

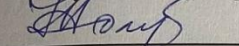
НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»

Факультет біотехнології і біотехніки

Кафедра біоенергетики, біоінформатики та екобіотехнології

До захисту допущено:

Завідувач кафедри

 Наталія ГОЛУБ

« 3 » травня 2025 р.

Дипломний проєкт
на здобуття ступеня бакалавра

за освітньо-професійною програмою «Біотехнології»

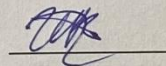
спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

на тему: «Біотехнологія рекомбінантного білка Gag p24 з використанням
штаму *E. coli* StarDE3»

Виконав:

студент IV курсу, групи ББ-11


Шоломинський Віктор Андрійович



Керівник:

к.т.н., старший викладач

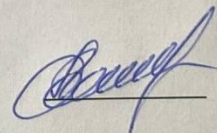
Левтун Ігор Ігорович



Консультант з проєктування:

Професор., д.т.н, професор

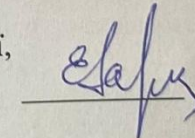
Саблій Лариса Андріївна




Рецензент:

Професор кафедри промислової біотехнології та біофармації,

д.б.н., с.н.с Гаркава Катерина Григорівна



Засвідчую, що у цьому дипломному
проєкті немає запозичень з праць інших
авторів без відповідних посилань.

Студент 

Київ – 2025 року

Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»

Факультет біотехнології і біотехніки
Кафедра біоенергетики, біоінформатики та екобіотехнології

Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)

Спеціальність – 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Освітньо-професійна програма «Біотехнології»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

Наталія ГОЛУБ Наталія ГОЛУБ

«21» квітня 2025 р.

ЗАВДАННЯ

на дипломний проєкт студенту

Шоломинському Віктору Андрійовичу

1. Тема проєкту «Біотехнологія рекомбінантного білка Gag p24 з використанням штаму *E. coli* StarDE3»

Керівник проєкту к.т.н., старший викладач Левтун Ігор Ігорович, затверджені наказом по університету від «29» Травня 2025 р. № 1838-е

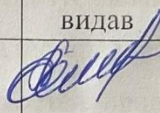

2. Термін подання студентом проєкту 3 червня. 2025р.

3. Вихідні дані до проєкту: вихід рекомбінантного білка p24 – 1 кг/рік. Заповненість реактора – 0,3. Спроекувати реактор для проведення культивування біомаси продуцента та індукції синтезу продукту.

4. Зміст пояснювальної записки: Вступ, обґрунтування вибору технології, біологічного агента, біохімічні основи технологічного процесу, технологічна частина, підбір та характеристика обладнання, охорона праці, висновки.









5. Перелік графічного матеріалу (із зазначенням обов'язкових креслеників, плакатів, презентацій тощо): Технологічна схема виробництва (A1); Апаратурна схема виробництва (A1); Креслення реактора (A1).

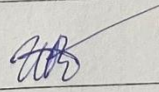
6. Консультанти розділів проекту


Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Графічна частина дипломного проекту	д.т.н., проф. Саблій Л.А.	 24.04.25р.	 30.05.25р.

7. Дата видачі завдання 21 квітня 2025

Календарний план

№ з/п	Назва етапів виконання дипломного проекту	Термін виконання етапів проекту	Примітка
1	Вступ	25 квітня	
2	Розділ 1	1 травня	
3	Розділ 2	8 травня	
4	Розділ 3	15 травня	
5	Розділ 4	22 травня	
6	Розділ 5	23 травня	
7	Висновки	24 травня	
8	Креслення	30 травня	

Студент  Віктор ШОЛОМИНСЬКИЙ

Керівник проекту  Ігор ЛЕВТУН

**НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
“Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського”**

Факультет біотехнології і біотехніки
Кафедра біоенергетики, біоінформатики та екобіотехнології

ДИПЛОМНИЙ ПРОЄКТ

**на здобуття ступеня бакалавра
за освітньо-професійною програмою «Біотехнології»
спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»**

на тему: «Біотехнологія рекомбінантного білка Gag p24 з використанням
штаму *E. coli* StarDE3»

Студента групи ББ-11

Шоломинського Віктора Андрійовича

Керівник проєкту к.т.н., старший викладач

Левтун Ігор Ігорович

Проєкт захищено з оцінкою _____

Дата захисту _____

Київ – 2025 року

РЕФЕРАТ

Дипломний проєкт: 73 с., 11 рис., 7 табл., 30 посилань.

Робота присвячена проєктуванню виробництва для одержання рекомбінантного білка ВІЛ gag p24.

Обґрунтовано використання рекомбінантного штаму *E. coli* StarDE3 в якості продуцента, що містить вектор pET-24(a)+, що забезпечує можливість індукції синтезу цільового продукту дією IPTG індуктора на lac-оперон. Відповідно до морфологічних та фізіологічно-біохімічних особливостей продуцента обрано середовище культивування M9, що забезпечує високу продуктивність біосинтезу.

Опис спроектованої технології виробництва включає стадії підготовки виробництва, культивування біомаси продуцента, індукцію синтезу цільового продукту, його виділення та очистку. Складено перелік матеріалів та сировини виробництва та контрольних точок для забезпечення якості продукту.

У роботі розраховано матеріальний баланс виробництва, тепловий розрахунок процесу та конструктивний розрахунок ферментера об'ємом 160 л.

РЕКОМБІНАНТНИЙ БІЛОК GAG P24, ВІЛ, *ESCHERICHIA COLI* BL21 STARDE3, IPTG, ГЛИБИННЕ КУЛЬТИВУВАННЯ, ТІЛЬЦА-ВКЛЮЧЕННЯ.

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	ДП ББ11 25.000 ПЗ			
Розробив		Шоломинський В. А.			Біотехнологія рекомбінантного білка Gag p24 з використанням штаму <i>E. coli</i> StarDE3	Літ.	Арк.	Акрушіє
Конс.							4	
Керівн.		Левтун ІІ				КПІ ім. Ігоря Сікорського, ФБТ		
Затв.								

ABSTRACT

Diploma project: 73 pages, 11 pictures, 7 tables, 30 references.

The work is dedicated to the design of a production process of recombinant HIV gag p24 protein.

The use of the recombinant strain *E. coli* StarDE3 as producent, containing the pET-24(a)+ vector has been justified, which enables the induction of target product synthesis by the action of the IPTG inducer on the lac-operon. According to the morphological and physiological-biochemical characteristics of the producer, the M9 cultivation medium was selected, which ensures high biosynthesis productivity.

The described production technology design includes the stages of production preparation, cultivation of the producer biomass, induction of the target product synthesis, its extraction, and purification. A list of production materials and raw components, as well as control points to ensure product quality, has been compiled.

The work includes calculations of the material balance of production, heat calculation of the process, and design calculation of a 160 L fermenter.

RECOMBINANT PROTEIN GAG P24, HIV, ESCHERICHIA COLI BL21 STARDE3, IPTG, SUBMERGED CULTIVATION, INCLUSION BODIES.

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розробив		Шоломинський В.А.			<i>ДП ББ11 25.000 ПЗ</i> <i>Біотехнологія рекомбінантного ділка Gag p24 з використанням штаму E. coli StarDE3</i>		
Конс.							
Керівн.		Левтун ІІ					
Затв.							
					Літ.	Арк.	Акрушів
						5	
					КПІ ім. Ізоря Сікорського, ФБТ		

ЗМІСТ

Список скорочень.....	7
Вступ	8
Обґрунтування вибору технології, біологічного агента	10
Біохімічні основи технологічного процесу.....	24
Технологічна частина.....	27
Підбір та характеристика обладнання.....	50
Охорона праці	64
Висновки	67
Список літературних джерел	69
Додаток А	73

					<i>ДП ББ11 25.000 ПЗ</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		6

СПИСОК СКОРОЧЕНЬ

ВІЛ – вірус імунодефіциту людини;

АРТ – антиретровірусна терапія;

ІФА – імуноферментний аналіз;

ELISA – enzyme linked immuno sorbent assay;

МПА – м'ясо-пептонний агар;

МПБ – м'ясо-пептонний бульйон;

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота;

РНК – рибонуклеїнова кислота;

АТФ – аденозинтрифосфат;

АМФ – аденозинмонофосфат;

IPTG - Isopropyl β -d-1-thiogalactopyranoside.

