 л/год (регульований). Безперервна робота до 70 об/хв [5]
Д-6	Ваговий дозатор	1	Дозатор шнековий ваговий ШД-1. Дозування до 10 кг. Виконана з нержавіючої сталі L304. Швидкість: до 5 доз/хв. Габарити (ДхШхВ): 1730х950х1350 мм [6]
Р-7	Реактор для приготування PBS	1	Реактор Bsf -150 lех. Виконаний з нержавіючої сталі L316. Реактор об'ємом 150 л. Оснащений сорочкою та перемішуючим пристроєм. Всі параметри встановлюються та відслідковуються відповідним датчиком контролю. Габарити не вказано [7]
Р-10 3-22 Р-25 Р-29 Р-34 Р-43	Реактор для приготування 20 мМ ацетатного буферу Збірник для зберігання культуральної рідини Реактор для промивання біомаси Реактор для ресуспендування біомаси Реактор для підкислення гомогенізату Реактор для об'єднання розчинів ВПЧ	6	Реактор Т-80L. Виконаний з нержавіючої сталі L304. Реактор об'ємом 80 л. Оснащений сорочкою та перемішуючим пристроєм. Всі параметри встановлюються та відслідковуються відповідним датчиком контролю (рН). Габарити не вказано [8]

Н-12 Н-15 Н-18 Н-23 Н-27 Н-31 Н-33 Н-35 Н-38 Н-46 Н-55	Насос перистальтичний	11	Перистальтичний насос низького тиску серії РТ 10. Робочий тиск – до 10 бар. Продуктивність до 108 л/год (регульований). Безперервна робота до 37 об/хв [5]
Р-13 Р-40	Реактор для приготування 20 мМ ацетатного буферу, що містить 500 мМ хлориду натрію Реактор для зберігання елюенту	2	Реактор CMLSR-30L. Виконаний з нержавіючої сталі L304/L316. Реактор об'ємом 30 л. Оснащений сорочкою та перемішуючим пристроєм. Всі параметри встановлюються та відслідковуються відповідним датчиком контролю. Габарити (ДхШхВ): 530х530х1900 мм [9]
Р-16 Р-37 Р-44	Реактор для приготування 20 мМ Tris-HCl буферу Реактор для зберігання супернатанту, що містить ВПЧ Реактор для ресуспендування лізату	3	Реактор LSR-50L. Виконаний з нержавіючої сталі L304/L316. Реактор об'ємом 50 л. Оснащений сорочкою та перемішуючим пристроєм. Всі параметри встановлюються та відслідковуються відповідним датчиком контролю (рН). Габарити (ДхШхВ): 580х580х2100 мм [10]
Р-19 Р-51	Реактор для приготування 20 мМ Tris-HCl буферу, що містить 500 мМ хлориду натрію Реактор для зберігання елюента	2	Реактор LSR-10L. Виконаний з нержавіючої сталі L304/L316. Реактор об'ємом 10 л. Оснащений сорочкою та перемішуючим пристроєм. Всі параметри встановлюються та відслідковуються відповідним датчиком контролю. Габарити (ДхШхВ): 480х480х1560 мм [11]
Н-21 Н-41 Н-49 Н-52	Насос перистальтичний	4	Перистальтичний насос низького тиску серії РТ 5. Робочий тиск – до 10 бар. Продуктивність до 33 л/год (регульований). Безперервна робота до 30 об/хв [5]
Ц-24 Ц-28 Ц-36	Центрифуга проточного типу	3	Проточна центрифуга KDCM-135. Продуктивність – 100 л/год. Виконана з нержавіючої сталі L304/L316. Оснащена сорочкою для підводу води охолодженої. Швидкість ротора до 12000 об/хв [12]

Г-32	Промисловий гомогенізатор	1	Промисловий гомогенізатор Scientz-150. Продуктивність до 25 л/год. Максимальний робочий тиск – 1500 бар [13]
К-39	Промислова іонообмінна колонка	1	Промислова іонообмінна колонка МК-СХЗ-35. Максимальна швидкість потоку – 35 л/год. Виготовлено зі сталі нержавіючої 316L [14]
ГУ-42	Гель-фільтраційна установка	1	Гель-фільтраційна установка ZKQ-30L. Виконана з борсилікатного скла. Оснащений вакуумним насосом. Швидкість до 30 л/хв (в залежності від носія) [15]
Ц-47	Центрифуга проточного типу	1	Проточна центрифуга KDCM-50. Продуктивність – 40 л/год. Виконана з нержавіючої сталі L304/L316. Оснащена сорочкою для підводу води охолодженої. Швидкість ротора до 15000 об/хв[12]
З-48	Збірник для зберігання супернатанту з лізату	1	Реактор LSR-20L. Виконаний з нержавіючої сталі L304/L316. Реактор об'ємом 20 л. Оснащений сорочкою та перемішувачем. Всі параметри встановлюються та відслідковуються відповідним датчиком контролю. Габарити (ДхШхВ): 500x500x1850 мм [16]
К-50	Промислова іонообмінна колонка	1	Промислова іонообмінна колонка об'ємом заповнення 1 л. Максимальна швидкість потоку – 25 л/год. Виготовлено зі сталі нержавіючої 316L [17]
ДУ-53	Діафільтраційна установка	1	Діафільтраційна установка Tangential flow systems, Ultralab™. Продуктивність – до 5 л/год. Максимально робочий тиск – 4,2 бар [18]
СС-56	Сублімаційна сушарка	1	Ліофільна сушарка СС-100. Кількість лотків – 20. Об'єм завантаження – 100 л. Габарити не вказано [19]
ФМ-57	Фармацевтичний млин	1	Млин лабораторний НС-150. Об'єм завантаження – 150 мл. Швидкість обертання: 28 000 об/хв [20]
В-58	Вібросито	1	Вібросито РЛУ-3. Частота коливань: 120\200±10%/хв. Габарити (ДхШхВ): 290x570x530 мм [21]
А-59	Автоклав	1	Автоклавна установка Touchclave-R. Об'єм заповнення – 160 л. Циліндрична камера. Габарити не вказано [22]

Примітка: 1 - <https://prom.ua/ua/p648949026-dozator-zhidkостей-porshnevoj.html>, 2 - https://osmosfilter.com.ua/ua/p1172002688-obratnyj-osmos-osfil.html?srsltid=AfmBOopF2k1NLMvZ0DgwNI4C7zIA0YhIVBD3Sa6u_84G6APole5Abcql, 3 - https://www.alibaba.com/product-detail/magnetic-water-treatment-for-scale-prevention_62199305035.html?spm=a2700.7724857.0.0.3f621f65931o0j, 4 -

<https://www.fraingroup.com/products/precision-stainless-tank-reactor-ss-350l/>, 5 –
https://tapflo.ua/images/tapflo_hose_pumps_ua.pdf, 6 – <https://abctech.com.ua/ua/p1265045697-dozator-shnekovyj-vesovoj.html?srsId=AfmBOoplB7GIWsl1NPoAyMpB47wXeyEqGzsLr1Zu0xOTzNEf-IQ4-6PN>,
7 – <https://ua.achievehem.com/chemical-equipment/stainless-steel-reactor.html>, 8 –
https://www.ollital.com/40l-60l-80l-lined-stainless-steel-chemical-reactor_p696.html, 9 –
<https://chemist.eu/ga/catalog/glass-reactor/stainless-steel-reactor/30l-double-layer-stainless-steel-reactor-for-distillation>, 10 – <https://www.laboao.com/products/stainless-steel-reactor/50l-double-layer-jacketed-stainless-steel-reactor>, 11 – <https://www.laboao.com/products/stainless-steel-reactor/10l-jacketed-stainless-steel-chemical-reactor>, 12 – https://www.alibaba.com/product-detail/Centrifuge-Centrifuge-Price-Flow-Ethanol-Separator_62423758147.html?spm=a2700.7724857.0.0.137929e1Tgw2th&s=p, 13 –
<https://www.scientzbio.com/high-pressure-homogenizer/120kg-scientz-150-high-pressure-homogenizer.html>, 14 – <https://maikemachinery.en.made-in-china.com/product/cTiUywGYgkVf/China-Maike-35L-H-Stainless-Steel-Macroporous-Resin-Chromatography-Column-Adsorption-Column.html>, 15 – <https://njningkai.en.made-in-china.com/product/jnVRIEUxTcWJ/China-Lab-Nutsch-Filter-10L-20L-30L-50L-100L-Vacuum-Filtration-System.html>, 16 – <https://www.laboao.com/products/stainless-steel-reactor/20l-double-layer-stainless-steel-chemical-reactor>, 17 – https://www.alibaba.com/product-detail/Resin-Column-ion-exchange-column-chromatography_1601007619449.html?spm=a2700.7724857.0.0.2b171f65LpxzRP, 18 –
<https://www.avantorsciences.com/cz/en/product/7079529/system-filtracni-ultralabtm>, 19 –
<https://www.sublimat.com.ua/uk/suchilka-cc-100>, 20 – <https://shop.hlr.ua/ua/melnica-laboratornaya-ns-150-256733.html>, 21 – https://t-mg.com.ua/p1624462169-rassev-laboratornyj-rlu.html?source=merchant_center&gad_source=1&gad_campaignid=20516183962&gbraid=0AAA AADCm1bcBg91x00PXuhWXEDUCBq1lz&gclid=Cj0KCQjw0LDBBhCnARIsAMpYIAoM7bdvsfbgPmM4QIEMiykhfldOqQb9h2F5ixv7_V6TaKy1Yy9-rUwaAsLPEALw_wcB, 22 –
<https://www.lte-scientific.co.uk/product/tcr-cylindrical-chamber-autoclave/>.

РОЗДІЛ 5

ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИДІЛЕННЯ І ОЧИЩЕННЯ ВІРУСОПОДІБНИХ ЧАСТИНОК ПАРВОВІРУСУ СВИНЕЙ

ДР 1. Приготування допоміжних розчинів

ДР 1.1. Приготування води деіонізованої

Для знесолення водопровідної води використовуються установка зворотного осмосу (ЗО-2). Об'єм даної води, яка необхідна для виробництва субстанції ВПЧ парвовірусу свиней, становить близько 320 л, який відміряється об'ємно-ваговим дозатором (Д-1). Рушійною силою зворотного осмосу є різниця тиску з різних боків мембрани. Для фільтрації в конструкції установки зворотнього осмосу використовують два типи мембран: поліестерна пориста з розміром пор 0,25 мкм і непориста дифузійна ацетат-целюлозна мембрана з напівпроникними порами розміром 10–4 мкм. Остання утворює водневі зв'язки з молекулами води, які під дією надлишкового тиску розриваються, і молекули води дифундують у протилежному напрямку мембрани. Солі та всі інші хімічні сполуки, крім газів, не проникають крізь таку мембрану, а ступінь очистки від солей досягає 99,99 %. Далі, для прибирання зайвих іонів знесолена вода потрапляє на іонообмінну колонку (К-3), завантажену змішаною смолою Purolite MB400 в об'ємі 1,5 л, для видалення іонів, що могли залишитися. Встановлюється швидкість потоку 1 л/хв. Для цього процесу використовується насос, що передбачений в конструкції установки зворотнього осмосу. Процес отримання води триває 10 годин. Отримана деіонізована вода зберігається у збірнику (З-4) об'ємом 350 л та подається до наступних стадій за допомогою перистальтичного насоса (Н-5).

ДР 1.2. Приготування 1 М натрій-фосфатного буферу

Для очистки ВПЧ на одну серію потрібно передбачити 120 л PBS.

Зазвичай реагенти готують із запасом, тому передбачимо приготування 150 л

					<i>НУХТ БТЕК 02.01.12 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Онищенко А.А.</i>			РОЗДІЛ 5 ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИДІЛЕННЯ І ОЧИЩЕННЯ ВІРУСОПОДІБНИХ ЧАСТИНОК ПАРВОВІРУСУ СВИНЕЙ	<i>Лім.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Перевір.</i>		<i>Скряцька О.І.</i>					92	158
<i>Реценз.</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						

буферу. Для цього на ваговому дозаторі (Д-6) зважують близько 3 кг $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ та 0,51 кг $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Наважки пересипають до реактора (Р-7) об'ємом 150 л. Після цього, за допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-8) доливають 150 л води деіонізованої (від ДР 1.1.), вмикається мішалка до повного перемішування солей. Після розчинення перевіряється рН розчину, який має становити $7,4 \pm 0,1$. Одержаний розчин передається за допомогою перистальтичного насоса (Н-9) на стадії ТП 5, ТП 9.1.2. та ТП 9.2.4.

ДР 1.3. Приготування 100 мМ розчину оцтової кислоти

Для підкислення суспензії лізованих клітин передбачено 1,4 л 100 мМ оцтової кислоти. Пропонується передбачити близько 2 л розчину. Тож, для приготування використовується крижана оцтова кислота (99,9%). В 1 л 100 мМ розчину входить близько 6 г оцтової кислоти. Тож, для приготування 2 л 100 мМ оцтової кислоти до колби об'ємом 5 л наливають 1,99 л води деіонізованої від ДР 1.1. Далі, в колбу додають 12 мл крижаної оцтової кислоти. Колбу закривають гумовою пробкою та гарно перемішують для повної гомогенізації розчину.

ДР 1.4. Приготування буферів для хроматографічної очистки

ДР 1.4.1. Приготування 20 мМ ацетатного буферу

Для очищення ВПЧ передбачається 20 л 20 мМ ацетатного буферу та 20 л 20 мМ ацетатного буфера, що містить 500 мМ NaCl . Для приготування буферу для елюції зазвичай як сток використовують буфер для урівноваження, тому загальний об'єм, що потрібен становить 40 л. Для запасу пропонується передбачити 50 л буферу.

Тож, на технічних вагах зважують 18,6 г ацетату натрію, додають в реактор змішувач (Р-10) об'ємом 80 л. Далі, за допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-11) наливають 50 л деіонізованої води (від ДР 1.1). За допомогою мірного циліндру відміряють 46,5 мл крижаної оцтової кислоти та додають до реактору. Вмикається мішалка до повного розчинення компонентів. Після розчинення обов'язково перевіряється рН, який має становити $4,0 \pm 0,1$. Частина буферу подається до ДР 1.4.2., а частина до ТП 9.1.1. за допомогою перистальтичного насоса (Н-12).

ДР 1.4.2. Приготування 20 мМ ацетатного буферу, що містить 500 мМ хлориду натрію

З ДР 1.4.1. до реактору (Р-13) подається 25 л 20 мМ ацетатного буферу, який відміряється за допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-14). На технічних вагах зважують близько 731 г хлориду натрію та вносять у реактор. Вмикається мішалка до повного розчинення компонентів. За допомогою перистальтичного насосу (Н-15) буфер подається на стадію ТП 9.1.1.

ДР 1.4.3. Приготування 20 мМ Tris-HCl буферу

Передбачається приготування 25 л зазначеного буферу. Із запасом пропонується приготувати близько 30 л. На технічних вагах зважують 7,2 г Tris-HCl. Наважку переносять до реактору (Р-16) об'ємом 50 л. За допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-17) наливають 30 л води деіонізованої від ДР 1.1, після чого вмикається мішалка до повного розчинення. Після цього, обов'язково перевіряється рН, яке має бути близько $8,0 \pm 0,1$. Частина буферу подається до ДР 1.4.4, а частина до ТП 9.2.1. та ТП 9.2.3. за допомогою перистальтичного насосу (Н-18).

ДР 1.4.4. Приготування 20 мМ Tris-HCl буферу, що містить 500 мМ хлориду натрію

За допомогою перистальтичного насосу (Н-18) до реактору (Р-19) об'ємом 10 л вноситься 7 л 20 мМ Tris-HCl буферу з ДР 1.4.3 (відміряється за допомогою об'ємно-вагового дозатора Д-20). Далі, на технічних вагах зважують 207 г хлориду натрію та вносять в апарат, після чого вмикається мішалка до повного розчинення. За допомогою перистальтичного насосу (Н-21) буфер подається на стадію ТП 9.2.3.

ТП 2. Зберігання культуральної рідини

Культуральна рідина, що містить клітини *K. marxianus* VP2 зберігається в збірнику (З-22) об'ємом 80 л при температурі $4 \pm 1^\circ\text{C}$. Далі, за допомогою перистальтичного насосу (Н-23) культуральна рідина подається на наступну стадію.

ТП 3. Центрифугування

До проточної центрифуги (Ц-24) подається культуральна рідина. Встановлюється режим центрифугування в 10000 об/хв. З врахуванням продуктивності центрифуги та об'єму, що надійде, приблизна тривалість процесу становить 40 хвилин. Температура процесу становить 4°C та підтримується подачею води охолодженої до сорочки апарату. Супернатант під дією відцентрових сил передається на стадію ЗВ 14, а біомасу вручну вивантажують до сталевий ємності об'ємом 20 л та передають на наступну стадію.

ТП 4. Промивання біомаси

ТП 4.1. Ресуспендування біомаси дріжджів в деіонізованій воді

До реактору (Р-25) об'ємом 80 л вносять близько 16,5 кг вологій біомаси. Далі, за допомогою об'ємно-вагового дозатору (Д-26) до реактору надходить 40 л води деіонізованої від ДР 1.1.. Вмикається мішалка для повного ресуспендування клітин дріжджів, процес триває близько 30 хвилин.

ТП 4.2. Центрифугування ресуспендованої біомаси

Далі, за допомогою перистальтичного насосу (Н-27) суспензія подається до проточної центрифуги (Ц-28). Встановлюється режим центрифугування в 10000 об/хв. З врахуванням продуктивності центрифуги та об'єму, що надійде, приблизна тривалість процесу становить 40 хвилин. Супернатант під дією відцентрових сил передається на стадію ЗВ 14, а біомасу вручну вивантажують назад до реактору (Р-25), процес ще раз повторюється. Промиту біомасу передають на наступну стадію.

ТП 5. Ресуспендування біомаси

Промиту біомасу від ТП 4.1 переносять до реактору (Р-29). Далі, за допомогою об'ємно-вагового дозатору (Д-30) вносять 40 л натрій-фосфатного буферу від ДР 1.2. Вмикається мішалка для повного ресуспендування клітин. Тривалість процесу становить близько 30 хвилин. Суспензія з клітинами подається на наступну стадію за допомогою перистальтичного насосу (Н-31).

ТП 6. Руйнування дріжджових клітин

Ресуспендована біомаса потрапляє до промислового гомогенізатора (Г-32). Встановлюється наступний режим руйнування клітин: 1500 бар, 4 °С, дворазовий цикл. Тривалість процесу становить 4 години. Далі, гомогенізатор передається на наступну стадію за допомогою перистальтичного насосу (Н-33).