					<i>ДП ББ11 25.000 ПЗ</i>	Арк.
						7
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ВСТУП

У сучасному світі однією з основних проблем Всесвітньої Організації Охорони Здоров'я є поширення вірусу імунодефіциту людини. За статистикою UNAIDS за 2023 рік, в світі проживало 39,9 мільйонів людей, заражених ВІЛ-інфекцією. Протягом року було виявлено 1,3 мільйонів нових випадків зараження та 630 000 випадків смерті від хвороби. [1]

За даними МОЗ України, станом на 01.04.2025 під медичним наглядом в Україні перебувають 135 922 людей, інфікованих ВІЛ, що становить 331,5 на 100000 населення. Лише за квітень 2025 року було виявлено 675 випадків зараження, з яких 2 випадки у дітей віком 0-14 років та 2 випадки у підлітків віком 15-17 років. [2]

ВІЛ-інфекція являє собою хронічне захворювання, що викликається вірусом ВІЛ. Прогрес інфекції характеризується специфічним ураженням імунної системи та всіх клітини, що мають CD4 + рецептор. Тропізм до CD4 + Т-лімфоцитів призводить до розвитку імунодефіциту, що спричиняє повільне руйнування імунної системи з формування синдрому набутого імунодефіциту (СНІД), який викликає швидку смерть ВІЛ інфікованих. [3]

Білок p24 є біологічним маркером вірусу імунодефіциту людини в організмі. В ході досліджень вченими було виявлено кореляцію показників рівня цього протеїну в тканинах кишечника та лімфатичних вузлах з показниками уражених CD4 + Т-лімфоцитів. Також рівень білка помітно знижується при проведенні АРТ. Під час АРТ експресія p24 в кишечнику є більш тісно пов'язаною як з ВІЛ-специфічною частотою CD8 + Т-клітин, так і з рівнем CD14 в плазмі, ніж експресія РНК вірусу. Зважаючи на ці фактори, встановлення рівня білка p24 для відслідковування прогресії поширення ВІЛ-інфекції в організмі та прогресу лікування під час АРТ є найбільш доцільним, зручним та точним методом. [4]

За встановленим МОЗ України клінічним протоколом лікування та

					<i>ДП ББ11 25.000 ПЗ</i>			
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розробив</i>		<i>Шоломинський В.А.</i>			<i>Біотехнологія рекомбінантного білка Gag p24 з використанням штаму E. coli StarDE3</i>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушіє</i>
<i>Конс.</i>							8	
<i>Керівн.</i>		<i>Левтун ІІ</i>				<i>КПІ ім. Ігоря Сікорського, ФБТ</i>		

профілактики ВІЛ-інфекції після діагностування хвороби особа має повторно пройти скринінговий ІФА. Повторний позитивний результат аналізу підтверджується за допомогою вестерн-блоту. [5]

Оскільки стандартний протокол серологічного тестування включає в себе повторні проведення аналізу крові на наявність антитіл, з'являється потреба в великій кількості тест-систем ELISA.

Використання рекомбінантних антигенів для проведення лабораторних досліджень стає дедалі актуальнішим. Все більше лабораторій віддають перевагу синтетичним антитілам на противагу сироваткам людської або тваринної крові. Робота з таким аналогом є безпечнішою, адже виключається можливість наявності інших збудників інфекцій. Рекомбінантні продукти є екологічно чистими та переробляються повністю після застосування в безпечному для навколишнього середовища вигляді, на відміну від сироваток крові. З економічної точки зору, використання синтетичних антигенів є вигіднішим та доступнішим. Виготовлення або купівля антигену є дешевшою та виключає потребу в перевірці матеріалу перед застосуванням.

Метою дипломної роботи є проєктування виробництва для виготовлення рекомбінантного білка р24 для подальшого використання в якості сировини для синтезу моноклональних антитіл Anti-р24 для виготовлення та перевірки тест систем типу ELISA.

Для досягнення поставленої мети було виділено наступні завдання:

1. Провести літературний огляд стандартних технологій виробництва рекомбінантних білків. Обрати промисловий штам продуцента.
2. Описати характеристику біологічного агенту та кінцевого продукту.
3. Описати технологію виробництва рек білка р24, що проєктується, навести перелік сировини та матеріалів, скласти матеріальний баланс виробництва.
4. Виконати технологічні розрахунки виробництва і апарату.
5. Скласти технологічну та апаратурну схему виробництва, креслення апарату для культивування.
6. Описати заходи безпеки на виробництві та охорону праці.

					<i>ДП ББ11 25.000 ПЗ</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		9

послідовність хромосом грибів *S. cerevisiae* є повністю дослідженою та встановлюються нові методи генетичного реконструювання цих організмів для отримання модифікованих штамів здатних до надсинтезу цільових речовин. Дослідженість біохімічних процесів під час культивування дає змогу значно підвищити ефективність секреції укладання та секреції білка та контролю всіх процесів протягом виробництва. З економічної точки зору даний продуцент є дешевим та доступним для виробництва. Дослідження з культивування саме протеїну р24 показують низькі результати в 20-30 мг/мл [7,8].

Останніми роками також набуває популярності використання метилотрофних одноклітинних дріжджів *P. pastoris* в якості продуцента еукаріотичних білків. Цей продуцент ефективно поєднує властивості *E. coli* та *S. cerevisiae*. У порівнянні з кишковою паличкою, ці мікроорганізми більш ефективно згортають більшість білків еукаріотів і утворюють дисульфідні зв'язки з більшою точністю. Культивування *P. Pastoris* в середовищі, що містить метанол, призводить до ефективного інгібування промотора гена оксидази спирту (АОХ1). Тому цей промотор включений до більшості векторів експресії рекомбінантних генів у *P. Pastoris*. При використанні цього продуцента рекомбінантний генний продукт зазвичай розробляється з сигнальною послідовністю для полегшення секреції. У 2006 році було досягнуто межі продукування цільового білка в 417 мг/мл [7,8].

Зважаючи на переваги та недоліки досліджуваних систем експресії, а також на те, що білок р24 є білком ВІЛ, для його продукування можемо обрати *E. coli* в якості продуцента. Можливість утворення високопродуктивних штамів, дешевизна та дослідженість процесів культивування є ключовою перевагою для проектування виробництва для отримання рекомбінантного білка.

Перед початком генетичного реконструювання потрібно обрати штам *E. coli* який буде компетентним до генетичних трансформацій.

Більшість промислових штамів продуцентів рекомбінантних білків є похідними від штамів *E. coli* ліній К-12 та В. Штами лінії К-12 зокрема часто застосовують для проведення генетичних і біохімічних досліджень. Завдяки

					ДП ББ11 25.000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		11

до природніх умов. Кон'югативні властивості плазмідки забезпечують утворення контакту між донорською та реципієнтською клітиною, а мобілізаційні – перенесення ДНК. При цьому перенесення рекомбінантної ДНК відбувається в присутності іншої плазмідки з кон'югативними властивостями [11].

•Електропорація: полягає у збільшенні проникності цитоплазматичної мембрани внаслідок впливу електричного струму. В результаті електрошоку в мембрані утворюються тимчасові пори, через які рекомбінантна ДНК потрапляє в клітину. Ефективність індукування електропорацією залежить від розміру молекули ДНК. Для коротких плазмід (до 3 т.п.н.) ефективність трансформування досягає 10^9 , а для довгих (близько 135 т.п.н.) – до 10^6 [11].

Зазвичай для індукування обирають один метод або комбінацію двох. Для трансформації *E. coli* найбільш економічно вигідною буде трансформація з хімічною індукцією [11].

Отриманий модифікований штам потрібно стабілізувати, щоб забезпечити ефективність і стабільність транскрипції та трансляції мРНК рекомбінантного гена. Забезпечення стабільності мРНК можна досягти шляхом індукованого мутагенезу в гені *rne131*, який забезпечить стійкість полінуклеотиду до дії екзонуклеази та ендонуклеази. Таку мутацію забезпечено в штамі *E. coli* BL21 StarDE3 [12].

Після стабілізації стійкість рекомбінантного штаму тестують штучним добром. Зазвичай для цього культуру висівають на середовище з антибіотиком. Завдяки факторам резистентності до антибіотиків, які закладені в рекомбінантній плазміді, трансформовані клітини проростають на середовищі. Клітини, що не трансформувались або в яких плазмідка не стабілізувалась – гинуть.

Схема отримання промислового продуцента для даного виробництва складається з 11 послідовних стадій:

					ДП ББ11 25.000 ПЗ	Арк.
						13
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

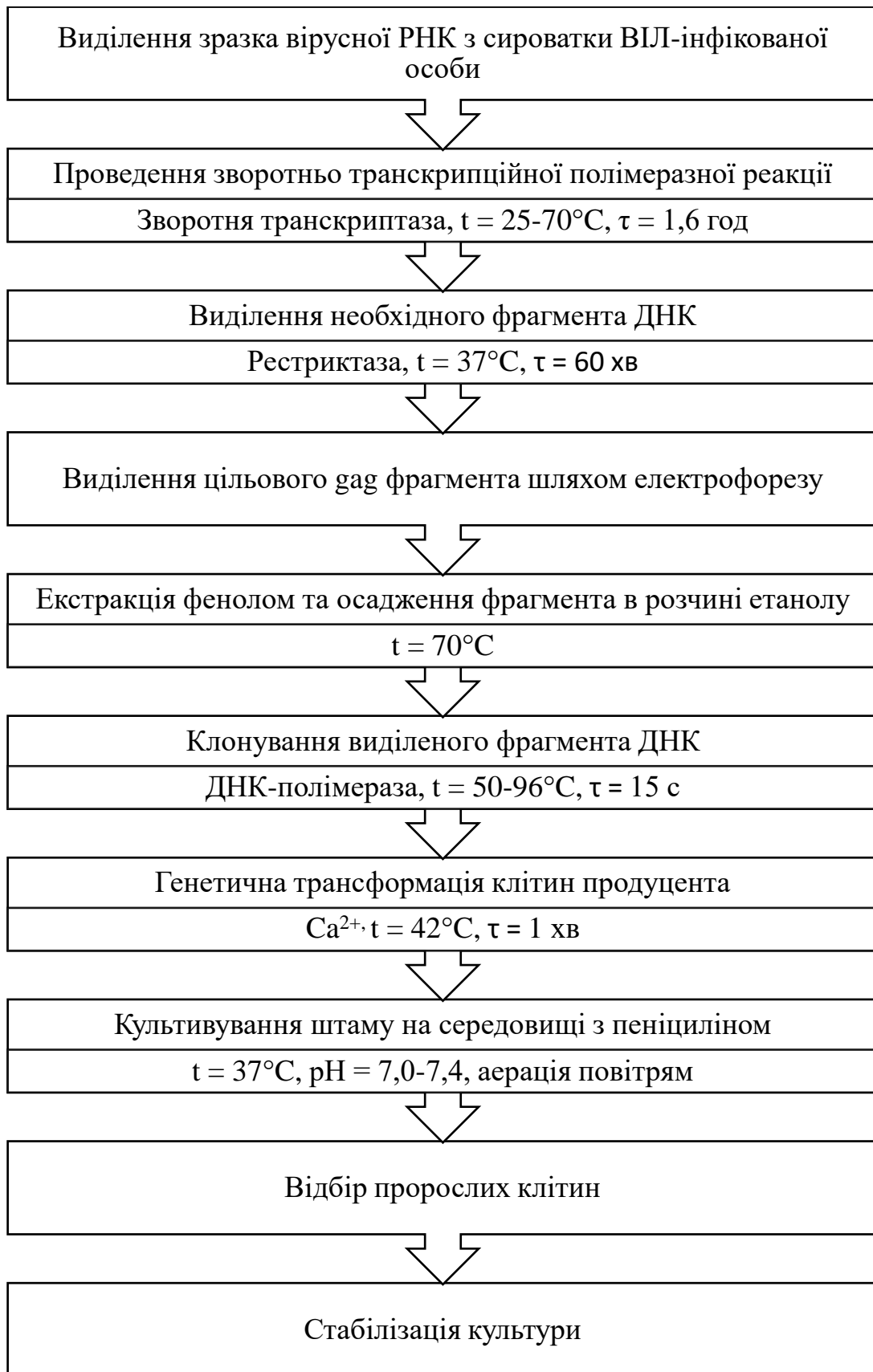


Рисунок 1.1 Схема одержання промислового штаму-продуцента [11].

Одержану культуру штаму зберігають в морозильній камері при температурі -70°C .

					<i>ДП ББ11 25.000 ПЗ</i>	Арк.
						14
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

значно обмежує площу для біосинтезу. Також при використанні цього методу складно контролювати стерильність середовища та умови культивування. Це призводить до низької продуктивності процесу та великого ризику контамінації [15].

Для культивування продуцента було обрано глибинний спосіб культивування через ряд велику кількість переваг. Цей метод є найбільш продуктивним для великомасштабного виробництва бактерій перш за все через те, що у глибинних ферментерах можна підтримувати стабільні оптимальні умови для росту *E. coli*. Для забезпечення високої продуктивності біосинтезу забезпечується точний контроль аерації та перемішування середовища, що запобігає утворенню аеробних зон та забезпечує рівномірний розподіл кисню та поживних речовин для всіх клітин. Оптимальна температура та рівень рН середовища є критичними факторами для росту *E. coli*, тому можливість стабільного забезпечення цих показників також є перевагою. Сучасні ферментаційні системи можуть бути оснащені автоматичними датчиками та системами контролю показників, що дозволяє автоматизувати моніторинг процесу культивування [15].

Оптимальними умовами для нарощення біомаси *E. coli* на початкових стадіях є наявність в середовищі сировини, що містить крохмаль, та глюкозу в невеликій кількості. Проте, наявність глюкози в середовищі інгібує продукування цільового білка. Тому для підвищення засвоєння речовини на перших етапах біосинтезу забезпечується високий рівень кисню в середовищі. Аерування забезпечується барботуванням киснем або повітрям. Оптимальний рівень рН становить 6,7-7,5, проте може змінюватись в процесі через зміни в складі середовища та рівні метаболітів. Оптимальна температура для росту та метаболізму культури *E. coli* становить 37°C [15].

Під час глибинного культивування р24 синтезується бактеріальною клітиною ненативно. Білок накопичується в цитоплазмі та периплазмі клітини. Оскільки цільовий протеїн не є нативним для клітини, то накопичуватись він буде в більшій мірі у вигляді тілець включення. Для ізоляції продукту

					ДП ББ11 25.000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ док.ум.	Підпис	Дата		16

культуральну рідину центрифугують. Біомасу руйнують дією лізоциму. В отриману суспензію також додатково вносять розчин ДНКазиди для зменшення кількості полінуклеотидних залишків. В залежності від кінцевого застосування, для досягнення необхідного рівня чистоти, білок очищують за допомогою хроматографії [16].

1.2 Характеристика біологічного агента

Таблиця 1.1 Таксономія культури *E. coli* [17].

Домен	<i>Bacteria</i>
Відділ	<i>Pseudomonadota</i>
Клас	<i>Gamma proteobacteria</i>
Порядок	<i>Enterobacterales</i>
Родина	<i>Enterobacteriaceae</i>
Рід	<i>Escherichia</i>
Вид	<i>Escherichia coli</i>
Штам	<i>E. coli BL StarDE3</i>

Морфологічні та цитологічні ознаки

Бактерії *Escherichia coli* – це поодинокі грампозитивні палички. Клітини за розміром досягають 1-3 мкм x 0,4-0,7 мкм. Є факультативними анаеробами. Оптимальна температура росту організму становить 37°C, проте клітини здатні розвиватись при температурах 10-45°C. Оптимальне значення рН для життєдіяльності природніх штамів становить 7,2-7,5. Бактерії здатні розвиватись без додаткових факторів росту в середовищі. Деякі штами бактерій цього виду мають перитрихіальні джгутики [18].

Клітинна стінка бактерій складається з шару пептидоглікану та зовнішньої мембрани. Наявність ліпополісахаридів в мембрані забезпечує захист від дії антибіотиків. Генетична інформація зберігається у вигляді ДНК, що зібрана в нуклеоїд без ядерної оболонки [18].

Культуральні ознаки

Культури *E. coli* здатні проростати на збіднених поживних середовищах. Єдиним необхідним чинником росту є наявність в середовищі глюкози, яку організм в ході метаболізму перетворює на всі потрібні для життєдіяльності компоненти та біомолекули. Проте, при внесенні додаткових ростових факторів в середовище з метою промислового біосинтезу, швидкість приросту біомаси та вихід цільового продукту збільшуються [19].

На щільних поживних середовищах культура може утворювати колонії R та S типів. Колонії R типу є шорсткими та пласкими з нерівною поверхнею. Для колоній S типу характерними є опукла кругла форма з рівними краями, колонії є гладкими та напівпрозорими [19].

При поверхневому культивуванні на МПА бактерії утворюють округлі колонії S типу молочного забарвлення. При глибинному культивуванні в МПБ утворюється пристінкове кільце на поверхні середовища. Основна частина біомаси осідає на дно посудини та легко дисперсіюється при струшуванні [19].

При культивуванні на діагностичних середовищах бактерії *E. coli* проявляють характерні ознаки, основними з яких є здатність розщеплювати глюкозу та лактозу з утворенням та запасанням кислоти. Індикатором цього є зміна кольору колоній та середовища [20].

На збагаченому агарі (NA) культура утворює великі округлі колонії молочного кольору. Переважають гладкі та вологі колонії S типу, проте наявні і шорсткі R-колонії [20].

					ДП ББ11 25.000 ПЗ	Арк.
						18
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		



Рис. 1.3 Колонії *E. coli* на збагаченому агарі (НА) [20].

На кров'яному агарі (ВА) утворюються великі круглі вологі колонії сірого кольору. Можуть розвиватись як гемолітичні β колонії, так і негемолітичні в залежності від штаму [20].



Рис. 1.4 Колонії *E. coli* на кров'яному агарі (ВА) [20,21].

На агарі МакКонкі (МАС) наявні круглі вологі, гладкі колонії з рівними краями. Наявність рожевого забарвлення колоній свідчить про наявність процесу ферментації лактози [20,21].