ТП 7. Підкислення

До реактору (Р-34) об'ємом 80 л потрапляє гомогенізатор із зруйнованими клітинами дріжджів. Далі, до реактору вноситься 100 мМ оцтова кислота від ДР 1.3., Вмикається мішалка до повного перемішування суспензії. Кінцевий рН розчину має становити 4,0. Суспензія за допомогою перистальтичного насосу (Н-35) подається на наступну стадію.

ТП 8. Центрифугування

Підкислена суспензія зі зруйнованими клітинами потрапляє до проточної центрифуги (Ц-36). Встановлюється режим центрифугування в 10000 об/хв. З врахуванням продуктивності центрифуги та об'єму, що надійде, приблизна тривалість процесу становить 40 хвилин. Супернатант під дією відцентрових сил передається до реактору (Р-37) об'ємом 50 л, а лізовану масу вручну вивантажують до реактору (Р-44). Далі, кожен зразок обробляють окремо через зміну ізоелектричної точки білку.

ТП 9. Виділення та очищення вірусоподібних частинок (ВПЧ)

ТП 9.1. Виділення та очищення ВПЧ VP2 з супернатанту

ТП 9.1.1. Хроматографічне виділення ВПЧ VP2

До колонки (К-39) об'ємом 3 л вносять близько 2 л катіонообмінної смоли Carro S ImpAct. Далі, на колонку для врівноваження носія подають 20 мМ ацетатний буфер від ДР 1.4.1. в об'ємі близько 15 л, на екрані спостерігають за утворенням рівної лінії на хроматограмі, після чого можна наносити аналізат за допомогою перистальтичного насосу (Н-38). Відпрацьований буфер передають на утилізацію на стадію ЗВ 14. Після цього, на колонку наноситься 20 мМ ацетатний буфер, що містить 500 мМ від ДР 1.4.2. в об'ємі близько 20 л. Відпрацьований буфер відводиться до тих пір, поки на хроматограмі не починає

рости пік, що свідчить про елюцію ВПЧ. З цього моменту розчин з колонки передається до реактору (Р-40) об'ємом 30 л. Передача завершується тоді, коли позначка піку впаде на початковий рівень. Тривалість всього процесу близько 6 годин. Після цього на колонку додатково вносять 5 л буферу для врівноваження для промивання колонки (а саме смоли), з подальшою можливою регенерацією.

ТП 9.1.2. Очищення ВПЧ VP2

Елюат з реактору (Р-40) подають на гель-фільтраційну установку (ГУ-42), що містить Sephacryl® S-500 за допомогою перистальтичного насосу (Н-41). Після нанесення зразку, до установки подають натрій-фосфатний буфер від ДР 1.2. двічі по 20 л. Принцип передачі елюенту подібний до хроматографії, необхідно спостерігати за появою піку, що означатиме про елюцію самого ВПЧ. Під час цього процесу елюент передається до реактору (Р-43) на 80 л, де буде зберігатись до об'єднання з іншим очищеним розчином ВПЧ.

ТП 9.2. Очищення ВПЧ VP2 з лізату

ТП 9.2.1. Ресуспендування лізату

Від ТП 8 подається лізована біомаса до реактору (Р-44) об'ємом 50 л. За допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-45) до реактору подається 15 л 20 мМ Tris-HCl від ДР 1.4.3. Далі, вмикається мішалка для повного ресуспендування та розчинення ВПЧ з цього осаду. Суспензія подається на наступну стадію за допомогою перистальтичного насосу (Н-46).

ТП 9.2.2. Центрифугування

Суспензія потрапляє до проточної центрифуги (Ц-47), де встановлюється режим центрифугування в 10000 об/хв. Тривалість процесу близько 40 хвилин. Далі, супернатант під дією відцентрових сил потрапляє до збірника (З-48) об'ємом 20 л, а клітинні залишки утилізуються.

ТП 9.2.3. Хроматографічне виділення ВПЧ VP2

До колонки (К-50) об'ємом 1 л вносять близько 0,5 л аніонообмінної смоли Carpto Q XR. Далі, на колонку для врівноваження носія подають 20 мМ Tris-HCl від ДР 1.4.3. в об'ємі близько 3 л, на екрані спостерігають за утворенням рівної лінії на хроматограмі, після чого можна наносити аналізат за допомогою

перистальтичного насосу (Н-49). Відпрацьований буфер передають на утилізацію до ЗВ 14. Після цього, на колонку наноситься 20 мМ Tris-HCl, що містить 500 мМ від ДР 1.4.4. в об'ємі близько 5 л. Відпрацьований буфер відводиться до тих пір, поки на хроматограмі не починає рости пік, що свідчить про елюцію ВПЧ. З цього моменту розчин з колонки передається до реактору (Р-51) об'ємом 10 л. Передача завершується тоді, коли позначка піку впаде на початковий рівень. Після цього на колонку додатково вносять 2 л буферу для врівноваження для промивання колонки (а саме смоли), з подальшою можливою регенерацією.

ТП 9.2.4. Очищення ВПЧ VP2

Елюат з реактору (Р-51) подають перистальтичним насосом (Н-52) на діалізаційну установку (ДУ-53), де ВПЧ будуть затримуватись на мембрані. А низькомолекулярні сполуки – проходити крізь неї. Після нанесення зразка зворотнім осмосом вноситься натрій-фосфатний буфер від ДР 1.2. за допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-54), по 4 л 10 разів. Одержаний розчин осмотичними силами передається до реактору (Р-43), де вже міститься розчин з ВПЧ після катіонообмінної очистки та гель-фільтрації.

ТП 10. Об'єднання розчинів ВПЧ VP2

Від ТП 9.2 та ТП 10.4 розчини потрапляють до реактора (Р-43). Після цього, вмикається мішалка для повного перемішування одержаного однорідного розчину. Далі, розчин за допомогою перистальтичного насосу (Н-55) розливають по деко для подальшого сушіння в сублімаційній установці.

ТП 11. Сублімаційне сушіння

Лотки з розчином ВПЧ встановлюють до сублімаційної сушарки (СС-56). Встановлюється режим сушіння. Спочатку температура опускається до -50°C для заморозки продукту. Потім вона підіймається до - 20°C для сублімації льоду і вже на кінцевому етапі температура становить +20°C для видалення залишкової вологи. Тривалість процесу сушіння – 24 години. Оскільки під час сушіння ВПЧ скоріше за все будуть збиватись в грудочки, подальші стадії потрібні для одержання порошкоподібної форми ВПЧ.

ТП 12. Подрібнення ВПЧ VP2

Сухі ВПЧ переносять до фармацевтичного млина (ФМ-57) для подрібнення грудочок та перетворення ВПЧ в порошкоподібну форму. Розмір часточок має бути менше 0,5 мм. Тривалість процесу 15 хв.

ТП 13. Просіювання ВПЧ VP2

Далі, ВПЧ пересипають до вібросита (В-58), яке відокремлює частинки за фракціями менше 0,5 мм. Тривалість процесу 15 хв. Якщо фракції більші – вони повертаються на минулу стадію для додаткового подрібнення. Одержаний порошок пересипають в ємність з коричневого скла 200 мл, яке передається на склад та зберігається при 4°C.

ЗВ 14. Знешкодження рідких відходів

Оскільки більша частина відходів буде представлена супернатантом (що може містити залишки біомаси з ВПЧ), та відпрацьовані буфери після хроматографічної очистки (в певному об'ємі якого також будуть залишатись ВПЧ) найдоцільнішим методом знешкодження рідких відходів буде саме автоклавування. Одержані відходи зливаються в скляні ємності об'ємом 10 л, закриваються фольгованими ковпаками та переносяться до автоматизованого автоклаву (А-59), де встановлюється наступний режим стерилізації (знешкодження): 134°C, протягом 30 хв, тиск 0,15 МПа. Знезаражені відходи виливають у каналізацію.

РОЗДІЛ 6

ТЕХНОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ОТРИМАННЯ ВАКЦИНИ ПРОТИ ПАРВОВІРУСУ СВИНЕЙ НА ОСНОВІ ВІРУСОПОДІБНИХ ЧАСТИНОК

6.1. Обґрунтування кінцевої форми та упаковки вибору форми випуску вакцини на основі вірусоподібних частинок проти парвовірусу свиней

Вибір кінцевої лікарської форми вакцини проти парвовірусу свиней на основі вірусоподібних частинок (ВПЧ) обумовлюється специфікою використання препарату у ветеринарній практиці. Основними критеріями є: забезпечення стабільності субстанції, відповідність умовам масової вакцинації, зручність дозування та безпечність введення (Kheirvari, Liu, & Tumban, 2023; Prosper et al., 2024; Crisci, Bárcena, & Montoya, 2013).

У випадку вакцин для великотоварних свинарських господарств найбільш доцільною є лікарська форма у вигляді готового стерильного розчину для ін'єкцій. Це пояснюється такими факторами (Tizard, 2020; Schiavone et al., 2025):

1. *Оперативність застосування* – використання готової рідкої форми суттєво спрощує процес вакцинації, оскільки відпадає потреба у додатковому відновленні порошку. Це особливо важливо при роботі з великими об'ємами поголів'я, коли час проведення маніпуляцій є критичним.

2. *Мінімізація ризику контамінації* так як відсутність стадії відновлення препарату у польових умовах виключає можливість порушення стерильності та знижує ризик інфекційних ускладнень.

3. *Точність дозування* – рідка форма дозволяє забезпечити стандартизоване дозування препарату без додаткових маніпуляцій.

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	НУХТ БТЕК 02.01.12 КР ПЗ			
Розроб.		Онищенко А.А.			РОЗДІЛ 6 ТЕХНОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ОТРИМАННЯ ВАКЦИНИ ПРОТИ ПАРВОВІРУСУ СВИНЕЙ НА ОСНОВІ ВІРУСОПОДІБНИХ ЧАСТИНОК	Лім.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Скороцька О.І.					100	158
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

4. *Оптимізація фасування* – можливе виробництво багатодозових флаконів (10 – 100 доз), що полегшує масове застосування.

Разом з тим, вибір рідкої форми потребує посиленого контролю за стабільністю вірусоподібних частинок, оскільки білкові структури ВПЧ є чутливими до температурних коливань і можуть втрачати імуногенність у процесі зберігання (Sharma et al., 2021). Для підвищення стабільності у склад вакцини вводять стабілізатори білків (наприклад, сахароза (Rueda et al., 2000) та забезпечують зберігання препарату у холодильних умовах (+2...+8°C).

Ефективність імунної відповіді при застосуванні ВПЧ значною мірою залежить від правильно підбраного ад'юванта. Ад'юванти не лише посилюють специфічну імунну реакцію організму, але й дозволяють знизити кількість антигену, необхідного для досягнення захисного ефекту, що має суттєве значення для економічної доцільності виробництва (Cimica, & Galarza, 2017).

У дослідженнях із тваринами було випробувано різні типи ад'ювантів, серед яких мінеральні та немінеральні олійні емульсії, а також полімерні сполуки. **До найбільш поширених відносяться** (Antonis et al., 2006): *емульсії на основі мінеральних олій* – вода-в-оліях (Specol®), подвійна емульсія вода-олія-вода (DOE, Animal Sciences Group, Нідерланди) та олія-в-воді (Suvaxyn®, Fort Dodge Animal Health, Нідерланди); *емульсії на основі немінеральної олії* зі скваланом (80 г/л), доповнені сульфоліпо-циклодекстрином (SL-CD), диметилдіоктадециламонію бромідом (DDA) або Span 85; *полімерні ад'юванти*, зокрема карбопол високої молекулярної маси (934PH, BFGoodrich) та його модифіковані форми з бутильованими естерами.

Особливу увагу привернули комбінації сквалану з DDA або SL-CD, які продемонстрували найвищий рівень стимуляції імунної відповіді у дослідних тварин. Важливо підкреслити, що DDA у складі рецептури застосовувався у концентрації 40 мг/мл фізіологічного розчину, у поєднанні з 160 мг сквалану та 40 мг полісорбату, що забезпечувало утворення стабільної олійної емульсії з вираженим ад'ювантним ефектом (Antonis et al., 2006).

У нашій технологічній схемі до складу вакцини проти парвовірусу свиней планується включення саме DDA на основі сквалану як оптимального ад'ювантного комплексу. Такий вибір обґрунтований поєднанням високої імуногенності та прийняттого профілю безпечності. Крім того, у фінальній лікарській формі передбачено введення стабілізатора – 20% розчину сахарози, що сприяє збереженню конформаційної стабільності ВПЧ у процесі зберігання і транспортування.

Кінцева композиція вакцини включатиме: активну субстанцію (вірусоподібні частинки парвовірусу свиней) + ад'ювантний комплекс на основі сквалану з DDA +стабілізатор (20% сахароза) + хлорид натрію (0,85%, фіз.розчин).

Запропонована формуляція забезпечує збалансоване поєднання імуногенності, стабільності та технологічної надійності, що є ключовими параметрами для промислового виробництва ветеринарних вакцин.

Упаковка повинна відповідати вимогам до парентеральних лікарських засобів [<https://www.uhlmann.de/en/insights/highlights/packaging-of-parenterals>; <https://unacademy.com/content/nta-ugc/study-material/pharmaceutical-analysis/parenteral-product-requiring-sterile-packaging/>; <https://www.contractpharma.com/parenteral-packaging-considerations/>]:

первинна тара – флакони з нейтрального боросилікатного скла ємністю 10 –100 мл залежно від кількості доз;

герметизація – стерильні гумові пробки та алюмінієві ковпачки, що гарантують герметичність та захист від мікробної контамінації;

вторинна упаковка – картонні коробки з маркуванням (назва препарату, кількість доз, умови зберігання, серія, термін придатності).

Оптимальною лікарською формою для вакцини проти парвовірусу свиней на основі ВПЧ є стерильний рідкий розчин для ін'єкцій у багатодозових флаконах, що забезпечує зручність масового застосування, дотримання вимог асептики та стабільність препарату протягом терміну придатності за умови правильного зберігання.



Рис.6.1. Приклади вакцин проти парвовірусу свиней

[<http://www.neovac.com.ua/parvo-vaccine-biosuis-l-6-against-leptospirosis-and-parvovirozu-inaktyvovavana>; <https://www.biotestlab.ua/ua/products/suimun-parvovirozu-inak/>]

6.2. Обґрунтування технологічних особливостей одержання вакцини на основі вірусоподібних частинок проти парвовірусу свиней

Виробництво вакцинальних препаратів для парентерального застосування належить до категорії процесів з високим ризиком мікробної контамінації. З огляду на це, усі технологічні операції повинні виконуватися у спеціально обладнаних чистих приміщеннях, що відповідають вимогам належної виробничої практики (GMP, Annex 1) та міжнародного стандарту ISO 14644-1

[https://www.dls.gov.ua/wp-content/uploads/2020/05/%D0%9D%D0%B0%D1%81%D1%82%D0%B0%D0%BD%D0%BE%D0%B2%D0%B0-%D0%A1%D0%A2-%D0%9D-%D0%9C%D0%9E%D0%97%D0%A3-42-4.0_2020.pdf];

[<https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/3558/klasifikaciya-virobnichix-primishhen>];

[https://zakon.isu.net.ua/sites/default/files/pdf/chisti_primischennya_ta_povyazan-3-465688.pdf].

Вибір класу чистоти для кожного етапу процесу визначається ступенем критичності операцій щодо можливості потрапляння мікроорганізмів чи механічних часток у лікарський засіб.

1. Зона асептичного наповнення і закупорювання (критична зона) (<https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/3558/klasifikaciya-virobnichix-primishhen>).

У цій зоні відбувається безпосередній контакт вакцинального розчину з навколишнім середовищем: наповнення флаконів, введення стерильних пробок і закупорювання алюмінієвими ковпачками. Для гарантування стерильності препарату такі операції мають проводитися у класі А (ISO 5) – ламінарні шафи або ізолятори з односпрямованим потоком повітря.

Саме на цьому етапі існує найбільший ризик потрапляння мікрофлори та частинок у кінцеву лікарську форму. Будь-яке відхилення може призвести до втрати стерильності і непридатності серії препарату.

2. Фонова зона для класу А (<https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/3558/klasifikaciya-virobnichix-primishhen>).

Приміщення, у якому розташоване обладнання для розливу та працює персонал, повинно відповідати вимогам класу В (ISO 7 у робочому стані).

Створення контрольованого мікробного середовища навколо асептичної зони знижує ризик перехресної контамінації та забезпечує стабільні умови для роботи ламінарних шаф класу А.

3. Зони підготовки субстанції та допоміжних розчинів (<https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/3558/klasifikaciya-virobnichix-primishhen>).

Операції з приготування буферних систем, стабілізаторів та розчинників здійснюються у приміщеннях класу С (ISO 8).

Хоча ці операції не передбачають безпосереднього контакту з кінцевим лікарським засобом, якість і стерильність допоміжних розчинів є критичною для збереження стабільності та безпечності ВПЧ-вакцини.

4. Зони допоміжних процесів (мийка, стерилізація, вторинна упаковка) [<https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/3558/klasifikaciya-virobnichix-primishhen>].

Підготовка тари, миття та автоклавування інструментів, а також фасування вторинної упаковки можуть проводитися у приміщеннях класу D (ISO 9).

Попри те, що на цих етапах не відбувається прямого контакту із субстанцією чи готовим препаратом, контрольована чистота середовища знижує ризик переносу контамінації у більш критичні зони.

Для забезпечення стерильності та стабільності вакцини проти парвовірусу свиней на основі вірусоподібних частинок необхідно використовувати систему чистих приміщень із розмежуванням зон за класами чистоти: А (асептична зона), В (фон), С (підготовка допоміжних розчинів) та D (допоміжні операції). Такий підхід відповідає міжнародним регламентам GMP і гарантує відповідність готового препарату вимогам безпечності та якості [<https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/3558/klasifikaciya-virobnichix-primishhen>].

Процес отримання готової вакцини проти парвовірусу свиней на основі ВПЧ має принципові особливості, пов'язані з білковою природою субстанції. Оскільки ВПЧ є термолабільними структурами, застосування кінцевої стерилізації у первинній упаковці (автоклавування або інші методи термічної обробки) є неможливим. Відповідно, вся технологія виробництва повинна здійснюватися в умовах асептичного середовища, що гарантує відсутність мікробної контамінації на всіх критичних етапах.

На першій стадії очищена субстанція ВПЧ приводиться до робочої концентрації у стерильному буферному розчині з додаванням стабілізаторів, які забезпечують збереження просторової структури вірусоподібних частинок у процесі зберігання. Допоміжні розчини готуються у приміщеннях класу чистоти С, після чого піддаються мембранній фільтрації з використанням фільтрів із розміром пор 0,22 мкм для досягнення стерильності.

Далі субстанція вакцини проходить стадію фільтраційної стерилізації, яка є критичною точкою процесу. На цьому етапі здійснюється видалення мікроорганізмів та часток без застосування термічних чи хімічних методів, що могли б призвести до руйнування ВПЧ. Операція виконується у середовищі класу А з фоновим класом В, що відповідає вимогам належної виробничої практики (GMP) для асептичного виробництва.