					ДП ББ11 25.000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		19

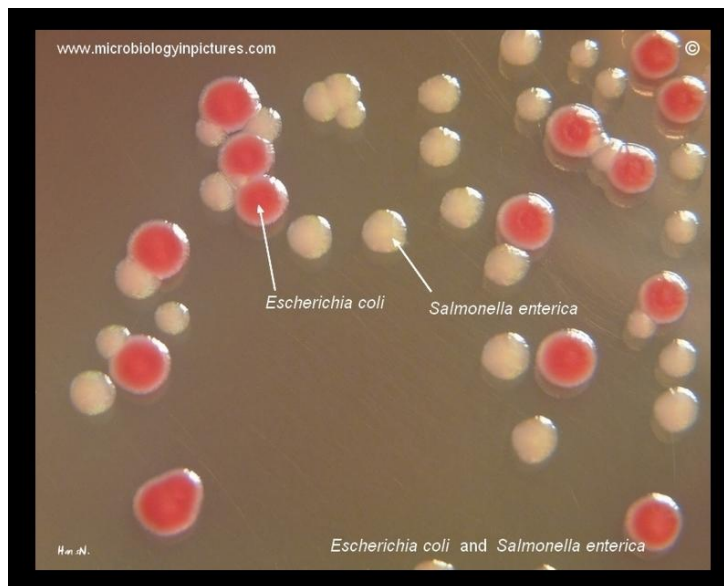


Рис. 1.5 Колонії *E. coli* на агарі МакКонкі (MAC) [20,21].

При вирощуванні на середовищі CLED наявність жовтого забарвлення також підтверджує здатність до розщеплення лактози [20,21].



Рис. 1.6 Колонії *E. coli* на середовищі CLED [20,21].

При культивуванні на агарі Ендо утворюються пласкі колонії темного червоного кольору з зеленим металевим відблиском, що свідчить про розщеплення лактози з виділенням альдегіду та кислоти [20,21].

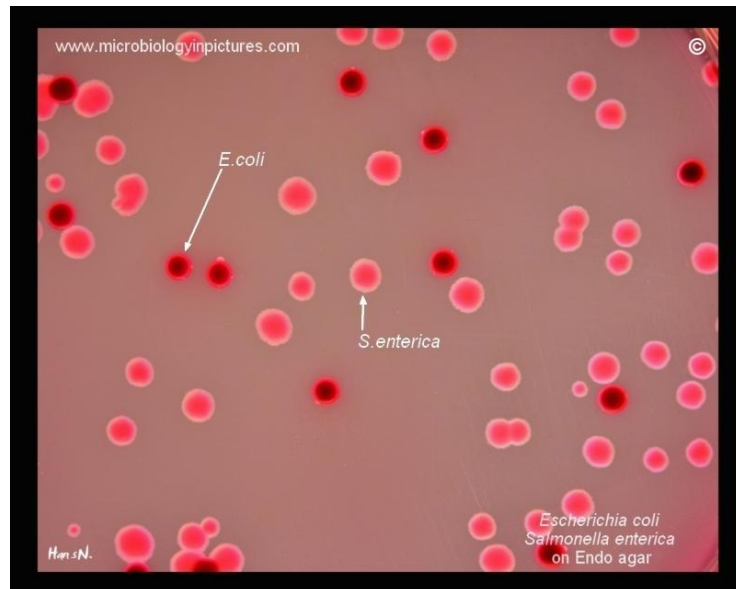


Рис. 1.7 Колонії *E. coli* на середовищі Ендо [20,21].

Фізіологічні та біохімічні ознаки

За типом живлення *E. coli* є гетеротрофними організмами. По відношенню до кисню – факультативними анаеробами. Основним джерелом вуглецю в середовищі є глюкоза. Метаболізм глюкози в організмі відбувається за шляхом Ембдена-Меєргофа-Парнаса, цитратним циклом та фосфоглюконатним шляхом. Відразу після посіву на середовище розвивається за анаеробним шляхом, використовуючи енергію бродіння. В процесі росту бактерії починають споживати кисень і окислювати продукти метаболізму глюкози. АТФ синтезується шляхом ферментації пірувату отриманого в результаті гліколізу [22].

Для забезпечення ефективного приросту біомаси при промисловому культивуванні в середовище додатково збагачують глюкозою, що зменшує час поділу клітин. Також в середовищі додатково підвищують концентрацію розчинного кисню для ефективного аеробного живлення бактерій [22].

					ДП ББ11 25.000 ПЗ	Арк.
						21
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Таблиця 1.2 Біохімічний склад молекули *E. coli* [22].

Компонент	Частка сухого вмісту, %	Вміст в клітині, 10 ⁻¹⁵ г	Молекул на клітину
Білки	55,0	156,0	2350000
РКН	20,5	58,0	255480
ДНК	3,1	8,8	2
Ліпіди	9,1	25,9	22000000
Ліпополісахариди	3,4	9,7	1430000
Пептидоглікан	2,5	7,1	1
Глікоген	2,5	7,1	4300
Поліаміни	0,4	1,1	67000000
Метаболіти, кофактори та іони	3,5	9,9	

Зважаючи на відсутність потреби внесення додаткових ростових факторів, серед популярних для культивування біотехнологічних продуцентів було обрано середовище LB (Luria-Bertani). Це середовище є найбільш оптимальним завдяки своїй доступності та простоті приготування. Вміст в середовищі амінокислот, пептидів, вітамінів та мікроелементів забезпечує всі потреби метаболізму продуцента. LB-середовище є сумісним з більшістю лабораторних штамів *E. coli*, включаючи обраний для виробництва штам BL21 StarDE3. Здатність середовища до модифікування дає змогу створити оптимальні умови для підвищення продуктивності синтезу цільового рекомбінантного білка [23].

Для виробництва, що проєктується, було обрано модифіковане середовище M9.

					<i>ДП ББ11 25.000 ПЗ</i>	Арк.
						22
Змн.	Арк.	№ док.ум.	Підпис	Дата		

Таблиця 1.3 Склад модифікованого середовища М9 [23].

Назва компоненту	Вміст в 1 л середовища
Триптон	10 г
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \bullet 12\text{H}_2\text{O}$	6 г
Глюкоза	5 г
KH_2PO_4	3 г
NH_4Cl	1 г
NaCl	0,5 г
1М MgSO_4	2 мл
Ампіциліну натрієва сіль	0,2 мг
1М CaCl_2	0,1 мл

БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ

2.1 Схема перебігу процесів

Біосинтез цільового рекомбінантного білка р24 здійснюється в цитоплазмі клітин продуцента *E. coli*. Процес біосинтезу складається з транскрипції РНК та трансляції на рибосомах.

Під час транскрипції на матриці ДНК за участі РНК-полімерази II синтезується мРНК. В результаті утворюється зріла РНК, до якої приєднуються рибосоми. Оскільки ДНК знаходиться в цитоплазмі, трансляція відбувається паралельно з транскрипцією [24].

Транскрипція розпочинається з ініціації, яка полягає в приєднанні РНК-полімерази II до промоторної ділянки гена, утворюючи преініціальний комплекс. Цей комплекс розкручує подвійний ланцюг ДНК, що забезпечує доступ до матриці для подальшого синтезу РНК [24].

Наступною фазою є елонгація, під час якої РНК-полімераза II переміщується вздовж молекули ДНК синтезуючи пре-мРНК, яка є комплементарною до ДНК гена. Синтез пре-мРНК завершується при виявленні РНК-полімеразою II термінаторної послідовності. Після цього РНК-полімераза II від'єднується від молекули ДНК [24].

Після транскрипції відбувається посттранскрипційна обробка пре-мРНК, що забезпечує повторне використання однієї молекули для повторної трансляції білка. До 5'-кінця молекули приєднується метильований гуанозин, що захищає мРНК від деградації та сприяє зв'язуванню з рибосомою. Після цього відбувається сплайсинг молекули, під час якого видаляються інтрони, що не кодують цільовий білок [24].

Паралельно з початком транскрипції в цитоплазмі розпочинається активація амінокислот. Результатом цього процесу є утворення комплексу з амінокислоти з відповідною до неї тРНК під дією специфічного фермента аміноацил-тРНК-

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	ДП ББ11 25.000 ПЗ			
Розробив		Шоломинський В.А.			Біотехнологія рекомбінантного білка Gag р24 з використанням штаму <i>E. coli</i> StarDE3	Лім.	Арк.	Акрушіє
Конс.							24	
Керівн.		Левтун ІІ			КПІ ім. Ігоря Сікорського, ФБТ			
Затв.								