Отриманий стерильний розчин негайно направляється на стадію асептичного фасування у первинну тару. Для цього застосовуються стерильні скляні флакони з нейтрального боросилікатного скла, які попередньо промиті, висушені та простерилізовані. Дозування виконується автоматизованою системою розливу у зоні класу А. Відразу після наповнення флакони закупорюються стерильними гумовими пробками, які фіксуються алюмінієвими ковпачками. Ця операція також здійснюється в умовах класу А/В, оскільки саме на стадії закупорювання існує високий ризик потрапляння контамінантів у готову лікарську форму.

Після закупорювання первинна упаковка підлягає маркуванню та вторинному пакуванню у картонні коробки. Ці операції виконуються у приміщеннях класу D, де прямий контакт із препаратом уже відсутній. Завершальним етапом є формування серій готової продукції, проведення контролю якості (включаючи тести на стерильність, відсутність ендотоксинів та збереження імуногенності) та розміщення на зберігання.

Готовий препарат зберігається у холодильних умовах при температурі +2...+8°C протягом усього терміну придатності. Контроль стабільності здійснюється на підставі періодичних випробувань, що включають перевірку фізико-хімічних характеристик, імуногенності та стерильності.

Ключовою особливістю технології виробництва вакцини проти парвовірусу свиней на основі ВПЧ є відсутність стадії кінцевої стерилізації та повна залежність від суворого дотримання асептичних умов у процесі фільтрації, розливу та закупорювання. Це визначає високі вимоги до чистоти приміщень,

стерильності тари й допоміжних матеріалів, а також до системи контролю якості на всіх етапах виробництва.

6.3. Матеріальний розрахунок на серію виробництва вакцини на основі вірусоподібних частинок проти парвовірусу свиней

Таблиця 6.1

Матеріальний розрахунок на серію вакцини

Надійшло		Використано	
Назва сировини, матеріалів та напівпродуктів	Кількість, г	Назва сировини, матеріалів та напівпродуктів	Кількість, г
1	2	3	4
Приготування рідкої основи для вакцини (зважування сировини)			
Сахароза	160	Сахароза	159,2
Хлорид натрію	6,8	Хлорид натрію	6,7
Диметилдіоктадецила монію броміду	32	Диметилдіоктадецила монію броміду	31,8
Сквалан	128	Сквалан	127,4
Полісорбат	32	Полісорбат	31,8
Вода для ін'єкцій	450	Вода для ін'єкцій	447,7
Всього:	808,8	<u>Втрати (0,5%)</u>	<u>4,2</u>
		Всього:	808,8
Приготування вакцини проти парвовірусу свиней на основі вірусоподібних частинок (зважування сировини)			
Субстанція ВПЧ	84,5	Субстанція ВПЧ	84
Рідка основа	808,8	Рідка основа	804,8
Всього:	893,3	<u>Втрати (0,5%)</u>	<u>4,5</u>
		Всього:	893,3
Наповнення та закупорка флаконів			
Флакони	43 флакони	Флакони	42 флакони
Всього:	43 флаконів	<u>Втрати (1%):</u>	<u>1</u>
		Всього:	43 флаконів

6.4. Специфікація обладнання

Специфікацію обладнання, зображеного на апаратурній схемі (див. *графічна частина*), наведено у табл. 6.2.

Таблиця 6.2

Специфікація обладнання на виробництво ветеринарної вакцини проти парвавірусу свиней на основі ВПЧ

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
1	2	3	4
ПЗ – 1	Повітрозабірник	1	Повітрозабірник виконаний з нержавіючої сталі та оснащений металевою сіткою.
Ф-2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтр класу очистки EU4. Діаметр підключення – 100 мм. Початковий перепад тиску – 40 Па, кінцевий – 250 Па. Максимальна робоча температура – 80°C [1]
В-3	Вентилятор	1	Канальний вентилятор Вентс ТТ ПРО 125. Продуктивність до 240 м ³ /год. Максимальна робоча температура – 60°C [2]
К-4	Електрокалорифер	1	Електрокалорифер Турбовент ЕКК 200-6. Продуктивність до 230 м ³ /год. Корпус - оцинкована сталь. Захист від перегріву – 60 та 90°C [3]
П-5	Парозволожувач	1	Зволожувач UT-N7.0FL. Витрата повітря до 255 м ³ /год. Витрата води – 7,0 л/год. Набарити (мм): 460:360:830 [4]
Ф-6	Фільтр тонкої очистки повітря	1	Фільтр повітряний касетний, клас фільтрації F9. Габарити (мм): 592x287x292. Робоча температура до 80°C [5]
Ф-7	Фільтр надтонкої очистки	1	Фільтр ULPA 17. Надтонке очищення повітря від домішок (діаметр пор 0,12 мкм). Витрата повітря до 300 м ³ /год. Робоча температура до 70°C [6]
3-8 3-13 3-16 3-19 3-22	Збірник для води	5	Збірник сталевий LSR-5L. Тип матеріалу - SUS316L/SUS304. Оснащений пропеллерної мішалкою (опціонально). Робочий тиск -0,1~0,3 МПа. Габарити (мм): 450x480x1500 [7]
Д-9 Д-30	Дозатор рідинний	2	Дозатор рідини ДЖВ-1. Продуктивність 10 доз/хв. Дозування до 20 л/доза. Похибка в 1 %. Габарити (мм): 950x504x2010 [8]

Н-10 Н-14 Н-17 Н-20 Н-23 Н-25 Н-28 Н-31 Н-34	Насос перистальтичний	9	Перистальтичний насос SEKO NPR 7. Продуктивність 7 л/год. Робочий тиск 0,1 бар [9]
Ф-11	Піщаний фільтр	1	Мультипатронний фільтр S/S. Робочий тиск від 1,4 до 8 бар. Корпус – нержавіюча сталь. 76,2 × 508 × 25,4 (переведення з дюймів) [10]
3-12 3-15	Зворотній осмос	2	Система зворотного осмосу WaterBox RO-6. Продуктивність до 12/год. Робочий тиск від 2,8 до 6 бар. Габарити (мм): 390x450x150 [11]
Д-18	Дистиляційна установка	1	Дистиляційна установка ДЭ-4М. Продуктивність 4 л/год. Габарити (мм): 330×380×650 [12]
М-21 М-26 М-32	Мікрофільтраційна установка	3	Мікрофільтраційна установка НFM-053. Продуктивність 2-20 л/год. Виконана з нержавіючої сталі, оснащена керамічними фільтрами. Габарити не вказано [13]
3-24 3-27 3-29 3-33	Збірник об'ємом 2 л	4	Збірник сталевий LSR-2L. Тип матеріалу - SUS316L/SUS304. Оснащений пропелерної мішалкою (опціонально). Робочий тиск - 0,1~0,3 МПа. Габарити (мм): 450x450x1410 [14]
МСА-35	Мийно-стерилізаційна установка флаконів	1	Мийно-стерилізаційна установка флаконів MY-Tunnel. Температура стерилізації 280°C-350°C. Кількість пошкоджених флаконів <0,01%. Габарити (мм): 3650×1750×2300 [15]
МСС-36	Мийно-стерилізаційна установка пробок	1	Мийно-стерилізаційна установка пробок НМ SC-U 10. Температура стерилізації 121°C. Робочий тиск 0,09 МПа. Габарити не наведено [16]
АНЗ-37	Автоматична лінія по наповненню та закупорюванню флаконів	1	Лінія моделі НМ VL-FLH400. Точність наповнення: 99,0-99,5%. Швидкість закупорювання: ≥99%. Продуктивність до 150 флаконів/хв [16]

Е-38	Етикувальна машина	1	Етикувальна машина PWM-А. Продуктивність до 50 флаконів/хв. Габарити (мм): 1800×800×1500 [17]
П-39	Пакувальний апарат	1	Картонажна машина Cartoner С 130. Продуктивність до 150 коробок/хв. Габарити не наведено [18]

Примітка: 1 - <https://aff.com.ua/filter-g4-dlia-kruglogo-kanala-100?srsldid=AfmBOopT-lAucwaWENUrIMSopYAgH4M-mFCugUy5bb8PegsA5yGXexz4>, 2 - https://orvent.com.ua/ua/p2530945488-kanalnyj-ventilyator-vents.html?source=merchant_center&utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=iLi on PerfomanceMax MaxConv&utm_content=&utm_term=&gad_source=1&gad_campaignid=23058093835&gbraid=0AAAAA NmefyTtQWr2UMCcOsRmJrB50_Vm&gclid=CjwKCAjw6P3GBhBVEiwAJPjmLtxT1xAfUM_9ufqiBIXBgfOwdKrM2SaPT26tAHATxV0dMXmk19C9lRoCErAQAvD_BwE, 3 - https://turbovent.com.ua/ua/p1499586694-nagrevatel-elektricheskij-kruglyj.html?source=merchant_center&utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=19682279720&utm_network=x&utm_adposition=&utm_device=c&utm_matchtype=&utm_target=&utm_group=&utm_term=&gad_source=1&gad_campaignid=19674346707&gbraid=0AAAAACmQt_kzS7EGWSJB0q0_1Nmi0oAOH&gclid=CjwKCAjw6P3GBhBVEiwAJPjmLtuyp5pWSifzBGvTd-klpVzL9DqlDkCaGPB2FT-vsPqLbiEtrsOwBoCma8QAvD_BwE, 4 - <https://unitech-clima.com.ua/kataloh/zvolozhuvach-povitria/>, 5 - <https://ventfilter.kiev.ua/goods/filtr-vozdushniy-kassetniy-klass-filtratsii-f9/>, 6 - <https://www.filsonfilters.com/ru/%D1%84%D0%B8%D0%BB%D1%8C%D1%82%D1%80-ulpa-u17/>, 7 - <https://www.laboao.com/products/stainless-steel-reactor/5l-lab-jacketed-stainless-steel-reactor>, 8 - <https://packtech.com.ua/uk/obladnannya/dozuvalne/dozatory-ridkykh-produktiv/dzhv-1>, 9 - https://dosingtech.com.ua/uk/product/peristaltichnij-nasos-seko-npr-7-regulovana-vitrata-7-l-god-0-1-bar-sekoflex/?srsldid=AfmBOoqgf-R6O_-YMbmG1I1Za6YZpgMCf5c6GtFiViWtSyzTF1DBPjpy, 10 - https://build.rozetka.com.ua/ua/224004943/p224004943/?gad_source=1&gad_campaignid=22962543828&gbraid=0AAAAADQ2juCjH5awUtACOXxAYoc8Mzx5e&gclid=Cj0KCQjw0Y3HBhCxARIsAN7931U-WZhf_I6OLk2iCi6cj86fFurWVs-TfiqI4iSSkIW9ddWnhHt_AhAaAkXnEALw_wcB, 11 - https://filter.ua/ua/shop/pitevaya_voda/membrannye/obratnyy_osmos/sistema_obratnogo_osmosa_waterbox_ro-6.html, 12 - https://prom.ua/p1377925975-akvadistillyator-biomed-distillyator.html?utm_source=google_product&utm_medium=cpc&utm_content=pla&utm_campaign=KT_cpc_1_5297199152&gad_source=1&gad_campaignid=20983226771&gbraid=0AAAAADBxJSXxVYLTTrbyEke2b7vGVVBrF0&gclid=Cj0KCQjw0Y3HBhCxARIsAN7931XpNPN7rf0Zi1zaZMzZlZ2MSuxVvQGVA8BERdyPHamO1_0LG4M3L0AaAmk5EALw_wcB, 13 - https://bts.net.ua/ua/membrane_filter/membrane-pilot-plants/hfm-053-ultraf-ltrac-yna-p-lotna-ustanovka-z-porozhnistimi-voloknistimi-membranami/, 14 - <https://www.laboao.com/products/stainless-steel-reactor/2l-small-jacketed-stainless-steel-reactor>, 15 - https://shanghai-marya.en.made-in-china.com/product/FObAciITZhfD/China-Marya-China-Pharmaceutical-Injection-Vial-Washing-and-Depyrogenation-Tunnel-Line-Supplier.html?pv_id=1j6svviaq560&faw_id=1j6svvo2v2ed&bv_id=1j6svvqtbfbf&pbv_id=1j6svvfvl686, 16 - <https://hmpharmachine.en.made-in-china.com/product/gtrYNiWVaLhz/China-Rubber-Stopper-Washing-Machine.html>, 17 - https://www.skilmachine.com/shop/ampoule-labeling-machine?gad_source=1&gad_campaignid=22221363552&gbraid=0AAAAACMNEQohOWrETiKc_P5CtcgxUxN2&gclid=Cj0KCQjw0Y3HBhCxARIsAN7931VEVhx83vBr14NK6ehR3d7lo2AOp_e80F_mUf6dBnjYuE1Fh9E7ULMkaAmWnEALw_wcB, 18 - <https://www.uhlmann.de/en/products-and-solutions/cartoners/c-130>

6.5. Опис технологічного процесу

ДР 1. Підготовка вентиляційного повітря

ДР 1.1 Забір атмосферного повітря

Атмосферне повітря забирається за допомогою повітрязабірника (ПЗ-1), встановленого на висоті 15 м, що дозволяє знизити концентрацію пилових часток та біологічних агентів.

ДР 1.2 Перший ступінь очищення повітря

Забране повітря проходить через фільтр грубої очистки (Ф-2), який затримує тверді частки розміром 5 – 10 мкм. Після фільтрації повітря подається на вентилятор (В-3) для створення необхідного напору та далі направляється на електрокалорифер (К-4), де здійснюється контроль температури (20 – 25°C). Наступним етапом є обробка повітря в парозволожувачі (П-5), що забезпечує регулювання вологості до заданого рівня (60%).

ДР 1.3 Другий ступінь очищення повітря

Після парозволожувача повітря надходить на фільтр тонкого очищення (Ф-6), здатний затримувати частинки розміром 0,1– 0,3 мкм. Ефективність очищення на цьому етапі складає 99,97 %.

ДР 1.4 Третій ступінь очищення повітря

Повітря після Ф-6 спрямовується на фільтр надтонкого очищення типу ULPA (Ф-7). На цьому етапі досягається ступінь чистоти 99,999995%. Очищене повітря подається до приміщень класу чистоти А.

ДР 2. Підготовка води для ін'єкцій

ДР 2.1. Пом'якшення водопровідної води

У збірник (З-8) через дозатор (Д-9) заливають 2,5 л води. На технічних вагах відмірюють 7,5 г натрій карбонату, 0,4 г кальцій гідроксиду та 0,05 г натрій ортофосфату. Після внесення реагентів мішалка працює 10 хв для ретельного перемішування, далі воду залишають на 30 хв для випадіння осаду.

ДР 2.2. Видалення осаду та знесолення

Через 30 хв мішалку знову вмикають на 5 хв, щоб підняти осад. Потім суміш за допомогою насосу (Н-10) пропускають через піщаний фільтр (Ф-11), де

затримується більша частина домішок. Після цього вода надходить на установку зворотного осмосу (З-12), де проходить знесолення протягом 30 хв. Очищена вода збирається у резервуар (З-13).

ДР 2.3. Отримання очищеної води

Далі насос (Н-14) подає воду у ще одну установку зворотного осмосу (З-15). Тут фільтри додатково затримують залишкові домішки. Процес триває 30 хв, після чого вода надходить у збірник (З-16).

ДР 2.4. Виробництво води для ін'єкцій

Очищена вода за допомогою насоса (Н-17) надходить у дистиляційну установку (Д-18), де при температурі 100°C протягом 2 годин відбувається дистиляція. Отриманий дистилят збирається у резервуар (З-19). Після цього насос (Н-20) подає його на мікрофільтрацію (М-21) через керамічні фільтри з порами 0,22 мкм. Тривалість процесу – 10 хв. Готова вода для ін'єкцій накопичується у попередньо простерилізованому збірнику (З-22).

ДР 3. Приготування рідкої основи для вакцини

На технічних вагах зважують 160 г сахарози, 6,8 г хлориду натрію, 32 г диметилдіоктадециламонію броміду (DDA), 32 мл полісорбату та 128 г сквалану. Наважки переносять до сталюого реактору (З-24) об'ємом 2 л. За допомогою мірного циліндру доливають 450 мл води для ін'єкцій. Вмикається мішалка для повного перемішування компонентів. Загальний об'єм розчину має становити близько 800 мл. Далі, за допомогою перистальтичного насосу (Н-25) розчин подається на мікрофільтраційну установку (М-26) де проходить крізь фільтри з діаметром пор 0,22 мкм. Такий крок потрібен для зменшення мікробного навантаження під час стерилізації самої рідкої вакцини. Одержаний розчин передається до попередньо простерилізованого збірника (З-27) об'ємом 2 л.

ТП 4. Приготування вакцини проти парвовірусу свиней на основі вірусоподібних частинок

На технічних вагах зважують 84,5 г субстанції ВПЧ парвовірусу свиней. Наважку переносять до збірнику (З-29) об'ємом 2 л. далі, за допомогою перистальтичного насосу (Н-28) до збірника подається 710 мл розчину від ДР 3,

який відміряється за допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-30). Вмикається мішалка для повного перемішування компонентів. Загальний об'єм розчину має становити близько 790 ± 2 мл. Далі, за допомогою перистальтичного насосу (Н-31) розчин подається на мікрофільтраційну установку (М-32) де проходить крізь фільтри з діаметром пор $0,22$ мкм. Одержаний розчин передається до попередньо простерилізованого збірника (З-33) об'ємом 2 л.

ТП 5. Підготовка флаконів та пробок

ТП 5.1. Очищення, висушування та стерилізація флаконів

Скляні флакони об'ємом заповнення 20 мл надходять у мийно-стерилізаційну установку для флаконів (МСА-35). До обладнання підведено очищену воду (ДР 2.3.) та воду для ін'єкцій (ДР 2.4.), що подаються насосами (Н-17 і Н-23). Конструкція апарату передбачає наявність дозуючої системи. Спочатку флакони промиваються очищеною водою, далі обполіскуються водою для ін'єкцій. Вимиті флакони переміщуються в секцію сушіння, де підтримується температура 100°C . Після висушування тара потрапляє в стерилізаційний відсік, де встановлюється температура 315°C . Загальна тривалість циклу становить 3 години. Стерильні флакони вивантажуються з протилежного боку апарату у приміщення класу А, викладаються у металеву дезінфіковану ємність і передаються на етап ТП 6.

ТП 5.2. Очищення, стерилізація та сушіння гумових пробок

Гумові пробки для флаконів завантажують у спеціальний апарат (МСС-36), що здійснює їх миття, стерилізацію та сушіння. Подавання очищеної води (ДР 2.3.) і води для ін'єкцій (ДР 2.4.) відбувається насосами (Н-17 та Н-23). Вбудована дозуюча система регулює подачу рідини. Спочатку пробки промивають очищеною водою, потім – водою для ін'єкцій, яку залишають у камері. Далі проводять попередню стерилізацію у водяній бані при 100°C . Після зливання води пробки піддають стерилізації при температурі 121°C , а на завершальному етапі їх сушать за 70°C . Тривалість усього процесу – 4 години. Стерильні пробки вивантажуються у приміщенні класу А у металеву дезінфіковану ємність та спрямовуються на ТП 6.

ТП 6. Наповнення та закупорка флаконів

На автоматичну лінію (АНЗ-37) подаються: стерильні флакони з ТП 5.1, стерильні пробки з ТП 5.2 та стерильний розчин вакцини з ТП 4 за допомогою перистальтичного насосу (Н-34). У систему також завантажуються алюмінієві кришки. Дозування встановлюється на рівні 20 мл препарату на один флакон, продуктивність – 10 флаконів за хвилину. Лінія розставляє флакони, конвеєр подає їх до дозатора, після чого тара наповнюється розчином. Далі флакони закривають гумовими пробками і закупорюють алюмінієвими кришками. Наповнена продукція вручну переміщується до етикетувальної машини (Е-38) для подальшої обробки. Тривалість процесу – 10 хв, вихід готових флаконів – 42 шт.

ПМФ 7. Пакування, маркування та фасування флаконів вакцини

ПМФ 7.1. Етикетування флаконів

До машини для етикетування (Е-38) подаються готові закупорені флакони. Продуктивність обладнання становить 10 одиниць/хв. Автомат розташовує флакони на конвеєрі та наносить клейову етикетку. На ній вказується назва лікарського засобу, вміст діючої речовини, реєстраційний номер, серія, дата виготовлення та кінцевий термін придатності. Далі флакони вручну передаються на пакувальну машину (П-39). Процес триває 10 хв, вихід – 42 промаркованих флаконів.

ПМФ 7.2. Первинне пакування

Флакони надходять вручну у пакувальну машину (П-39), продуктивність якої складає 10 коробок/хв. Автомат викладає промарковані флакони на конвеєр, формує комплекти по 10 штук, розміщує їх у пластиковий вкладиш, а потім – у картонну коробку разом з інструкцією. Тривалість процесу – 5 хв, вихід – 42 коробок.

ПМФ 7.3. Групове пакування

Картонні коробки, отримані з ПМФ 7.2, вручну складають у велику транспортну тару. На неї наносять номер серії та дату виготовлення препарату. Готова продукція відправляється на склад для зберігання за температури $4\pm 1^{\circ}\text{C}$.

РОЗДІЛ 7

КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА СУБСТАНЦІЇ ВІРУСОПОДІБНИХ ЧАСТИНОК ПАРВОВІРУСУ СВИНЕЙ

7.1. Підбір сучасних методів контролю виробництва вірусоподібних частинок парвовірусу свиней

Контроль якості ВПЧ є критичним етапом у процесі їх виробництва, особливо при створенні вакцин. Для оцінки імуногенності та функціональної активності ВПЧ проводили серію біоаналітичних методів, включно з дослідженням гуморальної та клітинної імунної відповіді на лабораторних мишах.

Для визначення більшості показників (визначення імуногенності, до якої входить визначення антитіл, визначення інгібування гемаглютинації, визначення проліферації лімфоцитів селезінки та вивчення цитокінового профілю) спочатку передбачається імунізація мишей та подальший збір сироваток (Yang et al, 2021).

На початку, очищені PPV ВПЧ розводять у фосфатно-сольовому буфері (PBS) та емульгували з ад'ювантом MONTANIDE™ Gel 01 у кількості 10%. Кінцева концентрація антигену становила 240 мкг/мл. Три групи мишей (n=5) отримують підшкірні ін'єкції (Yang et al, 2021): 20 мкг PPV ВПЧ, 40 мкг PPV ВПЧ та PBS (контроль).

Зразки крові відбирають щотижня протягом 49 днів після імунізації (dpi). Сироватку виділяють інкубацією при 37°C протягом 1 год, далі центрифугують при 3000 об/хв протягом 4 хв та зберігали при – 20 °C (Yang et al, 2021).

Протягом всього терміну аналізу спостерігають за поведінкою піддослідних мишей для оцінки безпечності одержаного препарату (Yang et al, 2021).

В подальшому сироватку використовують для визначення вищезазначених показників.

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	НУХТ БТЕК 02.01.12 КР ПЗ			
Розроб.		Онищенко А.А.			РОЗДІЛ 7 КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА СУБСТАНЦІЇ ВІРУСОПОДІБНИХ ЧАСТИНОК ПАРВОВІРУСУ СВИНЕЙ	Лім.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Скροцька О.І.					115	158
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

7.1.1. Визначення антитіл методом ІФА (ELISA)

Мета цього аналізу базується на визначенні рівня специфічних IgG до PPV у сироватці мишей (Yang et al, 2021).

Метод імуоферментного аналізу (ELISA) ґрунтується на специфічній взаємодії антиген-антитіло. Антигени (в даному випадку очищений VP2-білок) адсорбуються на поверхні лунок планшету. Після додавання сироватки мишей антитіла зв'язуються з антигеном. Далі додається вторинне антитіло, мічене ферментом, яке зв'язується з мишачими IgG. У присутності субстрату фермент каталізує реакцію, що призводить до утворення забарвлення, яке вимірюється спектрофотометрично при довжині хвилі 450 або 490 нм. Результатом такого аналізу є зростання оптичної щільності, що свідчить про вищий титр антитіл (Yang et al, 2021).

Матеріали та реагенти (Yang et al, 2021): 96-лункові планшети Costar Assay Plate (Corning, USA); очищений ВПЧ-білок; буфер PBS, PBST (PBS з 0,05% Tween-20); блокуючий розчин: PBS з 5% знежиреного молока; сироватка мишей (дослідна та контрольна); кон'югат: HRP-зв'язане козине анти-мишаче IgG (1:10 000); субстрат: 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМВ); стоп-реагент: 2 М сірчана кислота (H₂SO₄); спектрофотометр: Eon™ Microplate Reader (BioTek, USA).

У кожен лунку планшета вносили ВПЧ-білок (попередньо очищений) у буфері PBS. Інкубували при +4°C або кімнатній температурі протягом ночі (стандартно 12 – 18 год). Планшети обробляли блокуючим розчином (PBS з 5% знежиреного молока та 0,05% Tween-20). Інкубували при кімнатній температурі (RT) 1 годину для запобігання неспецифічній адсорбції білків. Вносили по 100 мкл серійно розведених сироваток мишей у кожен лунку. Інкубували 1 годину при кімнатній температурі. Планшети промивали 3 – 5 разів буфером PBST (PBS + 0,05% Tween-20) для видалення незв'язаних білків. Додавали HRP-кон'юговане козине анти-мишаче IgG (розведення 1:10 000). Інкубували при 37°C протягом 40 хв. Планшети знову промивали 5 разів PBST для видалення незв'язаного кон'югату. Додавали 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМВ) як хромоген. Інкубували 10 хв при кімнатній температурі у темряві. Колір реакції

змінювався на синій. Додавали 50 мкл 2 М H_2SO_4 , що переводило колір із синього в жовтий. Оптичну щільність (OD) вимірювали на мікропланшетному фотометрі при 450 нм. Чим вища OD, тим вищий титр специфічних IgG (Yang et al, 2021).

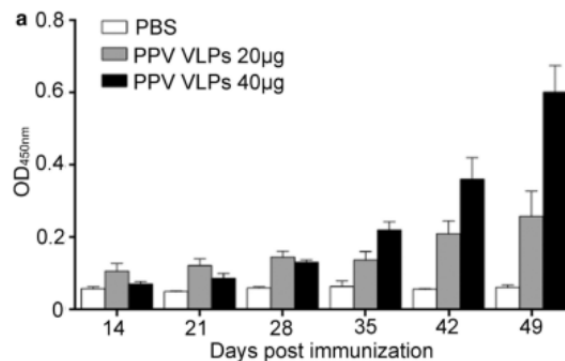


Рис.7.1. Титри антитіл IgG до PPV у сироватках мишей, імунізованих ВПЧ PPV. Мишей імунізували 20 мкг або 40 мкг вакцини ВПЧ PPV та PBS як контроль (Yang et al, 2021)

Тож, спираючись на інформацію з рис.4.1. титр антитіл IgG при імунізації 20 мкг або 40 мкг вакцини ВПЧ PPV на 49 день має становити близько 0,3 та 0,6 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ (Yang et al, 2021).



Рис.7.2. Спектрофотометр : Eon™ Microplate Reader (BioTek, USA)

[<https://www.labwrench.com/equipment/12982/biotek-eon>]

7.1.2. Визначення інгібування гемаглютинації (HI)

Метою цього аналізу є перевірка здатності сироватки мишей нейтралізувати гемаглютинувальну активність ВПЧ (Yang et al, 2021).

Метод інгібування гемаглютинації ґрунтується на здатності вірусних частинок аглютинувати еритроцити. У присутності специфічних антитіл ця здатність блокується (Yang et al, 2021).

Підготовка сироватки: інактивація при 56 °С протягом 30 хв; видалення неспецифічних інгібіторів обробкою 25% каоліном і 3% еритроцитами свиней. Далі сироватку розводили серійно 1:4. Додавали 25 мкл PPV ВПЧ (40 мкг/мл), інкубували 1 год при 37°С. Додавали 1% еритроцити свиней та інкубували при кімнатній температурі 40 хв. HI-титр визначали як обернене значення найвищого розведення сироватки, яке повністю інгібувало гемаглютинацію (Yang et al, 2021).

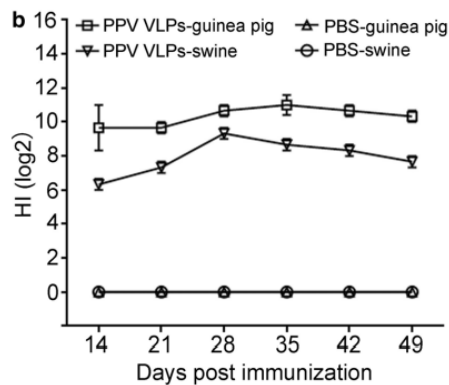


Рис.7.3. Аналіз гемаглютинації ВПЧ парвовірусу свиней (Yang et al, 2021)

Після імунізації за 14 дні титри \log_2 HI мають досягати приблизно 6 для специфічних антитіл до PPV. Після 28 дні титри HI майже у всіх мишей мають зрости до значень приблизно 8 (Yang et al, 2021).

7.1.3. Проліферативна відповідь лімфоцитів

Клітини селезінки, стимульовані мітогеном (Конканавалін А), активуються і починають ділитися. Проліферація вимірюється за допомогою метаболічного тесту з набором CellTiter 96® AQueous One, який містить субстрат, що перетворюється в кольоровий продукт живими клітинами. Інтенсивність забарвлення вимірюється спектрофотометрично на 490 нм. Наприкінці розраховується індекс стимуляції (SI) – співвідношення OD_{490} у стимульованих і не стимульованих клітин (Yang et al, 2021).

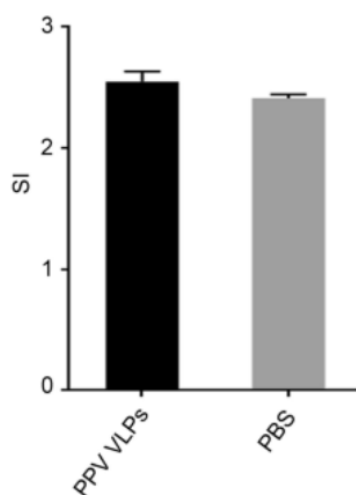


Рис.7.4. Результати визначення індексу стимуляції ВПЧ парвовірусу свиней (Yang et al, 2021)

Лімфоцити селезінки, виділені з мишей після 42 дні, мають показувати швидку реакцію на стимуляцію мітогеном, проліферацію *in vitro*, і, як наслідок, вищий показник SI, ніж група негативного контролю (на PBS). Цей показник має становити близько 2,5 одиниць (Yang et al, 2021).

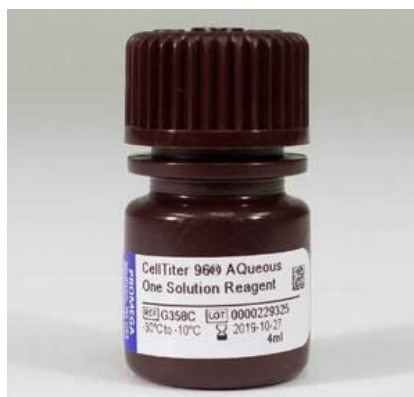


Рис.7.5. Реагент, що використовується для визначення поліферації лімфоцитів мишей

[<https://www.avantorsciences.com/us/en/product/4693158/celltiter-96-aqueous-one-solution-cell-proliferation-assay-promega>]

7.1.4. Визначення кількості цитокінів

Метод цитофлуориметрії з мікросферними реактивами (Cytometric Bead Array, CBA) базується на виявленні цитокінів за допомогою кульок, покритих специфічними антитілами, які флюоресціюють при збудженні. Аналіз проводиться на проточному цитофлуориметрі (Yang et al, 2021).

В результаті отримують кількісні дані щодо рівнів цитокінів Th1/Th2-профілю (наприклад, IFN- γ , IL-4, IL-10 тощо), що дозволяє оцінити тип імунної відповіді (Yang et al, 2021).

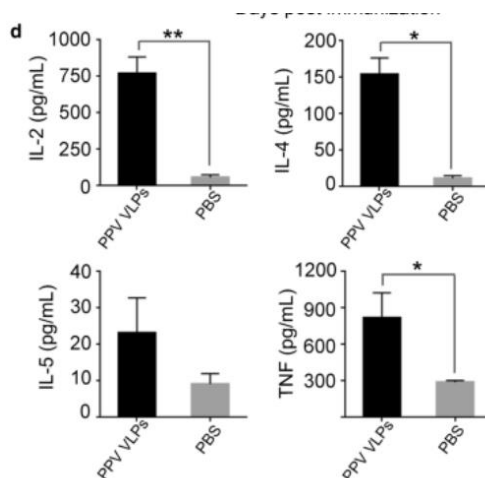


Рис.7.6. Рівні цитокінів, що секретуються лімфоцитами мишей при 56 dpi (Yang et al, 2021)

Тож, спираючись на рис.4.6. рівень цитокінів на 56 dpi має становити: IL-2 \approx 750 пг/мл, IL-4 \approx 150 пг/мл, IL-5 \approx 23 пг/мл, TNF \approx 850 пг/мл (Yang et al, 2021).



Рис.7.7. Набір для визначення кількості цитокінів [https://www.bio-rad.com/en-ua/category/bio-plex-multiplex-immunoassays?ID=O5BUUA15&s_kwid=AL%2118120%213%21684611017415%21b%21%21g%21%21cytokine+panels%2120066746272%21149073042936&WT_mc_id=250124045034&WT_srch=1&WT_knsh_id=kenshoo_clickid_&gad_source=1&gad_campaignid=20066746272&gbraid=0AAAAAD4vkvATUPsnqAXye8es083_laaRR&gclid=CjwKCAjw24vBBhABEiwANFG7yyeRI3YcgwrJ4A1AGHpvjNFs21eEjOFgDm7mde9qQUEiDLa26fzcyRoC-j0QAvD_BwE]

7.1.5. Оцінка ступеня чистоти вірусоподібних частинок

Для оцінки чистоти ВПЧ використовується електрофорез у поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію (SDS-PAGE) (Yang et al, 2021).

SDS-PAGE дозволяє розділяти білки за їх молекулярною масою. Додавання детергенту SDS денатурує білки та надає їм негативного заряду, що дозволяє порівняти їхню електрофоретичну рухливість. Ступінь чистоти білка (VP2) оцінюють візуально за наявністю або відсутністю додаткових смуг у гелі (Yang et al, 2021).

Клітинні зразки, що містять ВПЧ, розводили у співвідношенні 1:10 фосфатно-сольовим буфером (PBS). Клітини лізували за допомогою методу руйнування скляними кульками. Таким самим чином готували зразок очищеного ВПЧ (40 мкг/мл). Отримані білки аналізували шляхом SDS-PAGE. Гель фарбували (наприклад, Coomassie Blue) та візуально визначали наявність VP2 та домішок (Yang et al, 2021).

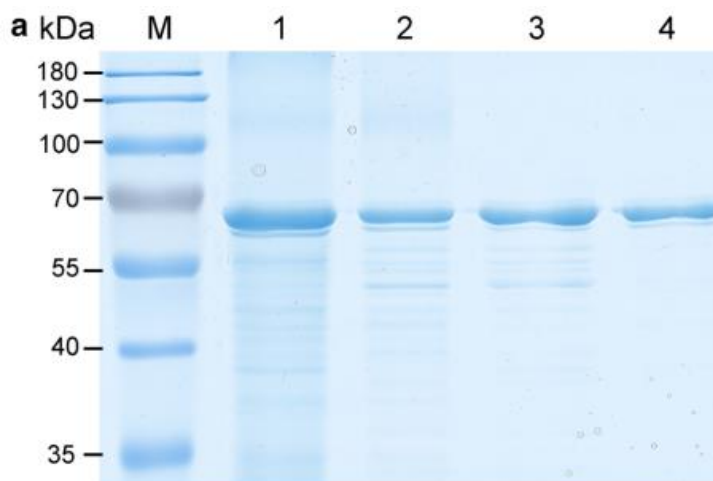


Рис.7.8. Електрофоретичний аналіз очистки ВПЧ парвовірусу свиней (Yang et al, 2021)

Наявність однієї домінуючої смуги, що відповідає очікуваній молекулярній масі VP2 (~64 кДа), свідчить про високий ступінь чистоти ВПЧ. Додаткові смуги вказують на залишкові домішки білків клітинного походження або частково зруйновані білкові субодиниці (Yang et al, 2021).

7.1.6. Визначення розміру вірусоподібних частинок

Для цього визначення використовується трансмісійна електронна мікроскопія (ТЕМ) (Yang et al, 2021).

Обладнання (Yang et al, 2021): електронний мікроскоп JEM-2100 (JEOL, Токуо, Японія)

Напруга прискорення: 120 кВ

Трансмісійна електронна мікроскопія дозволяє отримувати зображення біологічних наноструктур з високою роздільною здатністю. Після негативного контрастування частинок (зазвичай солями важких металів) вони стають видимими як світлі об'єкти на темному фоні. Це дозволяє точно виміряти їхній діаметр і оцінити морфологію (Yang et al, 2021).

Зразки ВПЧ наносили на мідні сітки, покриті вуглецевою плівкою. Після 5 хвилин адсорбції при кімнатній температурі сітки просували фільтрувальним папером. Частинки негативно забарвлювали 3% фосфовольфрамисловою кислотою (РТА). Зразки аналізували за допомогою ТЕМ при 120 кВ. На мікрофотографіях були чітко візуалізовані сферичні структури, що відповідають вірусоподібним частинкам парвовірусу. Середній діаметр частинок зазвичай становить близько 20–25 нм, що узгоджується з описаними в літературі характеристиками капсидів парвовірусу. Відсутність агрегації або структурних дефектів вказує на високу морфологічну стабільність ВПЧ (Yang et al, 2021).