синтетази. Формування комплексу відбувається в 2 етапи. На першому етапі амінокислота зв'язується з АТФ утворюючи аміноацил-АМР з виділенням пірофосфату (PPi) [24,25]:



На другому етапі аміноацильна група у вигляді аміноацил-АМФ переноситься на 3'-кінець тРНК з відповідним антикодоном [24,25]:



Загальне рівняння активації амінокислоти має вигляд [24,25]:



Трансляція розпочинається з приєднання до 5'-кінця стабілізованої мРНК комплексу з малої 30S рибосомної субодиниці з ініціаторною тРНК, що несе метіонін. Цей комплекс сканує молекулу мРНК до знаходження старт-кодону АУГ. Після розпізнавання старт-кодону приєднується велика 50S рибосомна субодиниця, формуючи функціональну 70S рибосому. [24,25]

Наступною фазою є елонгація, під час якої рибосома переміщується вздовж мРНК, додаючи відповідні амінокислоти до поліпептидного ланцюга. Цей процес включає в себе вхід відповідної до сайту А кодону мРНК аміноацил-тРНК з утворенням пептидного зв'язку між амінокислотою в поліпептидному ланцюзі, та принесеною. Після передачі амінокислоти т-РНК відділяється. Коли рибосома виявляє стоп-кодон (УАА, УАГ або УГА), що не кодує амінокислоти, відбувається обрив ланцюга поліпептиду. Рибосома відокремлюється від мРНК та дисоціює на 50S та 30S субодиниці. [24,25]

Оскільки цільовий білок р24 не є нативним для *E. coli*, відразу після трансляції він формується в тривимірну структуру та відкладається в цитоплазмі та периплазмі клітини у вигляді тілець-включень.

2.2 Характеристика кінцевого продукту

Кінцевим продуктом виробництва є рекомбінантний білок gag р24. Вимоги до характеристики кінцевого продукту наведені в ТУ У 24.4-24265186-014:2012 «Білки-антигени рекомбінантні очищені».

					ДП ББ11 25.000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		25

Продукт зберігається у розчиненому вигляді в прозорому буферному розчині, рН буферу становить 7,4. Чистота препарату повинна бути більшою ніж 95%. Концентрація цільового продукту в розчині становить 2 мг/мл. Розчин цільового білка зберігають за температури +2-+8°C протягом місяця, або за температури не вище -20°C протягом 12 місяців.

Розчин продукту фасують у пластикові флакони, закривають пластиковими кришками. Для забезпечення герметичності додатково ущільнюють парафілом. На флакон наклеюють маркування, що зазначає країну- та підприємство-виробника, товарний знак та адресу виробництва, назву компоненту, концентрацію та об'єм, номер серії, умови зберігання та термін придатності. Обов'язковим є позначення «in vitro» на маркуванні. Умови транспортування продукту є відповідними до умов зберігання.

					<i>ДП ББ11 25.000 ПЗ</i>	Арк.
						26
Змн.	Арк.	№ док.м.	Підпис	Дата		

ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

3.1 Матеріали основні і допоміжні

Таблиця 3.1 Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів

Найменування	Категорія і номер НДТ, згідно якого перевіряється сировина	Показники, що обов'язкові для перевірки та їх нормативне значення	Примітка
1	2	3	4
1. Основна сировина			
1.1 Агар-агар	ISO 221196	Гелеутворююча здатність – 700-1200 г/см ²	Для приготування ПС
1.2 Амоній хлорид	ДСТУ 7274:2012	Показники згідно з ДСТУ	Для приготування ПС
1.3 Ампіциліну натрієва сіль	ДСТУ 7274:2012	Показники згідно з ДСТУ	Для приготування ПС
1.4 Вода питна	ДСТУ 7525:2014	Показники згідно з ДСТУ	Для приготування ПС
1.4 Вода деіонізована	ДСТУ 7525:2014	Показники згідно з ДСТУ	Для приготування розчинів

					<i>ДП ББ11 25.000 ПЗ</i>			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив		Шоломинський В.А.			<i>Біотехнологія рекомбінантного ділка Gag p24 з використанням штаму E. coli StarDE3</i>	Літ.	Арк.	Акрушіє
Конс.							27	
Керівн.		Левтун ІІ			<i>КПІ ім. Ігоря Сікорського, ФБТ</i>			
Затв.								

1.5 Сечовина	ДСТУ 7312:2013	Показники згідно з ДСТУ	Для приготування розчинів
1.6 Глюкоза	ДСТУ 4464:2005	Показники згідно з ДСТУ	Для приготування ПС
1.7 Дріжджовий екстракт	ДСТУ 8723:2017	Показники згідно з ДСТУ	Для приготування ПС
1.8 Калій фосфорнокислий	ДСТУ 7274:2012	Показники згідно з ДСТУ	Для приготування ПС
1.9 Кальцію хлорид	ГОСТ 450-77	Показники згідно з ГОСТ	Для приготування розчинів
1.9 Кислота сірчана	ДСТУ ГОСТ 2184:2018	Показники згідно з ДСТУ	Для приготування розчинів
1.10 Кислота соляна	ДСТУ 2904-94	Показники згідно з ДСТУ	Для приготування розчинів
1.11 Кислота ортофосфорна	ТУ 6-09-5480-90	Показники згідно стандарту	Для приготування розчинів
1.12 Магній сірчаноокислий	ГОСТ 4523-77	Показники згідно з ГОСТ	Для приготування ПС

1.13 Натрію гідроксид	ДСТУ 7274:2012	Показники згідно з ДСТУ	Для приготування ПС
1.14 Натрій фосфорнокислий 2-зам. 12 водний	ДСТУ 7274:2012	Показники згідно з ДСТУ	Для приготування ПС
1.15 Натрій хлористий	ДСТУ 4886.6:2007	Показники згідно з ДСТУ	Для приготування ПС
1.17 Tween-20	Merck, кат. № 822184	Придатність для ІФА	Для приготування розчинів
1.18 Триптон	Merck, кат. № 110859	Придатність для ІФА	Для приготування ПС
1.19 ЕДТА	ТУ 6-09-11-1721-83	Придатність для ІФА	Для приготування розчинів
1.20 Na ₂ -ЕДТА	ТУ 6-09-11-1721-83	Придатність для ІФА	Для приготування розчинів
1.21 β-ME	Sigma, кат. № M6250	Цілісність тари, герметичність, термін придатності	Для приготування розчинів
1.20 ДНКаза	Merck, кат. № 116326	Цілісність тари, герметичність, термін придатності	Для приготування розчинів

1.21 Лізоцим	Merck, кат. № 105281	Цілісність тари, герметичність, термін придатності	Для приготування розчинів
1.23 Tris-HCl	Merck, кат. № 108387	Цілісність тари, герметичність, термін придатності	Для приготування розчинів
1.24 PMSF	Merck, кат. №420322- 100GM	Цілісність тари, герметичність, термін придатності	Для приготування розчинів
1.25 IPTG	Sigma, кат. № I6758	Цілісність тари, герметичність, термін придатності	Індуктор синтезу цільового продукту
2. Допоміжна сировина			
1.22 Спирт етиловий	ТУ 6-09-1710-77	Концентрація 90%	Для дезинфекції
2.2 «BACU- QUART»	ТУ У 24.2- 21643506.002- 2001	Показники згідно стандарту	Для дезинфекції
2.3 Хлорамін Б	Sigma, кат. № 23265	-	Для дезинфекції
3. Матеріали			
3.1 Комплекти уніформи для працівників	ТУ У 16293843.007- 2000	Показники згідно стандарту	Техніка безпеки

					<i>ДП ББ11 25.000 ПЗ</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		30

3.2 Окуляри захисні	ДСТУ EN 166:2001	Показники згідно з ДСТУ	Техніка безпеки
3.3 Рукавички гумові	ДСТУ EN 455-1:2014	Показники згідно з ДСТУ	Техніка безпеки
3.4 Фільтр з активованим вугіллям	USFilter	Цілісність, чистота	Для очистки повітря
3. Піпетка скляна 5 мл	ДСТУ ISO 4787:2009	Показники згідно з ДСТУ	Для аналізу проби культуральної рідини
3. Кювета для спектрофотометрії	Sigma, кат. № S5178	Цілісність, чистота	Для аналізу проби культуральної рідини
3. Стакан центрифужний	ДСТУ EN ISO 1042	Показники згідно з ДСТУ	Для центрифугування
3. Флакон пластиковий	ДСТУ 4260:2003	Показники згідно з ДСТУ	ПМВ
3. Кришка до пластикових флаконів	ДСТУ 4260:2003	Показники згідно з ДСТУ	ПМВ
3. Парафілм	Sigma, кат. № P7793	Цілісність упаковки та маркування, термін придатності	ПМВ
3. Папір клейкий	ДСТУ 8400:2015	Показники згідно з ДСТУ	ПМВ

3. Картонна упаковка	ДСТУ 2798- 00	Показники згідно з ДСТУ	ПМВ
4. Напівпродукти			
4. Біомаса продуцента р24	-	-	Заморожений при -70°С