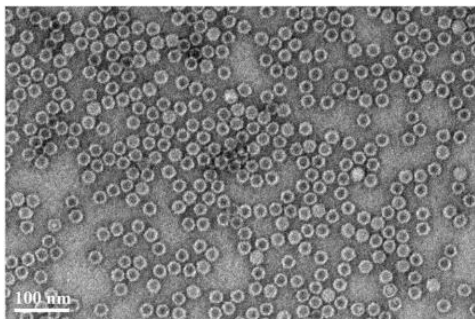


Рис.7.9. ТЕМ зображення ВПЧ парвовірусу свиней (Yang et al, 2021)

За наявними дослідженнями, білки VP2 *K. marxianus* збираються в ВПЧ діаметром приблизно 20 нм (Yang et al, 2021).

7.1.7. Визначення вологості субстанції вірусоподібних частинок

Для цього використовується гравіметричний аналіз з використанням вологоаналізатора [\[https://www.sartorius.com/en/products/weighing/moisture-analysers/ma-moisture-analyzers-and-moisture-meters-for-every-application\]](https://www.sartorius.com/en/products/weighing/moisture-analysers/ma-moisture-analyzers-and-moisture-meters-for-every-application).

Обладнання [\[https://www.sartorius.com/en/products/weighing/moisture-analysers/ma-moisture-analyzers-and-moisture-meters-for-every-application\]](https://www.sartorius.com/en/products/weighing/moisture-analysers/ma-moisture-analyzers-and-moisture-meters-for-every-application):

Вологоаналізатор з інфрачервоним нагрівом (наприклад, Sartorius MA35 або аналогічна модель).

Метод базується на вимірюванні втрати маси зразка під час контрольованого нагрівання. У вологоаналізаторі зразок зважується до та після сушіння при заданій температурі. Різниця у вазі відповідає вмісту вологи, що випарувалася. Після завершення аналізу прилад автоматично обчислює та відображає відсоткову вологість зразка.

У чашку вологоаналізатора вносили навішування зразка субстанції ВПЧ (~1–2 г). Температура сушіння: 105 °С до постійної маси (визначається автоматично приладом за стабілізацією маси). Після завершення сушіння відсотковий вміст вологи фіксувався автоматично. Низький вміст вологи (<5%) є бажаним для запобігання гідролізу, агрегації або мікробного росту.



Рис.7.10. Вологоаналізатор Sartorius MA35

[\[https://www.sartorius.com/en/products/weighing/moisture-analysers/ma-moisture-analyzers-and-moisture-meters-for-every-application\]](https://www.sartorius.com/en/products/weighing/moisture-analysers/ma-moisture-analyzers-and-moisture-meters-for-every-application)

7.2. Методи контролю вакцини проти парвовірусу свиней на основі вірусоподібних частинок

Лікарський засіб «Вакцина проти парвовірусу свиней на основі вірусоподібних частинок» представлений у вигляді рідкого препарату у флаконі місткістю 20 мл. Кожен флакон містить 2130 мг вірусоподібних частинок парвовірусу свиней. Допоміжні речовини: сахароза, хлорид натрію, диметилдіоктадециламонію бромід, полісорбат та сквалан. Препарат призначений для вакцинації свиноматок проти парвовірусу.

Специфікація на лікарський засіб наведена у таблиці 7.1.

Таблиця 7.1

СПЕЦИФІКАЦІЯ

Найменування показників контролю	Допустимі межі	Методи контролю
1	2	3
Опис	Однорідна прозора рідина з жовтуватим відтінком без наявних сторонніх включень	За п. 1 АНД, візуально
Мікробіологічний контроль	Має бути стерильним	За п. 2 АНД, висівом на чашки Петрі ДФУ 2.6.1
Пірогени	Має бути апірогенною	За п.3 АНД, візуально ДФУ 2.6.8
Токсичність	Має бути нетоксичним	За п.4 АНД, ДФУ 2.6.9
Прозорість та каламутність рідини	Має бути прозорою, без включень та каламуті	За п.5 АНД, ДФУ 2.2.1
Контроль домішок	Мають бути відсутніми	За п.6 АНД, ДФУ 2.2.27
Об'єм що витягається	Надлишковий об'єм має становити 0,1 мл	За п.7 АНД, ДФУ 2.9.17
Механічні включення	Не більше 3%	За п. 8 АНД, ДФУ, 2.9.19

1. Опис

Препарат представляє собою прозорий розчин без видимих каламуті, сторонніх домішок або механічних включень. Візуальна оцінка здійснюється відповідно до встановлених методичних рекомендацій.

2. Мікробіологічний контроль (ДФУ 2.6.1)

Випробування на стерильність проводять за умов асептики, використовуючи ламінарний бокс класу А, розташований у приміщенні класу В або ізолятор. Заходи, що застосовуються для запобігання мікробному забрудненню, не повинні впливати на мікроорганізми, присутні у зразку. Контроль умов виконують регулярно шляхом аналізу проб, відібраних у робочій зоні.

Для перевірки стерильності використовують живильні середовища:

Тіогліколеве середовище призначене для вирощування анаеробних бактерій, але може застосовуватись і для аеробних бактерій.

Соєво-казеїнове середовище застосовується для росту аеробних бактерій та грибів.

Склад тіогліколевого середовища (г/л):

Гідролізат казеїну – 15,00

Дріжджовий екстракт – 5,00

Глюкоза – 5,50

Натрію хлорид – 2,50

L-цистин – 0,50

Натрію тіогліколят – 0,50

Резазурін – 0,001

Агар-агар – 0,75

pH при 25°C – 7,1 ± 0,2

Склад соєво-казеїнового середовища (г/л):

Панкреатичний гідролізат казеїну – 17,0

Папаїновий гідролізат соєвої муки – 3,0

Натрію хлорид – 5,0

Дикалію гідрофосфат – 2,5

Глюкози моногідрат – 2,5

Агар-агар – 0,75

pH після стерилізації – 7,3 ± 0,2

Інкубацію проводять протягом 14 діб при температурі 30–35 °С для бактерій та 20–25 °С для грибів. Відсутність росту мікроорганізмів підтверджує стерильність препарату.

3. Випробування на пірогени (ДФУ 2.6.8)

Оцінка пірогенності здійснюється шляхом вимірювання підвищення температури тіла кроликів після внутрішньовенного введення стерильного розчину.

Добір тварин: застосовують здорових статевозрілих кроликів масою $\geq 1,5$ кг, які отримують збалансоване харчування без антибіотиків і зберігають масу тіла протягом тижня перед випробуванням. Тварини, що використовувалися у пірогенних тестах протягом останніх 3 днів або 3 тижнів у невдалих випробуваннях, до тесту не допускаються.

Попереднє випробування: за 1–3 дні до основного тесту кроликам внутрішньовенно вводять 10 мл/кг апірогенного розчину натрію хлориду (9 г/л, 38,5 °С) і фіксують температуру за 90 хв до ін'єкції та протягом 3 год після введення. Тварини з температурною зміною $>0,6$ °С виключаються.

Основне випробування: проводять на групі із трьох кроликів. Розчин випробовуваного препарату нагрівають до $\sim 38,5$ °С та вводять повільно у крайову вену вуха протягом ≤ 4 хв, об'єм 0,5–10 мл/кг маси тіла. Вихідну температуру визначають як середнє двох показань з інтервалом 30 хв до введення; максимальна температура — найвища за 3 год після ін'єкції. Реакцію кролика обчислюють як різницю між максимальною та вихідною температурою. Кролики з вихідною температурою $>39,8$ °С або $<38,0$ °С, або з відхиленнями $>0,2$ °С між показаннями виключаються.

4. Токсичність (ДФУ 2.6.9)

Оцінюють внутрішньочеревним введенням однієї дози, але не >1 мл, п'ятьом здоровим мишам (17–22 г). Спостереження триває 7 діб. Випробування вважають пройденим, якщо не виявлено ознак інтоксикації або смерті більше однієї тварини. У разі негативного результату тест повторюють на другій групі.

Також тест проводять на двох морських свинках (250–350 г) із введенням однієї людської дози, але не >5 мл. Спостереження триває 7 діб; критерії відповідності аналогічні.

5. Прозорість та каламутність (ДФУ 2.2.1)

Прозорість рідини визначають у прозорих пробірках (діаметр 15 – 25 мм, шар 40 мм) шляхом порівняння з еталонами I та II за розсіянням світла. Рідина вважається прозорою, якщо її каламутність не перевищує каламутності еталона I.

Приклади реактивів:

Гідразин сульфату, розчин 1,0 г/100 мл

Гексаметилентетрамін, розчин 2,5 г/25 мл

Вихідна суспензія: 25 мл гідразину сульфату + розчин гексаметилентетраміну, витримка 24 год.

Основна суспензія: 15 мл вихідної суспензії доводять до 1000 мл водою, термін придатності – 24 год.

6. Контроль домішок (ДФУ 2.2.27)

Визначають за методом внутрішньої нормалізації, використовуючи різні концентрації випробовуваної субстанції як розчини порівняння. Регламент контролю домішок може бути одно-, дво- або трирівневим. Тривалість та інтенсивність плям на хроматограмі порівнюють із розчинами порівняння, не перевищуючи встановлених нормативних значень.

7. Визначення об'єму витягання (ДФУ 2.9.17)

Об'єм зразка визначають у мірному циліндрі, заповнивши ≥ 40 % його номінального об'єму. Об'єм витягання повинен відповідати зазначеному на контейнері.

8. Контроль механічних включень (ДФУ, 2.9.19)

Використовують прилади на принципі світлоблокування для автоматичного визначення кількості та розмірів часток (5 – 25 мкм). Проби перемішують повільно, уникаючи агрегації та внесення забруднень. Визначають середню кількість часток у чотирьох пробах ≥ 5 мл.

9. Пакування та маркування

[<https://resource.odmu.edu.ua/chair/download/133396/8e5jKO8jRTCQxgSpdmmaB/A/%D0%94%D0%A4%D0%A3%20%D1%874.pdf>]

По 1 скляному флакону на 20 мл укладають у пачку разом з інструкцією. Групова та транспортна тара відповідно до ДСТУ 2890-94.

На флаконі зазначають: назву препарату, серію та термін придатності. На пачці та груповій тарі – виробника, країну, торговельний знак, лікарську форму, кількість доз, умови застосування, умови зберігання та інші реквізити.

10. Транспортування та зберігання

[<https://resource.odmu.edu.ua/chair/download/133396/8e5jKO8jRTCQxgSpdmmaB/A/%D0%94%D0%A4%D0%A3%20%D1%874.pdf>]

Препарат транспортують у закритих транспортних засобах при температурі 2–8°C. Зберігають у недоступному для дітей місці при температурі 2–8°C.

11. Термін придатності

2 роки. Для поліпропіленових контейнерів після першого відкриття – не більше 2 тижнів.

РОЗДІЛ 8

ПРОЄКТ ЗАЯВКИ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

Назва: «Спосіб одержання вірусоподібних частинок парвовірусу свиней із використанням дріжджів *Kluuveromyces marxianus*»

8.1. Галузь і застосування корисної моделі

Корисна модель належить до галузі біотехнології, зокрема до молекулярної біотехнології мікроорганізмів, та може бути використана у ветеринарній медицині для одержання вірусоподібних частинок (VLP) парвовірусу свиней. Запропонований спосіб забезпечує безпечно та економічно ефективно виробництво VLP, які можуть бути використані як основа для розробки профілактичних вакцин проти парвовірусної інфекції у тварин (Laxmi et al., 2025).

Використання GRAS-організму *K. marxianus* як продуцента дозволяє уникнути застосування патогенних вірусів або тваринних клітинних ліній, що підвищує біобезпеку процесу та відповідає сучасним вимогам сталого розвитку у сфері фармацевтичного та ветеринарного виробництва (Reina-Posso, & Gonzales-Zubiate, 2025).

8.2. Відомі аналоги та їх основні недоліки

На сьогодні відомо кілька підходів до одержання вірусоподібних частинок (VLP) парвовірусу свиней (Porcine parvovirus, PPV), які базуються на експресії капсидного білка VP2 у різних гетерологічних системах: бакуловірусно-комаховій (Zhou, Yao, & Cui, 2010), еукаріотичних клітинних лініях (Sookhoo et al., 2024), бактеріях роду *Escherichia* (Wang et al., 2020), дріжджах *Saccharomyces cerevisiae* (Тамошіūнас et al., 2014), а також у рослинах (Kheirvari, Liu, & Tumban, 2023). Хоча всі ці системи дають змогу формувати морфологічно подібні до природного вірусу структури, кожна з них має низку обмежень, які ускладнюють їхнє промислове застосування.

					<i>НУХТ БТЕК 02.01.12 КР ПЗ</i>		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Онищенко А.А.			РОЗДІЛ 8 ПРОЄКТ ЗАЯВКИ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ		
Перевір.		Скряцька О.І.					
Реценз.							
Н. Контр.							
Затверд.		Стабніков В.П.					
					Лім.	Арк.	Аркушів
						129	158
					<i>Кафедра БТМ</i>		

1. Система експресії на основі бакуловірусу та клітин лінії Sf9 (комахи) (Zhou, Yao, & Cui, 2010)

Такий підхід передбачає трансфекцію клітин *Spodoptera frugiperda* рекомбінантним бакуловірусом, що експресує білок VP2. Хоча отримані VLP мають високу імуногенність та подібну до нативного вірусу морфологію, система є дорогою, трудомісткою та потребує складних умов культивування. До недоліків належать: використання тваринних компонентів у середовищі (ризик контамінації); висока собівартість продукції; труднощі масштабування через чутливість клітин до змін умов; потреба у знезараженні від вірусних залишків бакуловірусу.

2. Система експресії у клітинах ссавців (наприклад, HEK293 або Vero) (Sookhoo et al., 2024)

Використання трансфікованих клітинних ліній людини або мавп дозволяє отримати VLP із глікозилуванням, близьким до природного. Однак такі системи мають серйозні обмеження щодо безпеки (риск інтеграції ретровірусоподібних елементів), є складними у технічному обслуговуванні та суттєво дорогими. Крім того, потрібні стерильні умови та контроль на наявність ендогенних вірусів клітинної лінії.

3. Бактеріальні системи (*Escherichia coli*) (Wang et al., 2020)

Відомі роботи з експресії VP2 у *E. coli*, однак через відсутність посттрансляційної модифікації та високої ймовірності агрегації білка у вигляді включень (inclusion bodies), утворення коректно змонтованих VLP є утрудненим. Для відновлення структури VP2 необхідна стадія рефолдингу з денатурацією білка, що значно знижує вихід продукту і ускладнює виробничий процес. Також можливе формування білків, що не є імуногенними.

4. Системи на основі дріжджів *S. cerevisiae* (Tamošiūnas et al., 2014)

Попри GRAS-статус, *S. cerevisiae* часто демонструє обмежену ефективність експресії гетерологічних вірусних білків великого розміру через глікозилування та неспецифічне фолдінгування. У деяких випадках спостерігалось утворення неправильних агрегатів замість повноцінних

вірусоподібних частинок. Крім того, ферментативна активність *S. cerevisiae* може призводити до деградації білка у цитоплазмі.

5. Рослинні системи (наприклад, *Nicotiana benthamiana*) (Kheirvari, Liu, & Tumban, 2023)

Використання рослин для експресії VP2 шляхом агробактеріальної трансформації є перспективним, однак має суттєві технологічні обмеження: тривалий час культивування, складна система очищення VLP з рослинного матриксу, необхідність контрольованих умов вирощування та складна логістика біомаси.

Нижче наведено короткий узагальнений список основних недоліків відомих аналогів, згрупований за типами систем експресії VP2 парвовірусу свиней:

1. Клітинні лінії комах + бакуловірусна система (Zhou, Yao, & Cui, 2010): висока собівартість виробництва; складна система культивування (чутливі клітини); ризик контамінації залишками бакуловірусу; високі вимоги до стерильності та біобезпеки; труднощі масштабування.

2. Клітинні лінії ссавців (HEK293, Vero) (Sookhoo et al., 2024): дорогі поживні середовища; повільний ріст клітин; ризик ендогенних вірусів у клітинних лініях; високі біобезпекові вимоги; складне масштабування процесу.

3. Бактерії *E. coli* (Wang et al., 2020): немає посттрансляційної модифікації білків; часто утворюються включення (inclusion bodies); потреба у стадії денатурації/рефолдингу білка; низький вихід правильно сформованих VLP; продукт може бути неімуногенним.

4. Дріжджі *S. cerevisiae* (Tamošiūnas et al., 2014): низька ефективність експресії великих білків; неправильне фолдингування або агрегація білка; надмірне або некоректне глікозилювання; деградація білка в цитоплазмі.

5. Рослинні системи (наприклад, *N. benthamiana*) (Kheirvari, Liu, & Tumban, 2023): тривалий цикл виробництва; складне очищення VLP із тканин рослин; потреба у спеціалізованих умовах вирощування; нестабільність експресії; низький вихід продукту у перерахунку на масу сировини.

Аналіз аналогів свідчить про відсутність універсальної, ефективної та водночас економічно вигідної системи для біосинтезу вірусоподібних частинок парвовірусу свиней. Проблеми масштабування, високі витрати, складні стадії очищення, відсутність GRAS-статусу або необхідність рефолдингу білка залишають запит на нову біобезпечну та сталу альтернативу – таку, як запропонований спосіб із використанням *K. marxianus* (Yang et al., 2021).

8.3. Постановка задачі корисної моделі та її вирішення

Існуючі біотехнологічні системи отримання вірусоподібних частинок (VLP) парвовірусу свиней мають суттєві недоліки, які ускладнюють їхнє широке застосування у ветеринарній медицині. До основних проблем належать висока вартість виробництва, складність масштабування, використання патогенних вірусів або тваринних клітин, ризики контамінації, низька вихідність продукту та складність його очищення (Schwarz, & Douglas, 2015).

Тому задачою корисної моделі є створення ефективного, безпечного та економічно доцільного способу одержання вірусоподібних частинок парвовірусу свиней, який би забезпечував (Gao et al., 2022): високу експресію капсидного білка VP2; формування коректних, імуногенних VLP; використання GRAS-організму з можливістю культивування на дешевих відновлюваних субстратах; спрощену технологію очищення кінцевого продукту; мінімізацію екологічного навантаження виробництва; можливість масштабування під індустріальні потреби.

Поставлена задача вирішується за рахунок застосування генно-інженерного способу експресії капсидного білка VP2 парвовірусу свиней у дріжджах *K. marxianus*, які є GRAS-організмом (Yang et al., 2021) і здатні швидко рости на дешевих, відновлюваних поживних середовищах, включно з агропромисловими відходами.

У процесі реалізації способу (Yang et al., 2021): 1) клонують ген VP2 у відповідний експресійний вектор, оптимізований для *K. marxianus*; 2) трансформують дріжджі та відбирають штами з високою продуктивністю; 3) культивують трансформовані клітини у ферментерах з контролем умов росту для

максимізації експресії VP2; 4) забезпечують самозбірку білка VP2 у вірусоподібні частинки; 5) очищують VLP методом ультрафільтрації, хроматографії або іншими доступними способами; 6) отримують кінцевий продукт із високою чистотою та імуногенністю, придатний для виробництва вакцин.

Запропонований спосіб дозволяє значно знизити собівартість, підвищити біобезпеку, спростити технологічний процес та відповідати сучасним стандартам сталого розвитку в біотехнології.

8.4. Опис запропонованого способу

Запропонований спосіб отримання вірусоподібних частинок (VLP) парвовірусу свиней базується на генно-інженерній експресії капсидного білка VP2 у дріжджах *K. marxianus*.

Основні етапи способу включають (Yang et al., 2021):

1. Конструювання експресійного вектора та трансформація дріжджів

Ген, що кодує капсидний білок VP2 парвовірусу свиней штаму Kresse (GenBank U44978.1), був оптимізований з урахуванням кодонної переваги дріжджів *Kluuveromyces marxianus* для підвищення ефективності його експресії. Оптимізований синтетичний ген VP2 був замовлений і виготовлений компанією Genewiz Biotechnology Co., Ltd (Сучжоу, Китай). Для подальшої клінічної роботи ген VP2 було ампліфіковано із застосуванням високофідельної ДНК-полімерази Phanta® Super Fidelity (Vazyme, Нанкін, Китай) із використанням специфічних олігонуклеотидних праймерів, які містять гомологічні послідовності до ділянок вектора pUKD-N115 (послідовності праймерів: 5'-TTTTTTGTTAGATCCGCGGATGAGCGAAAACGTGGAGC-3' та 5'-AGCTTGCGGCCTTAACSTAGTCTAGTACA АСТТТСТТGGG-3'). Отриманий амплікон гена VP2 був лігований із лінеаризованим вектором pUKD-N115, розрізаним рестриктазами Eco RI та Hind III, за допомогою методу збірки Гібсона, що забезпечує точне та ефективно клонування без зайвих залишків. Отриманий рекомбінантний конструкт безпосередньо трансформували у

генетично модифікований штам *K. marxianus* FIM-1 ΔURA3 методом літій-ацетатної трансформації.

Трансформанти відбирали на селективних SD-чашках (0,67% YNB, 2% глюкози, 2% агар) та підтверджували наявність гена VP2 шляхом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) із праймерами, специфічними до фрагменту гена VP2 (5'-ATGAGCGAAAACGTGGAGC-3' та 5'-CTAGTACA ACTTTCTTGGG-3'). Позитивний трансформант, що експресував ген VP2, позначали як штам KM-PPV-VP2 і використовували для подальших досліджень та культивування.

2. Умови культивування

Ферментацію трансформованих дріжджів *Kluyveromyces marxianus* штаму KM-PPV-VP2 з високою щільністю клітин проводили у 5-літровому лабораторному ферментері (модель ВХВІО, Шанхай, Китай), відповідно до протоколу, описаного раніше.

Спочатку штам інокулювали у 200 мл поживного середовища YD (2% дріжджового екстракту, 4% глюкози) і культивували при температурі 30 °C із інтенсивним перемішуванням (220 об/хв) протягом 18 годин. Після досягнення логарифмічної фази росту культуру переносили у ферментер, що містив 2 літри визначеного мінерального середовища.

Під час ферментації підтримували такі параметри: температура – 30 °C, рівень розчиненого кисню – не менше 10% (контрольовано датчиком кисню), автоматичне регулювання рН на рівні 5,5 за допомогою додавання гідроксиду амонію.

Для моніторингу процесу у визначені проміжки часу збирали по 10 мл культури, визначали оптичну густину при 600 нм (OD600) та масу вологих клітин (WCW).

Для аналізу експресії білка VP2 клітинні зразки розводили у співвідношенні 1:10 у фосфатно-сольовому буфері PBS, після чого руйнували клітини за допомогою механічного лізису скляними кульками згідно з описаною вище методикою.

Кількісний аналіз вірусоподібних частинок (VLP) здійснювали за допомогою гелі-фільтраційної хроматографії на системі Agilent серії 1100 (Agilent Technologies, Вальдбронн, Німеччина) з використанням колонки TSKgel G4000 SWXL (300 мм × 7,8 мм внутрішній діаметр) та захисної колонки TSKgel SWXL (40 мм × 6 мм внутрішній діаметр) (Tosoh Bioscience, Штутгарт, Німеччина), відповідно до стандартних протоколів.

3. Виділення та очищення VLP

Для очищення вірусоподібних частинок парвовірусу свиней (VLP PPV) клітинну масу дріжджів *K. marxianus* суспендували у фосфатно-сольовому буфері (PBS) з рН 7,4 та піддавали гомогенізації під високим тиском для руйнування клітинної стінки.

Отриманий клітинний лізат регулювали до рН 4,0, після чого центрифугували при 10 000 об/хв та температурі 4°C протягом 30 хвилин для відділення клітинних залишків.

Очищений супернатант із регульованим рН завантажували на колонку ХК 50/30 (GE Healthcare), заповнену 400 мл іонообмінної смоли Capto S ImpAct. Вірусоподібні частинки, зв'язані на колонці, елюювали 20 мМ натрій-ацетатним буфером, що містив 500 мМ NaCl.

Для підвищення виходу VLP, осади клітинного лізату з регульованим рН повторно розчиняли у рівному об'ємі 20 мМ Tris-HCl буфера з рН 8,0. Освітлений супернатант після центрифугування повторно пропускали через колонку ХК 50/30, заповнену 400 мл іонообмінної смоли Capto Q XR. Елюцію здійснювали 20 мМ Tris-HCl буфером (рН 8,0) з додаванням 500 мМ NaCl.

Отримані фракції VLP діафільтрували протягом 10 об'ємів PBS на системі ÄKTA flux (GE Healthcare, США) із застосуванням колонки із молекулярною вагою зрізу 750 кДа (11-0005-50, GE Healthcare).

Подальше доочищення вірусоподібних частинок виконували на системі AKTA Purifier 100 (GE Healthcare, США) з використанням колонки HiPrep™ 26/60 Sephacryl® S-500 HR (GE Healthcare). Близько 4 мл очищеного зразка завантажували на колонку і елюювали фракції PBS зі швидкістю 0,5 мл/хв.

Концентрацію білка у фракціях визначали спектрофотометрично за допомогою набору BCA (23 250, Thermo Fisher Scientific).

Запропонований спосіб дозволяє отримати стабільні, безпечні та імуногенні вірусоподібні частинки парвовірусу свиней із високим виходом, що робить його ефективним для застосування у виробництві вакцин із урахуванням принципів сталого розвитку.

8.5. Формула корисної моделі

Спосіб одержання вірусоподібних частинок парвовірусу свиней, який включає: конструювання експресійного вектора, що містить оптимізований під *Kluuveromyces marxianus* ген капсидного білка VP2; трансформацію дріжджів *Kluuveromyces marxianus* цим вектором; культивування трансформованих клітин у поживному середовищі з контролем температури, рН і аерації; індукцію експресії білка VP2 та формування вірусоподібних частинок у клітинах; збір клітинної маси та лізис клітин для виділення VLP; очищення VLP із застосуванням послідовної іонообмінної хроматографії, діафільтрації та гель-фільтраційної хроматографії; отримання кінцевого продукту – вірусоподібних частинок парвовірусу свиней високої чистоти і стабільності.

Спосіб за п. 1, який відрізняється тим, що для трансформації дріжджів застосовують літій-ацетатну методику. Спосіб за п. 1 або 2, який відрізняється тим, що культивування здійснюють при температурі близько 30°C, рН 5,5 та рівні розчиненого кисню не менше 10 %. Спосіб за будь-яким із пп. 1 – 3, який відрізняється тим, що для очищення VLP застосовують послідовне використання іонообмінних смол Capto S ImpAct та Capto Q XP, а також колонки Sephacryl® S-500 HR.

8.6. Реферат

Запропоновано спосіб отримання вірусоподібних частинок (VLP) парвовірусу свиней шляхом генно-інженерної експресії капсидного білка VP2 у дріжджах *K. marxianus*. Ген VP2, оптимізований під кодонний склад *K. marxianus*, клонували у відповідний експресійний вектор, після чого трансформували дріжджі. Культивування трансформованих клітин проводили у

ферментері з контролем температури, рН та аерації, що забезпечувало високий рівень експресії білка і самозбірку VLP. Вірусоподібні частинки виділяли шляхом лізису клітин, очищували послідовною іонообмінною та гель-фільтраційною хроматографією. Запропонований спосіб дозволяє отримати високочисті, стабільні імуногенні VLP парвовірусу свиней, що є безпечними і економічно вигідними для виробництва вакцин. Використання *K. marxianus* та дешевих поживних середовищ забезпечує екологічну безпеку та відповідає принципам сталого розвитку.

ВИСНОВКИ

1. З огляду на поточні проблеми ветеринарії та беручи до уваги потенційну небезпечність як наявних вірусів, так і класичних вакцин, запропонована розробка вакцини нового покоління на основі ВПЧ. Такі вакцини є повністю безпечні в порівнянні з наявними класичними препаратами (наприклад, інактивованими), а також викликають високу імуногенність у провакцинованих тварин, що робить цю технологію не лише безпечнішою, а й ефективнішою.

2. За техніко-економічним обґрунтуванням було запропоновано розробити ВПЧ вакцину проти парвовірусу свиней з метою вакцинації свиноматок як найбільш ураженої групи до цього захворювання. Річна потреба у ВПЧ складає 7,71 кг (з врахуванням втрат – 12,85 кг).

3. Обґрунтовано багатоетапний процес виділення та очищення ВПЧ, при цьому загальні втрати складають всього 40%. Процес передбачає центрифугування, лізис клітин, відокремлення супернатанту від лізату, очистка ВПЧ з супернатанту, очистка ВПЧ з лізату та їх подальше ліофільне сушіння.

4. Одержану субстанцію ВПЧ контролюють за параметрами імуногенності, ступеня очистки ВПЧ, розміру частинок, а також вмісту вологості готового порошку. Параметри імуногенності визначаються шляхом вакцинації мишей з подальшим аналізом сироватки крові на кількість антитіл, індексу гемаглютинації, визначення поліфератичної відповіді лімфоцитів, визначення кількості цитокінів.

5. Визначено оптимальну лікарську форму – стерильний рідкий препарат для ін'єкцій, що забезпечує високу біодоступність та зручність введення. Підібрано ефективний ад'ювантний комплекс на основі сквалану з DDA, який підсилює імуногенність ВПЧ та має задовільну безпечність. Для стабілізації препарату використано 20% розчин сахарози, що зберігає структурну цілісність вірусоподібних частинок під час зберігання.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Бублик, О. (2023, August 1). У 2022 році поголів'я свиней в Україні вперше було меншим за 5 млн голів - AgroTimes. AgroTimes. [\[https://agrotimes.ua/tvarinnitstvo/u-2022-roczy-pogolivya-svynej-v-ukrayini-vpershe-bulo-menshym-za-5-mln-goliv/\]](https://agrotimes.ua/tvarinnitstvo/u-2022-roczy-pogolivya-svynej-v-ukrayini-vpershe-bulo-menshym-za-5-mln-goliv/)
2. Карлаш, Ю. В. Основи проектування біотехнологічних виробництв [Електронний ресурс] : навч. посібник / Ю. В. Карлаш, В. О. Красінько ; Національний університет харчових технологій. – Київ : НУХТ, 2022. – 373 с.
3. Afolabi, F. T., Adewale, O. P., & Adeyemo, S. M. (2022). Isolation, production and optimization of beta-galactosidase by utilizing yeasts isolated from selected dairy products. *J. Food Saf. Hyg.*, 8(3), 170-182. <https://doi.org/10.18502/jfsh.v8i3.11019>
4. Ahlström, C., Thuvander, J., Rayner, M., Matos, M., Gutiérrez, G., & Östbring, K. (2022). The effect of precipitation pH on protein recovery yield and emulsifying properties in the extraction of protein from cold-pressed rapeseed press cake. *Molecules*, 27(9), 2957. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules27092957>
5. Ahmed, N., Singh, J., Chauhan, H., Anjum, P. G. A., & Kour, H. (2013). Different drying methods: their applications and recent advances. *International Journal of food nutrition and safety*, 4(1), 34-42.
6. Al-Jazairi, M., Abou-Ghorra, S., Bakri, Y., & Mustafa, M. (2015). Optimization of [Beta]-galactosidase production by response surface methodology using locally isolated *Kluyveromyces marxianus*. *Int. Food Res. J.*, 22(4), 1361. <https://www.proquest.com/openview/66eb623a60fb5faadca2f12a4e4e5779/1?pq-origsite=gscholar&cbl=816390>
7. Amaya-Delgado, L., Flores-Cosío, G., Sandoval-Nuñez, D., Arellano-Plaza, M., Arrizon, J., & Gschaedler, A. (2018). Comparative of lignocellulosic ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Special topics in renewable energy systems*, 1, 1-21. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.78685>

8. Ameri, M., & Maa, Y. F. (2006). Spray drying of biopharmaceuticals: stability and process considerations. *Drying technology*, 24(6), 763-768. <http://dx.doi.org/10.1080/03602550600685275>
9. Antonis, A. F., Brusckke, C. J., Rueda, P., Maranga, L., Casal, J. I., Vela, C., ... & Langeveld, J. P. (2006). A novel recombinant virus-like particle vaccine for prevention of porcine parvovirus-induced reproductive failure. *Vaccine*, 24(26), 5481-5490. <https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2006.03.089>
10. Baptista, M., & Domingues, L. (2022). *Kluyveromyces marxianus* as a microbial cell factory for lignocellulosic biomass valorisation. *Biotechnol. Adv.*, 60, 108027. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2022.108027>
11. Baptista, M., Cunha, J. T., & Domingues, L. (2021). Establishment of *Kluyveromyces marxianus* as a microbial cell factory for lignocellulosic processes: production of high value furan derivatives. *J. Fungi*, 7(12), 1047. <https://doi.org/10.3390/jof7121047>
12. Barbosa-Hernández, E. J., Pliego-Sandoval, J. E., Gschaedler-Mathis, A., Arrizon-Gaviño, J., Arana-Sánchez, A., Femat, R., & Herrera-López, E. J. (2023). Monitoring β -Fructofuranosidase Activity through *Kluyveromyces marxianus* in Bioreactor Using a Lab-Made Sequential Analysis System. *Fermentation*, 9(11), 963. <https://doi.org/10.3390/fermentation9110963>
13. Belloch, C., Querol, A., & Barrio, E. (2011). Yeasts and Molds| *Kluyveromyces* spp. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00499-4>
14. Bilal, M., Ji, L., Xu, Y., Xu, S., Lin, Y., Iqbal, H. M., & Cheng, H. (2022). Bioprospecting *Kluyveromyces marxianus* as a robust host for industrial biotechnology. *Front. bioeng. biotechnol.*, 10, 851768. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.851768>
15. Brachelente, S., Galli, A., & Cervelli, T. (2023). Yeast and Virus-like Particles: A Perfect or Imperfect Couple?. *Applied Microbiology*, 3(3), 805-825. <https://doi.org/10.3390/applmicrobiol3030056>
16. Campos, B. B., Diniz, R. H., Silveira, F. A. D., Ribeiro, J. I., Fietto, L. G., Machado, J. C., & Silveira, W. B. D. (2019). Elephant grass (*Pennisetum purpureum*

Schumach) is a promising feedstock for ethanol production by the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735. *Braz. J. Chem. Eng.*, 36, 43-49. <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20190361s20170263>

17. Carvalho, S., Fortuna, A. R., Wolff, M. W., Peixoto, C., M Alves, P., Reichl, U., & JT Carrondo, M. (2018). Purification of influenza virus-like particles using sulfated cellulose membrane adsorbers. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 93(7), 1988-1996. <https://doi.org/10.1002/jctb.5474>

18. Castro, R. C. A., & Roberto, I. C. (2014). Selection of a thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* strain with potential application for cellulosic ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation. *Appl. biochem. biotechnol.*, 172, 1553-1564. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0612-5>

19. Celińska, E., Borkowska, M., & Białas, W. (2016). Evaluation of a recombinant insect-derived amylase performance in simultaneous saccharification and fermentation process with industrial yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 100, 2693-2707. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7098-8>

20. Cernak, P., Estrela, R., Poddar, S., Skerker, J. M., Cheng, Y. F., Carlson, A. K., ... & Cate, J. H. D. (2018). *Engineering Kluyveromyces marxianus as a robust synthetic biology platform host. mBio* 9: e01410-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.01410-18>

21. Chattopadhyay, A., Jailani, A. A. K., & Mandal, B. (2023). Exigency of plant-based vaccine against COVID-19 emergence as pandemic preparedness. *Vaccines*, 11(8), 1347. <https://doi.org/10.3390/vaccines11081347>

22. Choi, A., & Barrientos, A. (2020). Sucrose gradient sedimentation analysis of mitochondrial ribosomes. In *Mitochondrial Gene Expression: Methods and Protocols* (pp. 211-226). New York, NY: Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0834-0_16

23. Cimica, V., & Galarza, J. M. (2017). Adjuvant formulations for virus-like particle (VLP) based vaccines. *Clinical immunology*, 183, 99-108. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2017.08.004>