3.2 Контроль виробництва

Таблиця 3.2 Точки і параметри контролю виробництва

Найменування процесу, місце заміру параметра або відбору проби	Параметр, що контролюється	Частота контролю	Норми технологічного режиму та допустимі відхилення	Метод контролю параметра, тип приладу
ДР 1.2.1 Приготування миючого засобу	Концентрація миючого розчину	Для кожної операції	C = 10%	Ваговий дозатор
ДР 1.2.2 Приготування розчину етилового спирту	Концентрація етилового спирту	Для кожної операції	C = 70%	Ваговий дозатор
ДР 1.2.3 Приготування розчину Хлораміну Б	Концентрація Хлораміну Б	Для кожної операції	C = 1%	Ваговий дозатор

ДР 1.3 Підготовка виробничих приміщень	Кількість мікроорганізм ів	Для кожної операції	RUO<10	Змив з поверхонь
ДР 1.4.1 Підготовка обладнання та комунікацій	Температура; Час;	Для кожної операції	t = 50°C; τ = 30 хв;	Термометр; Таймер;
ДР 1.4.2 Дезінфекція обладнання та комунікацій	Температура; Час;	Для кожної операції	t = 60°C; τ = 50 хв;	Термометр; Таймер;
ДР 1.4.3 Стерилізація обладнання та комунікацій	Температура; Час; Тиск;	Для кожної операції	t = 140°C; τ = 60 хв; P = 0,2 МПа	Термометр; Таймер; Манометр;
ДР 2.1 Забір повітря	Ступінь чистоти повітря	Для кожної операції	2000 частинок/м ³	Пропускна здатність фільтру
ДР 2.2 Механічна очистка повітря	Ступінь чистоти повітря	Для кожної операції	E = 80%	Пропускна здатність фільтру
ДР 2.3 Компресування	Тиск	Для кожної операції	P = 0,2 МПа	Манометр
ДР 2.4 Стабілізація термодинамічн их показників	Температура	Під час нагріван ня	t = 37°C;	Термометр

ДР 2.5 Очищення на головному фільтрі	Ступінь чистоти повітря	Для кожної операції	$E = 95\%$	Пропускна здатність фільтру
ДР 2.6 Очищення повітря на індивідуальному фільтрі	Ступінь чистоти повітря	Для кожної операції	$E = 99,99\%$	Пропускна здатність фільтру
ДР 3.1.1 Гомогенізація термолабільних компонентів	Маса компонентів; Температура; Час;	Для кожної операції	За технічним регламентом; $t = 80^{\circ}\text{C}$; $\tau = 15$ хв;	Ваговий дозатор; Термометр; Таймер;
ДР 3.1.2 Стерилізація термолабільних компонентів	Температура; Час;	Для кожної операції	$t = 120$ - 122°C ; $\tau = 30$ хв;	Термометр; Таймер;
ДР 3.2.1 Гомогенізація термостабільних компонентів	Маса компонентів; Температура; Час;	Для кожної операції	За технічним регламентом; $t = 80^{\circ}\text{C}$; $\tau = 15$ хв;	Ваговий дозатор; Термометр; Таймер;
ДР 3.2.2 Стерилізація термостабільних компонентів	Температура; Час;	Для кожної операції	$t = 140^{\circ}\text{C}$; $\tau = 30$ хв;	Термометр; Таймер;
ДР 3.3 Гомогенізація поживного середовища	Час;	Для кожної операції	$\tau = 15$ хв;	Таймер;

ТП 4.1 Отримання першої генерації в колбах	Температура; Оптична густина;	Для кожної операції	$t_1 = 20^{\circ}\text{C}$; $t_2 = 37^{\circ}\text{C}$; $D_{540} = 0.6$	Термометр; Спектрофотометр
ТП 4.2 Отримання другої генерації в інокуляторі	Температура; Час; рН;	Для кожної операції	$t = 37^{\circ}\text{C}$; $\tau = 12$ год; рН = 7,0-7,4	Термометр; Таймер; рН-метр
ТП 5 Виробниче культивування	Температура; Час; рН; Відсутність контамінації; Оптична густина; Концентрація індуктора;	Для кожної операції Відбір проби кожні 40 хв;	$t = 37^{\circ}\text{C}$; $\tau = 12$ год; рН = 7,0-7,4; Відсутність сторонніх м.о.; $D_{540} = 0.6$; $C = 0,3$ мМ	Термометр; Таймер; рН-метр; Мікроскопіюванн я; Спектрофотометр Ваговий дозатор;
ТП 6. Відокремлення біомаси	Час; Маса центрифужни х стаканів;	Для кожного циклу осаджен ня	$\tau = 20$ хв; $m = \pm 2$ г	Таймер; Ваги;

ТП 7.1 Відмивка біомаси	Маса компонентів; Температура; Час; Маса центрифужних стаканів;	Для кожного циклу осадження	За технічним регламентом; $t = 4^{\circ}\text{C}$; $\tau = 20$ хв; $m = \pm 2$ г;	Ваговий дозатор; Термометр; Таймер; Ваги;
ТП 7.2 Лізис біомаси	Маса компонентів; Температура; Час; Збільшення в'язкості розчину;	Для кожної операції	За технічним регламентом; $t = 20-24^{\circ}\text{C}$; $\tau = 3$ год;	Ваговий дозатор; Термометр; Таймер; Візуально;
ТП 7.3 Обробка ДНКазою	Маса компонентів; Час; Зниження в'язкості розчину;	Для кожної операції	За технічним регламентом; $\tau = 3$ год;	Ваговий дозатор; Термометр; Візуально;
ТП 7.4 Обробка ультразвуком	Час; Частота ультразвуку;	Для кожного циклу обробки	$\tau = 20$ хв; $\nu = 20$ кГц	Панель дезінтегратора
ТП 7.5 Відмивка тілець включення	Маса компонентів; Температура; Час; Маса центрифужних стаканів;	Для кожного циклу осадження	За технічним регламентом; $t = 10^{\circ}\text{C}$; $\tau = 25$ хв; $m = \pm 0,01$ г;	Ваговий дозатор; Термометр; Таймер; Ваги;

Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ДП ББ11 25.000 ПЗ

Арк.

36

ТП 8 Розчинення очищених тілець- включень	Маса компонентів; Час; Наявність осаду;	Для кожної операції	За технічним регламентом; $\tau = 15-45$ хв; Відсутність частинок білка	Ваговий дозатор; Таймер; Візуально
---	---	---------------------------	--	--

3.3 Матеріальний баланс

Використано					Отримано			
Ста дія	Назва сировини, матеріалів та напівпродуктів	Кількість			Назва сировини, матеріалів та напівпродуктів	Кількість		
		кг	шт.	л		кг	шт.	л
ДР 3	Триптон	0,55			Поживне середовище			52,8
	Дріжджовий екстракт	0,275			Втрати 4%			2,2
	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	0,33						
	Глюкоза	0,275						
	KH_2PO_4	0,165						
	NH_4Cl	0,055						
	NaCl	0,0275						
	1M MgSO_4			0,11				
	Ампіциліну натрієва сіль	0,0000 11						
	1M CaCl_2			0,00 55				

	Вода			53,2 1			
	Всього	55 л			Всього	55 л	
ТП 4.1	Поживне середовище			0,93	Відновлена культура		0,921 6
	Музейна культура			0,03	Втрати 4%		0,038 4
	Всього	0,96 л			Всього	0,96 л	
ТП 4.2	Поживне середовище			4	Посівний матеріал		4,8
	Відновлена культура			0,92 16	Втрати 4%		0,121 6
	Всього	4,9216 л			Всього	4,9216 л	
ТП 5	Поживне середовище			43,2	Культуральна рідина		46,08
	Посівний матеріал			4,8	Втрати 4%		1,92
	Всього	48 л			Всього	48 л	
ТП 6	Культуральна рідина			46,0 8	Осаджена біомаса	0,0 368	
					Супернатант		46,06 56
	Всього	46,08			Всього	46,08	
ТП 7.1	50 мМ Трис- НСІ	0,0039 4			Супернатант		0,528 46
	7 мМ Na ₂ - ЕДТА	0,0013			Осаджена біомаса	0,0 092	
	Вода			0,5			

	Осаджена біомаса	0,0144						
	Всього	0,53134 л			Всього	0,53134 л		
ТП 7.2	50 мМ Tris-HCl	0,0039 4			Суміш біомаси з лізоцимом			0,516 7
	NaCl	0,0029 22						
	1 мМ PMSF	0,0000 871						
	Осаджена біомаса	0,0092						
	Розчин лізоциму			0,00 055 2				
	Вода			0,5				
	Всього	0,5167 л			Всього	0,5167 л		
ТП 7.3	2М MgSO ₄			0,00 000 552	Суміш біомаси з ДНКазою	0,5 990 14		
	ДНКаза			0,00 000 92				
	Суміш біомаси з лізоцимом			0,51 67				
	Всього	0,599014 л			Всього	0,599014 л		
ТП 7.5	Суміш біомаси з ДНКазою	0,5990 14			Відмиті тільця- включення	0,0 059 7		
	2 М карбамід	0,06			Супернатант			0,657

					<i>ДП ББ11 25.000 ПЗ</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		39

	50 мМ Tris-HCl	0,0039 4						
	1 мМ ЕДТА	0,0001 86						
	5 мМ β-ME	0,0001 955						
	Вода			0,5				
	Всього	0,663 л			Всього	0,663 л		
ТП 8	Відмиті тільця- включення	0,0059 7			Розчин буфер + білок			2,985
	8 М карбамід	0,96						
	50 мМ Tris-HCl	0,0157 6						
	1 мМ ЕДТА	0,0007 44						
	2 мМ β-ME	0,0003 126						
	Вода			2				
	Всього	2,985 л			Всього	2,985 л		
ПМ В 9	Розчин буфер + білок			2,98 5	Флакони з цільовим продуктом		145	
	Флакони		145		Втрати			0,85

3.4 Опис технологічного процесу

ДР1 Санітарна підготовка виробництва

ДР1.1 Підготовка персоналу

При підготовці до виробництва весь персонал проходить обов'язкове

					<i>ДП ББ11 25.000 ПЗ</i>	Арк.
						40
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ознайомлення з технікою безпеки при роботі з обладнанням. Інструктаж проводиться незалежно від стажу, кваліфікації чи характеру роботи працівника виробництва.