24. Crisci, E., Bárcena, J., & Montoya, M. (2013). Virus-like particle-based vaccines for animal viral infections. *Inmunologia*, 32(3), 102-116. <https://www.elsevier.es/es-revista-inmunologia-322-articulo-virus-like-particle-based-vaccines-for-animal-S021396261200087X>
25. de Amorin Sathler, L., Contiero, J., & Cazetta, M. L. (2015). Yacon Flour and Corn Steep Liquor as Substrates for Inulinase and Biomass Production by *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571. *J. Adv. Biotechnol.*, 4(3). https://www.academia.edu/download/84151711/pdf_46.pdf
26. de Lima, L. A., Ventrorm, R. Z., Bianchini, I. A., de Queiroz, M. V., Fietto, L. G., & da Silveira, W. B. (2021). Obtainment, selection and characterization of a mutant strain of *Kluyveromyces marxianus* that displays improved production of 2-phenylethanol and enhanced DAHP synthase activity. *J. Appl. Microbiol.*, 130(3), 878-890. <https://doi.org/10.1111/jam.14793>
27. de Oliveira, L. P. D. A., de Oliveira, T. F., Contiero, J., & Cazetta, M. L. (2016). Agave syrup as a substrate for inulinase production by *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571. *Acta Sci. Biol. Sci.*, 38(3), 283-289. <https://doi.org/10.4025/actascibiols.v38i3.31489>
28. Desai, M. A. (Ed.). (2008). *Downstream processing of proteins: methods and protocols* (Vol. 9). Springer Science & Business Media.
29. Dhanker, R., Chaudhary, S., Tomar, S. K., & Goyal, S. (2019). Ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* HM36338: Optimization of fermentation conditions using response surface methodology. *Indian J. Exp. Biol.*, 57, 630-635. <http://nopr.niscpr.res.in/handle/123456789/49540>
30. Dhineshkumar, V., & Ramasamy, D. (2017). Review on membrane technology applications in food and dairy processing. *J. Appl. Biotechnol. Bioeng*, 3(5), 399-407. <http://dx.doi.org/10.15406/jabb.2017.03.00077>
31. Diniz, R. H., Silveira, W. B., Fietto, L. G., & Passos, F. M. (2012). The high fermentative metabolism of *Kluyveromyces marxianus* UFV-3 relies on the increased expression of key lactose metabolic enzymes. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 101, 541-550. <https://doi.org/10.1007/s10482-011-9668-9>

32. Do, D. T. H., Theron, C. W., & Fickers, P. (2019). Organic wastes as feedstocks for non-conventional yeast-based bioprocesses. *Microorganisms*, 7(8), 229. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7080229>
33. Donneschi, A., Recchia, M., Romeo, C., Pozzi, P., Salogni, C., Maisano, A. M., ... & Alborali, G. L. (2024). Infectious Agents Associated with Abortion Outbreaks in Italian Pig Farms from 2011 to 2021. *Veterinary Sciences*, 11(10), 496. <https://doi.org/10.3390/vetsci11100496>
34. Drężek, K., Sobczyk, M. K., Kállai, Z., Detman, A., Bardadyn, P., & Mierzejewska, J. (2023). Valorisation of Whey Permeate in Sequential Bioprocesses towards Value-Added Products—Optimisation of Biphasic and Classical Batch Cultures of *Kluyveromyces marxianus*. *Int. J. Mol. Sci.*, 24(8), 7560. <https://doi.org/10.3390/ijms24087560>
35. Duan, J., Yang, D., Chen, L., Yu, Y., Zhou, J., & Lu, H. (2019). Efficient production of porcine circovirus virus-like particles using the nonconventional yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 103, 833-842. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9487-2>
36. Dubencovs, K., Liepins, J., Suleiko, A., Suleiko, A., Vangravs, R., Kassaliete, J., ... & Grigs, O. (2021). Optimization of synthetic media composition for *Kluyveromyces marxianus* fed-batch cultivation. *Fermentation*, 7(2), 62. <https://doi.org/10.3390/fermentation7020062>
37. Eddicks, M., Gründl, J., Seifert, A., Eddicks, L., Reese, S., Tabeling, R., ... & Fux, R. (2023). Examination on the Occurrence of Coinfections in Diagnostic Transmittals in Cases of Stillbirth, Mummification, Embryonic Death, and Infertility (SMEDI) Syndrome in Germany. *Microorganisms*, 11(7), 1675. <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms11071675>
38. Estrela Curado, R. (2019). Domestication and engineering of the yeast *Kluyveromyces marxianus*, a favored industrial host (Doctoral dissertation, UC Berkeley). <https://escholarship.org/uc/item/9k88d0ct>
39. Flores-Cosio, G., Arellano-Plaza, M., Gschaedler, A., & Amaya-Delgado, L. (2018). Physiological response to furan derivatives stress by *Kluyveromyces*

- marxianus* SLP1 in ethanol production. *Rev. Mex. Ing. quím.*, 17(1), 189-202. <https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbi/revmexingquim/2018v17n1/Flores>
40. Foukis, A., Stergiou, P. Y., Theodorou, L. G., Papagianni, M., & Papamichael, E. M. (2012). Purification, kinetic characterization and properties of a novel thermo-tolerant extracellular protease from *Kluyveromyces marxianus* IFO 0288 with potential biotechnological interest. *Bioresour. Technol.*, 123, 214-220. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.06.090>
41. Funahashi, E., Saiki, K., Honda, K., Sugiura, Y., Kawano, Y., Ohtsu, I., ... & Takagi, H. (2015). Finding of thiosulfate pathway for synthesis of organic sulfur compounds in *Saccharomyces cerevisiae* and improvement of ethanol production. *J. Biosci. Bioeng.*, 120(6), 666-669. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2015.04.011>
42. Galindo-Leva, L. Á., Hughes, S. R., López-Núñez, J. C., Jarodsky, J. M., Erickson, A., Lindquist, M. R., ... & Jones, M. A. (2016). Growth, ethanol production, and inulinase activity on various inulin substrates by mutant *Kluyveromyces marxianus* strains NRRL Y-50798 and NRRL Y-50799. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 43(7), 927-939. <https://doi.org/10.1007/s10295-016-1771-5>
43. Galvão de Souza Júnior, C., MacDonald Ledingham, W., & Antônio de Moraes Júnior, M. (2001). Utilisation of cheese whey as an alternative growth medium for recombinant strains of *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnol. Lett.*, 23, 1413-1416. <https://doi.org/10.1023/A:1011617914709>
44. Gao, F., & Daugulis, A. J. (2009). Bioproduction of the aroma compound 2-phenylethanol in a solid–liquid two-phase partitioning bioreactor system by *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnol. Bioeng.*, 104(2), 332-339. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.22387>
45. Gao, J., Yuan, W., Li, Y., Xiang, R., Hou, S., Zhong, S., & Bai, F. (2015). Transcriptional analysis of *Kluyveromyces marxianus* for ethanol production from inulin using consolidated bioprocessing technology. *Biotechnol. biofuels*, 8, 1-17. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0295-y>

46. Gao, Y., Wang, H., Wang, S., Sun, M., Fang, Z., Liu, X., ... & Tu, Y. (2022). Self-assembly of Porcine Parvovirus Virus-like particles and their application in Serological Assay. *Viruses*, *14*(8), 1828. <https://doi.org/10.3390/v14081828>
47. Gopal, R., & Schneemann, A. (2018). Production and application of insect virus-based VLPs. *Virus-Derived Nanoparticles for Advanced Technologies: Methods and Protocols*, 125-141. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7808-3_8
48. Goshima, T., Tsuji, M., Inoue, H., Yano, S., Hoshino, T., & Matsushika, A. (2013). Bioethanol production from lignocellulosic biomass by a novel *Kluyveromyces marxianus* strain. *Biosci., Biotechnol., Biochem.*, *77*(7), 1505-1510. <https://doi.org/10.1271/bbb.130173>
49. Hettinga, K. A. (2019). Lactose in the dairy production chain. In *Lactose* (pp. 231-266). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811720-0.00006-4>
50. Hillman, E. T., Li, M., Hooker, C. A., Englaender, J. A., Wheeldon, I., & Solomon, K. V. (2021). Hydrolysis of lignocellulose by anaerobic fungi produces free sugars and organic acids for two-stage fine chemical production with *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnol. Prog.*, *37*(5), e3172. <https://www.osti.gov/servlets/purl/1863444>
51. Islam, M., Xayachak, T., Haque, N., Lau, D., Bhuiyan, M., & Pramanik, B. K. (2024). Impact of Bioplastics on Environment from Its Production to End-of-Life. *Process Saf. Environ. Prot.* <https://doi.org/10.1016/j.psep.2024.05.113>
52. Johnsen, E., Brandtzaeg, O. K., Vehus, T., Roberg-Larsen, H., Bogoeva, V., Ademi, O., ... & Wilson, S. R. (2016). A critical evaluation of Amicon Ultra centrifugal filters for separating proteins, drugs and nanoparticles in biosamples. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, *120*, 106-111. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2015.12.010>
53. Józwiak, A., Manteufel, J., Selbitz, H. J., & Truyen, U. (2009). Vaccination against porcine parvovirus protects against disease, but does not prevent infection and virus shedding after challenge infection with a heterologous virus strain. *Journal of general virology*, *90*(10), 2437-2441. <https://doi.org/10.1099/vir.0.012054-0>

54. Karim, A., Gerliani, N., & Aïder, M. (2020). *Kluyveromyces marxianus*: An emerging yeast cell factory for applications in food and biotechnology. *Int. J. Food Microbiol.*, 333, 108818. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108818>
55. Kheirvari, M., Liu, H., & Tumban, E. (2023). Virus-like particle vaccines and platforms for vaccine development. *Viruses*, 15(5), 1109. <https://doi.org/10.3390/v15051109>
56. Kheirvari, M., Liu, H., & Tumban, E. (2023). Virus-like particle vaccines and platforms for vaccine development. *Viruses*, 15(5), 1109. <https://doi.org/10.3390/v15051109>
57. Kim, J. H., Ryu, J., Huh, I. Y., Hong, S. K., Kang, H. A., & Chang, Y. K. (2014). Ethanol production from galactose by a newly isolated *Saccharomyces cerevisiae* KL17. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 37, 1871-1878. <https://doi.org/10.1007/s00449-014-1161-1>
58. Koukoumaki, D. I., Papanikolaou, S., Ioannou, Z., Mourtzinou, I., & Sarris, D. (2024). Single-Cell Protein and Ethanol Production of a Newly Isolated *Kluyveromyces marxianus* Strain through Cheese Whey Valorization. *Foods*, 13(12), 1892. <https://doi.org/10.3390/foods13121892>
59. Kwon, D. H., Park, J. B., Hong, E., & Ha, S. J. (2019). Ethanol production from xylose is highly increased by the *Kluyveromyces marxianus* mutant 17694-DH1. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 42, 63-70. <https://doi.org/10.1007/s00449-018-2014-0>
60. Lan, Q., Duan, Y., Wu, P., Li, X., Yu, Y., Shi, B., ... & Lu, H. (2021). Coordinately express hemicellulolytic enzymes in *Kluyveromyces marxianus* to improve the saccharification and ethanol production from corncobs. *Biotechnol. biofuels*, 14, 1-14. <https://doi.org/10.1186/s13068-021-02070-1>
61. Lane, M. M., & Morrissey, J. P. (2010). *Kluyveromyces marxianus*: a yeast emerging from its sister's shadow. *Fungal Biol. Rev.*, 24(1-2), 17-26.
62. Laxmi, B., Devi, P. U. M., Naveen, T., & Buddolla, V. (2025). Virus-like particles: Innovative strategies for combatting emerging and re-emerging viral threats. *The Microbe*, 100351. <https://doi.org/10.1016/j.microb.2025.100351>

63. Lee, J. W., In, J. H., Park, J. B., Shin, J., Park, J. H., Sung, B. H., ... & Kweon, D. H. (2017). Co-expression of two heterologous lactate dehydrogenases genes in *Kluyveromyces marxianus* for L-lactic acid production. *J. Biotechnol.*, *241*, 81-86. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.11.015>
64. Lertwattanasakul, N., Nurcholis, M., Rodrussamee, N., Kosaka, T., Murata, M., & Yamada, M. (2022). *Kluyveromyces marxianus* as a platform in synthetic biology for the production of useful materials. In *Synthetic Biology of Yeasts: Tools and Applications* (pp. 293-335). Cham: Springer Int. Publ. https://doi.org/10.1007/978-3-030-89680-5_11
65. Li, J., Li, H., Liu, H., & Luo, Y. (2023). Recent Advances in the Biosynthesis of Natural Sugar Substitutes in Yeast. *J. Fungi*, *9*(9), 907. <https://doi.org/10.3390/jof9090907>
66. Li, M., Lang, X., Moran Cabrera, M., De Keyser, S., Sun, X., Da Silva, N., & Wheeldon, I. (2021). CRISPR-mediated multigene integration enables Shikimate pathway refactoring for enhanced 2-phenylethanol biosynthesis in *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnol. biofuels*, *14*, 1-15. <https://doi.org/10.1186/s13068-020-01852-3>
67. Li, Y., Hou, S., Ren, Z., Fu, S., Wang, S., Chen, M., ... & Li, P. (2023). Transcriptomic analysis reveals hub genes and pathways in response to acetic acid stress in *Kluyveromyces marxianus* during high-temperature ethanol fermentation. *Stress Biol.*, *3*(1), 26. <https://doi.org/10.1007/s44154-023-00108-y>
68. Lin, Y. J., Chang, J. J., Lin, H. Y., Thia, C., Kao, Y. Y., Huang, C. C., & Li, W. H. (2017). Metabolic engineering a yeast to produce astaxanthin. *Bioresour. Technol.*, *245*, 899-905. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.116>
69. Liu, N., Qin, L., & Miao, S. (2021). Regulatory Mechanisms of L-lactic acid and Taste Substances in Chinese Acid Rice Soup (Rice-acid) fermented with a *Lacticaseibacillus paracasei* and *Kluyveromyces marxianus*. *Front. Microbial.*, *12*, 594631. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.594631>
70. López-Astacio, R. A., Adu, O. F., Lee, H., Hafenstein, S. L., & Parrish, C. R. (2023). The structures and functions of parvovirus capsids and missing pieces:

The viral DNA and its packaging, asymmetrical features, nonprotein components, and receptor or antibody binding and interactions. *Journal of virology*, 97(7), e00161-23. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.00161-23>

71. López-Pérez, M., & Viniegra-González, G. (2016). Production of protein and metabolites by yeast grown in solid state fermentation: present status and perspectives. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 91(5), 1224-1231. <https://doi.org/10.1002/jctb.4819>

72. Lu, X., Liu, L., Zhang, H., Lu, H., Tian, T., Du, B., ... & Lu, H. (2024). High-Yield Expressed Human Ferritin Heavy-Chain Nanoparticles in *K. marxianus* for Functional Food Development. *Foods*, 13(18), 2919. <https://doi.org/10.3390/foods13182919>

73. Lukondeh, T., Ashbolt, N. J., & Rogers, P. L. (2003). Evaluation of *Kluyveromyces marxianus* FII 510700 grown on a lactose-based medium as a source of a natural bioemulsifier. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 30(12), 715-720. <https://doi.org/10.1007/s10295-003-0105-6>

74. Malairuang, K., Krajang, M., Rotsattarat, R., & Chamsart, S. (2020). Intensive multiple sequential batch simultaneous saccharification and cultivation of *Kluyveromyces marxianus* SS106 thermotolerant yeast strain for single-step ethanol fermentation from raw cassava starch. *Processes*, 8(8), 898. <https://doi.org/10.3390/pr8080898>

75. Marcišauskas, S., Ji, B., & Nielsen, J. (2019). Reconstruction and analysis of a *Kluyveromyces marxianus* genome-scale metabolic model. *BMC Bioinform.*, 20, 1-9. <https://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12859-019-3134-5>

76. Martínez-Corona, R., Banderas-Martínez, F. J., Pérez-Castillo, J. N., Cortés-Penagos, C., & González-Hernández, J. C. (2019). Avocado oil as an inducer of the extracellular lipase activity of *Kluyveromyces marxianus* L-2029. *Food Sci. Technol.*, 40(Suppl. 1), 121-129. <https://doi.org/10.1590/fst.06519>

77. Martínez-Corona, R., Vázquez Marrufo, G., Cortés Penagos, C., Madrigal-Pérez, L. A., & González-Hernández, J. C. (2020). Bioinformatic

characterization of the extracellular lipases from *Kluyveromyces marxianus*. *Yeast*, 37(1), 149-162. <https://doi.org/10.1002/yea.3449>

78. Mirzaei, M., Aminlari, M., & Hosseini, E. (2016). Antioxidant, ACE-inhibitory and antimicrobial activities of *Kluyveromyces marxianus* protein hydrolysates and their peptide fractions. *Funct. Foods Health Dis.*, 6(7), 425-439. <https://doi.org/10.31989/ffhd.v6i7.250>

79. Moore, P. A., & Kery, V. (2009). High-throughput protein concentration and buffer exchange: comparison of ultrafiltration and ammonium sulfate precipitation. *High Throughput Protein Expression and Purification: Methods and Protocols*, 309-314. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-59745-196-3_20

80. Moreno, A. D., Ibarra, D., Ballesteros, I., González, A., & Ballesteros, M. (2013). Comparing cell viability and ethanol fermentation of the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* on steam-exploded biomass treated with laccase. *Bioresour. Technol.*, 135, 239-245. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.095>

81. Morrissey, J. P., Etschmann, M. M., Schrader, J., & de Billerbeck, G. M. (2015). Cell factory applications of the yeast *Kluyveromyces marxianus* for the biotechnological production of natural flavour and fragrance molecules. *Yeast*, 32(1), 3-16. <http://dx.doi.org/10.1002/yea.3054>

82. Murari, C. S., Machado, W. R. C., Schuina, G. L., & Del Bianchi, V. L. (2019). Optimization of bioethanol production from cheese whey using *Kluyveromyces marxianus* URM 7404. *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, 20, 101182. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101182>

83. Murata, M., Pattanakittivorakul, S., Manabe, T., Limtong, S., & Yamada, M. (2022). Mutants with enhanced cellobiose-fermenting ability from thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042, which are beneficial for fermentation with cellulosic biomass. *Fuels*, 3(2), 232-244. <https://doi.org/10.3390/fuels3020015>

84. Nader Manrique, C. A., Pérez Pérez, A. L., Ramos Calonge, H. G., & Cifuentes Quin, C. A. (2020). Portable Epidemiological Isolation Unit. Ephemeral

Architecture for Covid-19 Emergency. *Strategic Design Research Journal*, 13(3).

<http://dx.doi.org/10.4013/sdrj.2020.133.09>

85. Nasukawa, T., Uchiyama, J., Taharaguchi, S., Ota, S., Ujihara, T., Matsuzaki, S., ... & Sakaguchi, M. (2017). Virus purification by CsCl density gradient using general centrifugation. *Archives of virology*, 162, 3523-3528. <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-017-3513-z>

86. Nitiyon, S., Keo-Oudone, C., Murata, M., Lertwattanasakul, N., Limtong, S., Kosaka, T., & Yamada, M. (2016). Efficient conversion of xylose to ethanol by stress-tolerant *Kluyveromyces marxianus* BUNL-21. *Springerplus*, 5, 1-12. <http://dx.doi.org/10.1186/s40064-016-1881-6>

87. Nooraei, S., Bahrulolum, H., Hoseini, Z. S., Katalani, C., Hajizade, A., Easton, A. J., & Ahmadian, G. (2021). Virus-like particles: preparation, immunogenicity and their roles as nanovaccines and drug nanocarriers. *J. nanobiotechnology*, 19, 1-27. <https://doi.org/10.1186/s12951-021-00806-7>

88. Obermeyer, A. C., & Olsen, B. D. (2015). Synthesis and application of protein-containing block copolymers. <https://doi.org/10.1021/mz500732e>

89. Osanlo, D. T., Mahlin, D., Bjerregaard, S., Bergensthl, B., & Millqvist-Fureby, A. (2024). Exploring vacuum foam drying as an alternative to freeze-drying and spray drying for a human lipase. *International Journal of Pharmaceutics*, 667, 124883. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2024.124883>

90. Osorio-González, C. S., Gómez-Falcon, N., Brar, S. K., & Ramírez, A. A. (2022). Cheese whey as a potential feedstock for producing renewable biofuels: A review. *Energies*, 15(18), 6828. <https://doi.org/10.3390/en15186828>

91. Pal, U., & Vij, S. (2022). Adaptive evolution of *Kluyveromyces marxianus* MTCC1389 for high ethanol tolerance. *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, 45, 102533. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102533>

92. Park, J. B., Kim, J. S., Jang, S. W., Hong, E., & Ha, S. J. (2015). The application of thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* as a potential industrial workhorse for biofuel production. *KSBB j.*, 30(3), 125-131. <http://dx.doi.org/10.7841/ksbbj.2015.30.3.125>

93. Perpetuini, G., Rossetti, A. P., Rapagnetta, A., & Tofalo, R. (2024). Unlocking the potential of *Kluyveromyces marxianus* in the definition of aroma composition of cheeses. *Front. Microbiol.*, *15*, 1464953. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1464953>
94. Philip, S., Sengupta, S., Keshavarz, T., & Roy, I. (2009). Effect of impeller speed and pH on the production of poly (3-hydroxybutyrate) using *Bacillus cereus* SPV. *Biomacromolecules*, *10*(4), 691-699. <https://doi.org/10.1021/bm801395p>
95. Pons R.M. D. C., & Jungbauer, A. (2025). Polyethylene glycol precipitation: fundamentals and recent advances. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 1-20. <https://doi.org/10.1080/10826068.2025.2470220>
96. Prosper, P., Rodríguez Puertas, R., Guerin, D., & Branda, M. M. (2024). Computational method for designing vaccines applied to virus-like particles (VLPs) as epitope carriers. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2024.05.025>
97. Queiroz, J. A., Tomaz, C. T., & Cabral, J. M. S. (2001). Hydrophobic interaction chromatography of proteins. *Journal of biotechnology*, *87*(2), 143-159. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00237-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00237-1)
98. Raimondi, S., Zanni, E., Amaretti, A., Palleschi, C., Uccelletti, D., & Rossi, M. (2013). Thermal adaptability of *Kluyveromyces marxianus* in recombinant protein production. *Microb. Cell Fact.*, *12*, 1-7. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-34>
99. Rajkumar, A. S., & Morrissey, J. P. (2020). Rational engineering of *Kluyveromyces marxianus* to create a chassis for the production of aromatic products. *Microb. Cell Fact.*, *19*, 1-19. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01461-7>
100. Randolph, T. W. (2012). The two faces of His-tag: Immune response versus ease of protein purification. *Biotechnology Journal*, *7*(1), 18-19. <https://doi.org/10.1002/biot.201100459>
101. Rasool, A., Ahmed, M. S., & Li, C. (2016). Overproduction of squalene synergistically downregulates ethanol production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Chem. Eng. Sci.*, *152*, 370-380. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2016.06.014>

102. Ray, S., Mukherjee, A., & Ghosh, U. (2023). Utilization of Agro-industrial, Food Processing Wastes and Pollutants for Manufacture of Products of Industrial Value: A Review. *Def. Life Sci. J.*, 8(3):269-279. <https://doi.org/10.14429/dlsj.8.18861>
103. Reina-Posso, D., & Gonzales-Zubiate, F. A. (2025). Expanding Horizons: The Untapped Potential of *Kluyveromyces marxianus* in Biotechnological Applications. *Fermentation*, 11(2), 98. <https://doi.org/10.3390/fermentation11020098>
104. Ren, Z. Y., Liu, G. L., Chi, Z., Han, Y. Z., Hu, Z., & Chi, Z. M. (2017). Overexpression of both the lactase gene and its transcriptional activator gene greatly enhances lactase production by *Kluyveromyces marxianus*. *Process Biochem.*, 61, 38-46. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.06.001>
105. Richard, P., & Merja. P. (2014). Methods for producing styrene and genetically modified micro-organisms related thereto. <https://patents.google.com/patent/WO2014202838A1/en>
106. Robinson, J. M. (2016). Vaccine production: main steps and considerations. In *The vaccine book* (pp. 77-96). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802174-3.00005-9>
107. Rocha, S. N., Abrahão-Neto, J., & Gombert, A. K. (2011). Physiological diversity within the *Kluyveromyces marxianus* species. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 100, 619-630. <https://doi.org/10.1007/s10482-011-9617-7>
108. Rueda, P., Fominaya, J., Langeveld, J. P., Brusckhe, C., Vela, C., & Casal, J. I. (2000). Effect of different baculovirus inactivation procedures on the integrity and immunogenicity of porcine parvovirus-like particles. *Vaccine*, 19(7-8), 726-734. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(00\)00259-0](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(00)00259-0)
109. Saini, P., Beniwal, A., Kokkiligadda, A., & Vij, S. (2017). Evolutionary adaptation of *Kluyveromyces marxianus* strain for efficient conversion of whey lactose to bioethanol. *Process Biochem.*, 62, 69-79. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.07.013>
110. Sakihama, Y., Hidese, R., Hasunuma, T., & Kondo, A. (2019). Increased flux in acetyl-CoA synthetic pathway and TCA cycle of *Kluyveromyces marxianus*

under respiratory conditions. *Sci. Rep.*, 9(1), 5319. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41863-1>

111. Schiavone, A., Edwards, J. C., Vigneswaran, E., De Brito, R. C., Hothi, H., Frossard, J. P., ... & Opriessnig, T. (2025). Evaluation of a strategy to enhance the efficacy and ease of application of porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccines. *Vaccine*, 64, 127757. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2025.127757>

112. Schwarz, B., & Douglas, T. (2015). Development of virus-like particles for diagnostic and prophylactic biomedical applications. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 7(5), 722-735. <http://dx.doi.org/10.1002/wnan.1336>

113. Sengupta, P., Mohan, R., Wheeldon, I., Kisailus, D., Wyman, C. E., & Cai, C. M. (2022). Prospects of thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* for high solids ethanol fermentation of lignocellulosic biomass. *Biotechnol. Biofuels Bioprod.*, 15(1), 134. <https://doi.org/10.1186/s13068-022-02232-9>

114. Serrat, M., Bermúdez, R. C., & Villa, T. G. (2004). Polygalacturonase and ethanol production in *Kluyveromyces marxianus*: potential use of polygalacturonase in foodstuffs. *Appl. biochem. biotechnol.*, 117, 49-64. <https://doi.org/10.1385/ABAB:117:1:49>

115. Sharma, A., Preece, B., Swann, H., Fan, X., McKenney, R. J., Ori-McKenney, K. M., ... & Vershinin, M. D. (2021). Structural stability of SARS-CoV-2 virus like particles degrades with temperature. *Biochemical and biophysical research communications*, 534, 343-346. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.11.080>

116. Signori, L., Passolunghi, S., Ruohonen, L., Porro, D., & Branduardi, P. (2014). Effect of oxygenation and temperature on glucose-xylose fermentation in *Kluyveromyces marxianus* CBS712 strain. *Microb. Cell Fact.*, 13, 1-13. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-51>

117. Sookhoo, J. R., Schiffman, Z., Ambagala, A., Kobasa, D., Pardee, K., & Babiuk, S. (2024). Protein Expression Platforms and the Challenges of Viral Antigen Production. *Vaccines*, 12(12), 1344. <https://doi.org/10.3390/vaccines12121344>

118. Sousa, C. C. D., Gonçalves, G. T. I., & Falleiros, L. N. S. S. (2018). Ethanol production using agroindustrial residues as fermentation substrates by *Kluyveromyces marxianus*. *J. Ind. Biotech.*, *14*(6), 308-314. <https://doi.org/10.1089/ind.2018.00>
119. Srimahaeak, T., Petersen, M. A., Lillevang, S. K., Jespersen, L., & Larsen, N. (2022). Spoilage potential of contaminating yeast species *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia kudriavzevii* and *Torulaspora delbrueckii* during cold storage of skyr. *Foods*, *11*(12), 1776. <https://doi.org/10.3390/foods11121776>
120. Stergiou, P. Y., Foukis, A., Sklivaniti, H., Zacharaki, P., Papagianni, M., & Papamichael, E. M. (2012). Experimental investigation and optimization of process variables affecting the production of extracellular lipase by *Kluyveromyces marxianus* IFO 0288. *Appl. biochem. biotechnol.*, *168*, 672-680. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9808-3>
121. Stergiou, P. Y., Foukis, A., Theodorou, L., Papagianni, M., & Papamichael, E. (2014). Optimization of the production of extracellular α -amylase by *Kluyveromyces marxianus* IFO 0288 by response surface methodology. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, *57*, 421-426. <https://doi.org/10.1590/S1516-8913201401485>
122. Su, M., Hu, Y., Cui, Y., Wang, Y., Yu, H., Liu, J., ... & Piao, C. (2021). Production of β -glucosidase from okara fermentation using *Kluyveromyces marxianus*. *J. Food Sci. Technol.*, *58*, 366-376. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04550-y>
123. Suzuki, T., Hoshino, T., & Matsushika, A. (2019). High-temperature ethanol production by a series of recombinant xylose-fermenting *Kluyveromyces marxianus* strains. *Enzyme Microb. Technol.*, *129*, 109359. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2019.109359>
124. Tamošiūnas, P. L., Petraitytė-Burneikienė, R., Lasickienė, R., Akatov, A., Kundrotas, G., Sereika, V., ... & Sasnauskas, K. (2014). Generation of recombinant porcine parvovirus virus-like particles in *Saccharomyces cerevisiae* and development of virus-specific monoclonal antibodies. *Journal of Immunology Research*, *2014*(1), 573531. <https://doi.org/10.1155/2014/573531>

125. Taylor, R. (2019). *U.S. Patent No. 10,167,320*. Purification of virus like particles. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
126. Tizard, I. R. (2020). Porcine vaccines. *Vaccines for veterinarians*, 225. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-68299-2.00027-7>
127. Tomás-Pejó, E., García-Aparicio, M., Negro, M. J., Oliva, J. M., & Ballesteros, M. (2009). Effect of different cellulase dosages on cell viability and ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* in SSF processes. *Bioresour. Technol.*, 100(2), 890-895. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.07.012>
128. Trapala, J., Bustos-Jaimes, I., Manzanares, P., Bárzana, E., & Montiel, C. (2020). Purification and characterization of an inulinase produced by a *Kluyveromyces marxianus* strain isolated from blue agave bagasse. *Protein Expr. Purif.*, 176, 105718. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2020.105718>
129. Varela, J. A., Gethins, L., Stanton, C., Ross, P., & Morrissey, J. P. (2017). Applications of *Kluyveromyces marxianus* in biotechnology. Cham: *Springer Int. Publ. Yeast diversity in human welfare*, 439-453. https://doi.org/10.1007/978-981-10-2621-8_17
130. Verma, M., & Mishra, V. (2021). Recent trends in upgrading the performance of yeast as electrode biocatalyst in microbial fuel cells. *Chemosphere*, 284, 131383. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131383>
131. Wang, C. H., Xiong, W. P., Huang, C., Li, X. M., Wang, Q. Y., & Huang, R. B. (2021). Engineering better catalytic activity and acidic adaptation into *Kluyveromyces marxianus* exoinulinase using site-directed mutagenesis. *J. Sci. Food Agric.*, 101(6), 2472-2482. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10873>
132. Wang, J., Liu, Y., Chen, Y., Wang, A., Wei, Q., Liu, D., & Zhang, G. (2020). Large-scale manufacture of VP2 VLP vaccine against porcine parvovirus in *Escherichia coli* with high-density fermentation. *Applied microbiology and biotechnology*, 104, 3847-3857. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10483-5>
133. Wang, R., Wang, D., Gao, X., & Hong, J. (2014). Direct fermentation of raw starch using a *Kluyveromyces marxianus* strain that expresses glucoamylase and

- Alpha-amylase to produce ethanol. *Biotechnol. Prog.*, 30(2), 338-347. <https://doi.org/10.1002/btpr.1877>
134. Wu, C. Y., Yeh, Y. C., Yang, Y. C., Chou, C., Liu, M. T., Wu, H. S., ... & Hsiao, P. W. (2010). Mammalian expression of virus-like particles for advanced mimicry of authentic influenza virus. *PloS one*, 5(3), e9784. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009784>
135. Yamamoto, H., Shima, T., Yamaguchi, M., Mochizuki, Y., Hoshida, H., Kakuta, S., ... & Ohsumi, Y. (2015). The thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* is a useful organism for structural and biochemical studies of autophagy. *J. Biol. Chem.*, 290(49), 29506-29518. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.684233>
136. Yang, D., Chen, L., Duan, J., Yu, Y., Zhou, J., & Lu, H. (2021a). Investigation of *Kluyveromyces marxianus* as a novel host for large-scale production of porcine parvovirus virus-like particles. *Microb. Cell Fact.*, 20, 1-13. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01514-5>
137. Yang, D., Zhang, L., Duan, J., Huang, Q., Yu, Y., Zhou, J., & Lu, H. (2021b). A single vaccination of IBDV subviral particles generated by *Kluyveromyces marxianus* efficiently protects chickens against novel variant and classical IBDV strains. *Vaccines*, 9(12), 1443. <https://doi.org/10.3390/vaccines9121443>
138. Yatabe, F., Seike, T., Okahashi, N., Ishii, J., & Matsuda, F. (2023). Improvement of ethanol and 2, 3-butanediol production in *Saccharomyces cerevisiae* by ATP wasting. *Microb. Cell Fact.*, 22(1), 204. <https://doi.org/10.1186/s12934-023-02221-z>
139. Zandona, E., Blažić, M., & Režek Jambrak, A. (2021). Whey utilization: Sustainable uses and environmental approach. *Food Technol. Biotechnol.*, 59(2), 147-161. <https://doi.org/10.17113/ftb.59.02.21.6968>
140. Zeng, D. W., Yang, Y. Q., Wang, Q., Zhang, F. L., Zhang, M. D., Liao, S., ... & Zhao, X. Q. (2024). Transcriptome analysis of *Kluyveromyces marxianus* under succinic acid stress and development of robust strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 108(1), 1-12. <https://doi.org/10.1007/s00253-024-13097-3>

141. Zhang, B., Ren, L., Wang, Y., Xu, D., Zhang, S., Wang, H., ... & Li, F. (2020b). Glycerol production through TPI1 defective *Kluyveromyces marxianus* at high temperature with glucose, fructose, and xylose as feedstock. *Biochem. Eng. J.*, *161*, 107689. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107689>
142. Zhang, B., Ren, L., Zhao, Z., Zhang, S., Xu, D., Zeng, X., & Li, F. (2021). High temperature xylitol production through simultaneous co-utilization of glucose and xylose by engineered *Kluyveromyces marxianus*. *Biochem. Eng. J.*, *165*, 107820. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107820>
143. Zhang, J., Xu, T., Wang, X., Jing, X., Zhang, J., Hong, J., ... & Wang, J. (2022). Lignocellulosic xylitol production from corncob using engineered *Kluyveromyces marxianus*. *Fron. bioeng. biotechnol.*, *10*, 1029203. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.1029203>
144. Zhang, J., Zhang, B., Wang, D., Gao, X., & Hong, J. (2014). Xylitol production at high temperature by engineered *Kluyveromyces marxianus*. *Bioresour. Technol.*, *152*, 192-201. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.10.109>
145. Zhang, J., Zhang, B., Wang, D., Gao, X., Sun, L., & Hong, J. (2015). Rapid ethanol production at elevated temperatures by engineered thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* via the NADP (H)-preferring xylose reductase-xylitol dehydrogenase pathway. *Metab. Eng.*, *31*, 140-152. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2015.07.008>
146. Zhang, L., Zhou, R., Zhang, J., & Zhou, P. (2021). Heat-induced denaturation and bioactivity changes of whey proteins. *International Dairy Journal*, *123*, 105175. <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105175>
147. Zhang, Y., Li, Y. F., Chi, Z., Liu, G. L., Jiang, H., Hu, Z., & Chi, Z. M. (2019). Inulinase hyperproduction by *Kluyveromyces marxianus* through codon optimization, selection of the promoter, and high-cell-density fermentation for efficient inulin hydrolysis. *Ann. Microbiol.*, *69*, 647-657. <https://doi.org/10.1007/s13213-019-01457-8>

148. Zhou, H., Yao, G., & Cui, S. (2010). Production and purification of VP2 protein of porcine parvovirus expressed in an insect-baculovirus cell system. *Virology journal*, 7, 1-6. <http://dx.doi.org/10.1186/1743-422X-7-366>

ДОДАТКИ

Апробація роботи

Нагороди:

1. Переможниця 91 Міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті» (Диплом I-го ступеня, 2025 р.).

Онищенко А., Скроцька О. Вірусоподібні частинки парвовірусів як основа для розробки новітніх вакцин // Матеріали 91 Міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті» (м. Київ, НУХТ, 7-11 квітня 2025 р.). – Ч. 1. – С. 327.

2. 2 місце у I турі Всеукраїнського конкурсу студентських наукових робіт за спеціальністю «Біотехнології та біоінженерія» у секції «Промислова та екологічна біотехнологія», тема роботи: «Біотехнологічний потенціал дріжджів *Kluuveromyces marxianus*» (Диплом II-го ступеня, 2025р.).

Тези у конференціях:

1. Онищенко А.А., Скроцька О.І. Утилізація молочної сироватки та біосинтез етанолу дріжджами *Kluuveromyces marxianus* // Наукові проблеми харчових технологій та промислової біотехнології в контексті євроінтеграції: Програма та тези матеріалів XIII Міжнародної науково-технічної конференції, 21 листопада 2024 р., м. Київ. – К.: НУХТ, 2024 р. – С. 116-117.

2. Онищенко А.А., Скроцька О.І. Потенціал дріжджів *Kluuveromyces marxianus* у сучасних біотехнологіях та медицині // Матеріали XII Науково-практичної конференції з міжнародною участю Школи молодих науковців АТ «Фармак» «НАУКА, ІННОВАЦІЇ ТА ЯКІСТЬ В СУЧАСНОМУ ФАРМАЦЕВТИЧНОМУ ВИРОБНИЦТВІ» – С. 33-34.

3. Онищенко А.А., Скроцька О.І. Дріжджі *Kluuveromyces marxianus* як перспективна платформа для отримання вірусоподібних частинок // Матеріали спеціалізованої XIII науково-практичної конференції з міжнародною участю

Школи молодих науковців Фармак «НАУКА, ІННОВАЦІЇ ТА ЯКІСТЬ В СУЧАСНОМУ ФАРМАЦЕВТИЧНОМУ ВИРОБНИЦТВІ».