Перед початком роботи персоналу видається спеціальний робочий одяг, що забезпечує відсутність контакту з потенційно інфікуючими матеріалами.

ДР 1.2. Підготовка миючих і дезінфікуючих розчинів

ДР 1.2.1. Приготування розчину миючого засобу

На ваговому дозаторі Д-1 відділяється порція миючого засобу «ВАСУ-QUART» та води питної. Відповідні порції передаються на механічний перемішувач пристрій Р-2, де вони гомогенізуються протягом 2-ох хвилин при 40 об/хв.

Отриманий розчин подається до ДР1.3 та ДР1.4.1.

ДР 1.2.2. Приготування розчину етилового спирту

На ваговому дозаторі Д-3 відділяється порція розчину етилового спирту концентрацією 90% та води питної у пропорції, необхідній для отримання кінцевої концентрації розчину – 70%. Відповідні порції подаються на механічний перемішувач пристрій Р-4, де вони гомогенізуються протягом 10 хвилин при швидкості обертання мішалки: 50 об/хв.

Отриманий розчин подається на стадію ДР1.4.2.

ДР 1.2.3. Приготування розчину Хлораміну Б

На ваговому дозаторі Д-5 відділяється порція Хлораміну Б та води питної у пропорції, необхідній для отримання кінцевої концентрації – 1%. Відповідні порції подаються на механічний перемішувач пристрій Р-6, де вони гомогенізуються протягом 2-ох хвилин при 40 об/хв.

Отриманий розчин подається до магістралі Т-91.

ДР 1.3. Підготовка виробничих приміщень.

Щоденне прибирання робочого приміщення проводять після закінчення зміни. Основним етапом є протирання робочих поверхонь та обладнання розчином перекису водню. Після завершення робочого тижня всі поверхні протирають розчином Хлораміну Б з 0,5% миючим засобом.

					<i>ДП ББ11 25.000 ПЗ</i>	Арк.
						41
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		

Генеральне прибирання проводиться раз на тиждень. Основними етапами є протирання всіх робочих поверхонь і обладнання розчином перекису водню, протирання дверей, ручок, підлоги 6% розчином етилового спирту з 0,5% миючим засобом.

Використані розчини подаються до стадії ПВ10.

ДР 1.4 Підготовка обладнання та комунікацій

ДР 1.4.1. Мийка вузлів обладнання

Вузли обладнання провимають розчином миючого засобу від Р-2. (температура 50-60°C) протягом 30 хв. Знімальні частини (вузли) обладнання, які безпосередньо торкаються з сировиною або її проміжними продуктами, знімають, розбирають і миють розчинами миючих засобів та водою питною за тієї ж температури.

Після промивання розчином з Р-2 апаратуру ополіскують водою питною відповідної температури.

Використані розчини подаються до стадії ПВ10.

ДР 1.4.2. Дезінфекція обладнання та комунікацій

Для дезінфекції обладнання, зовнішні металічні поверхні промивають розчином з Р-4, неметалічні розчином з Р-6. Для промивання внутрішніх поверхонь обладнання заповнюють розчином з Р-6 і витримують протягом 1 годин при температурі 60°C.

Використані розчини подаються до стадії ПВ10.

ДР 1.4.3. Стерилізація обладнання та комунікацій

До апаратів подається гостра пара з температурою 140°C, тиском 0,3 МПа, протягом 1 години. Після завершення стерилізації конденсат уловлюється конденсатовловлювачем та подається до ПВ10.

Використана пара подається на рекуперацію.

ДР 2. Підготовка повітря.

ДР 2.1. Забір повітря.

Через повітрязбірник ПЗ-7, що встановлений на висоті 8 м над поверхнею виробництва відбувається забір повітря з атмосфери, що подається на фільтр Ф-

8

					<i>ДП ББ11 25.000 ПЗ</i>	Арк.
						42
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		

ДР 2.2. Механічна очистка повітря

Первинне очищення повітря проводиться на набивному фільтрі Ф-8 з завантаженням активованого вугілля. Ефективність очищення повітря від завислих чаток досягає 80%.

Попередньо очищене повітря передається на відцентровий вентилятор високого тиску В-9.

ДР 2.3. Компресування

Повітря з Ф-8 нагнітається в компресорі вентилятора до тиску 0.2 МПа, з нагріванням до температури до 100-140°C та подається на кондиціонер К-10.

ДР 2.4. Стабілізація термодинамічних показників

Повітря з В-9 подається до рекуперативного теплообмінника кожухотрубного типу К-10. В теплообмінник подається вода технічна для охолодження повітря. Конденсат що утворився збирається конденсатовловлювачем та подається до магістралі Т-8.

Повітря подається в повітряний ресивер Р-11 для зберігання.

З ресивера повітря подається на головний фільтр Ф-12.

ДР 2.5. Очищення на головному фільтрі

Повітря з Р-11 подається на головний фільтр очищення набивного типу Ф-12, що має завантаження з активованого вугілля та перхлорвінілового волокна. Ефективність очищення повітря складає до 95%.

Повітря подається до Ф-13.

ДР2.6. Очищення повітря на індивідуальному фільтрі

Повітря з Ф-12 подається на індивідуальний патронний фільтр з тканиною Петрянова Ф-13. Ефективність очищення повітря складає до 99,999%. Повітря подається до інокулятора Ін-21 та реактора Р-24.

ДР 3. Приготування поживного середовища

ДР 3.1. Приготування термолабільних компонентів

ДР 3.1.1. Гомогенізація термолабільних компонентів

На ваговому дозаторі Д-14 відділяється 10 г триптоні, 5 г дріжджового екстракту, 5 г глюкози, 2 мл 1М MgSO₄, 0,2 мг ампіциліну натрієвої солі,

					<i>ДП ББ11 25.000 ПЗ</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		43

0,1 мл 1М CaCl₂ та 0,5 л питної води на 1 л середовища. Відповідні порції подаються на механічний перемішувач з лопатевою мішалкою Р-15. Гомогенізація зі швидкістю обертання мішалки 50 об/хв триває 15 хвилин при температурі 80°C. Температура процесу визначається манометричним термометром, густина утвореного розчину визначається пікнометром та тиск контролюється мановакумометром.

ДР 3.1.2. Стерилізація термолабільних компонентів

Стерилізація термолабільних компонентів відбувається в реакторі змішувачі Р-15, під дією грючої пари, що подається на сорочку апарату. Температура процесу складає 120-122°C, тривалість – 30 хв.

Конденсат що утворився збирається конденсатовловлювачем та подається до магістралі Т-8.

Компоненти подаються на механічний перемішувач з лопатевою мішалкою Р-16.

ДР 3.2. Приготування термостабільних компонентів

ДР 3.2.1. Гомогенізація термостабільних компонентів

На ваговому дозаторі Д-14 відділяється 6 г Na₂HPO₄•12H₂O, 3 г KН₂PO₄, 1 г NH₄Cl, 0,5 мг NaCl та 0,5 л води на 1 л середовища. Відповідні порції подаються на механічний перемішувач з лопатевою мішалкою Р-15. Гомогенізація зі швидкістю обертання мішалки 50 об/хв триває 15 хвилин при температурі 80°C. Температура процесу визначається манометричним термометром, густина утвореного розчину визначається пікнометром та тиск контролюється мановакумометром.

ДР 3.2.2. Стерилізація термостабільних компонентів

Стерилізація термостабільних компонентів відбувається в реакторі змішувачі Р-15, шляхом подачі грючої пари до сорочки апарату. Температура процесу складає 140°C, тривалість – 30 хв.

Конденсат, що утворився в сорочці апарату збирається конденсатовловлювачем та подається до магістралі Т-8.

					<i>ДП ББ11 25.000 ПЗ</i>	Арк.
						44
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		

Компоненти подаються на механічний перемішувачий пристрій з лопатевою мішалкою Р-16.

ДР 3.3 Гомогенізація поживного середовища

Гомогенізація стерилізованих сумішей термолабільних та термостабільних компонентів відбувається в реакторі змішувачі з лопатевою мішалкою Р-16. Перемішування проводять при швидкості обертання мішалки 50 об/хв протягом 15 хв.

Поживне середовище подається через рідинний насос Н-17 до термостатів Т-18, Т-19 для відновлення музейної культури та до дозаторів Д-20, Д-23.

ТП 4. Підготовка посівного матеріалу *E. Coli*

ТП 4.1. Отримання першої генерації в колбах

Музейну культуру *E. coli* штаму BL21 StarDE3 зберігають при -70°C . Для відновлення культури її розморожують при 20°C . Культуру вносять в стерильні пробірки з 10 см^3 модифікованого поживного середовища М9 та переміщують в термостат Т-18. Культивування проводять при температурі 37°C . При досягненні оптичної густини культуральної рідини $D_{540} = 0,6$, культуральну рідину переносять в 3 колби на 1 л з 300 см^3 середовища. Культивування проводять в термостаті Т-19 при 37°C до досягнення оптичної густини культуральної рідини $D_{540} = 0,6$.

Культуру подають до дозатора Д-21.

ТП 4.2. Отримання другої генерації в інокуляторі

Стерилізоване середовище від Р-16 та культуру від Т-19 через дозатор Д-20 подають до інокулятора з турбінною мішалкою Ін-21 об'ємом 10 л. Коефіцієнт заповнення апарату становить 0,3. Культивування проводять при температурі 37°C , швидкість обертання лопастей мішалки 200 об/хв, протягом 12 годин. Для забезпечення оптимальної концентрації розчинного кисню в барбортер подається очищене повітря з Ф-13. Витрата повітря становить 3 л/хв.

Конденсат, що утворився в сорочці інокулятора, збирається конденсатовловлювачем та подається до магістралі Т-8.

Посівний матеріал подається до Р-23.

					<i>ДП ББ11 25.000 ПЗ</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		45

ТП 5. Виробниче культивування

До ферментеру Р-24 об'ємом 160 л через дозатор Д-23 подається поживне середовище від реактора змішувача Р-16. Посівний матеріал подається від інокулятора Ін-21. Коефіцієнт заповнення апарату становить 0,3. Гомогенізація компонентів проводиться під дією турбінної мішалки, $n = 200$ об/хв. Для підтримки стабільної температури культивування 37°C в сорочку ферментера подається технічна вода для охолодження, температуру вимірюють термометром. Для забезпечення оптимальної концентрації розчинного кисню в барбортер подається очищене повітря з Ф-13. Витрата повітря становить 7 л/хв, атмосферний тиск в апараті визначається барометром. Культивування проводять при рН 7,0-7,4, рівень рН визначають рН-метром та контролюють внесенням 40% розчину NaOH.

Для забезпечення мікробіологічного контролю відбирають проби по 3 мл з проміжком в 40 хв. Пробу розглядають під мікроскопом для контролю фактора контамінації середовища.

Для визначення концентрації біомаси вимірюють оптичну густину проби при довжині хвилі $\lambda = 540$ нм. Оптимальна концентрація біомаси культури для індукції синтезу цільового продукту досягається при оптичній густині $D_{540} = 0,6$.

Для забезпечення індукції біосинтезу рекомбінантного білка в культуральну рідину вносять розчин IPTG до досягнення рівня концентрації в середовищі 0,3 мМ. Після внесення індуктора культивування продовжують проводити протягом 3 годин підтримуючи оптимальні умови та проводячи відбір та аналіз проб. При мікроскопіюванні проби відслідковують появу в клітинах бактерії характерних тілець-включень цільового білка.

При створенні в апараті надлишкового тиску відкривають кран трубопроводу, що веде до фільтру Ф-25 через який надлишкове повітря викидають в атмосферу.

Культуральна рідина після культивування розливається в великі центрифужні стакани з точністю до 2 г та передається на центрифугу Ц-26.

ТП 6. Відокремлення біомаси

					<i>ДП ББ11 25.000 ПЗ</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ док.ум.	Підпис	Дата		46

Після завершення процесу біосинтезу в ферментері Р-24 культуральну рідину розливають в великі центрифужні стакани. Масу кожного стакана калібрують з точністю до 2 г.

Стакани вносять в центрифугу Ц-26. Центрифугування відбувається за кімнатної температури при швидкості обертання 3000 об/хв протягом 20 хв. Супернатант зливають до магістралі К-3. Осаджену біомасу знімають чистим шпателем та переносять в стерильні, попередньо зважені фольговані пакети. На пакет наноситься маркування для зазначення серії виробництва, маси напівпродукту, дати приготування та інформації про особу, відповідальну за процес культивування.

Розфасований напівпродукт зберігають при температурі $-70-5^{\circ}\text{C}$ до запуску наступних етапів виробництва.

Процес центрифугування повторюють до повного використання об'єму культуральної рідини.

ТП 7 Виділення та очистка тілець-включень

ТП 7.1 Відмивка біомаси

На ваговий дозатор Д-27 подаються компоненти розчину для промивання клітин. На 1 л розчину додають 50 мМ Трис-НСІ та 7 мМ $\text{Na}_2\text{-ЕДТА}$. Компоненти розчину вносять в реактор змішувач Р-28, де вони гомогенізуються під дією лопатевої мішалки, швидкість обертання мішалки становить 50 об/хв.

В готовий розчин, через дозатор Д-27 подають напівпродукт замороженої біомаси та ресуспендують його в розчині в процесі перемішування.

Суспензію розливають в попередньо зважені центрифужні стакани. Масу кожного стакана калібрують з точністю до 2 г. Стакани переносять в центрифугу Ц-26. Центрифугування проводять при 4°C зі швидкістю обертання 11000 об/хв протягом 20 хв. Супернатант зливають до магістралі К-3. Стакани зважують для визначення маси очищеного напівпродукту. Осаджену біомасу знімають чистим шпателем та переносять назад в реактор змішувач Р-28.

Процес відмивки повторюємо тричі для забезпечення видалення домішків. Після 4 центрифугування перед внесенням очищеної біомаси в реактор змішувач Р-28 в ньому готують буфер для пізису

					<i>ДП ББ11 25.000 ПЗ</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		47

ТП 7.2 Лізис біомаси

На ваговий дозатор Д-27 подають компоненти для приготування буферу для лізису: 50 мМ Tris-HCl, 100 мМ NaCl та 1 мМ PMSF на 1 л розчину. Компоненти розчину вносять в реактор змішувач Р-28, де вони гомогенізуються під дією лопатевої мішалки, швидкість обертання мішалки становить 50 об/хв.

В буферний розчин через ваговий дозатор Д-27 вносять очищену біомасу від центрифуги Ц-25. Біомасу ресуспендують при перемішуванні.

В отриману суспензію вносять розчин лізоциму концентрацією 20 мг/мл. Розчин вносять у співвідношенні до кількості очищеної біомаси, на 100 г біомаси – 120 мг сухого лізоциму. Суспензію перемішують протягом 3 годин при кімнатній температурі. Характерною ознакою процесу лізису є підвищення в'язкості суспензії.

ТП 7.3 Обробка ДНКазою

В отриману в'язку суміш через ваговий дозатор Д-27 вносять розчини 2М MgSO₄ та ДНКазу у відповідному співвідношенні 6 мл та 1 мл на 100 г біомаси. Суміш перемішують протягом 3 годин зі швидкістю обертання 50 об/хв при кімнатній температурі. Характерною ознакою розчинення полінуклеотидів є зменшення в'язкості суспензії.

Отриманий розчин переносять в пластикові стакани та передають на звуковий дезінтегратор Дз-29.

ТП 7.4 Обробка ультразвуком

Для забезпечення повного руйнування клітин біомаси *E. coli* суспензію, отриману на реакторі змішувачі Р-28 розливають по 200 мл в пластикові стакани та поміщають в звуковий дезінтегратор Дз-29.

Суспензію обробляють трьома імпульсами ультразвуку частотою 20 кГц по 20 с, з інтервалами між імпульсами в 30 с.

Оброблену ультразвуком суспензію переносять в попередньо зважені центрифужні стакани. Маса кожного стакана калібрують з точністю до 0,01 г. Обробку ультразвуком повторюють до повного використання суспензії.

Стакани з обробленою ультразвуком суспензією біомаси переносять до центрифуги Ц-30

					ДП ББ11 25.000 ПЗ	Арк.
						48
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ТП 7.5 Відмивка тілець-включень

Суспензію, отриману від звукового дезінтегратора Дз-29, розливу в стакани для центрифугування, врівноважені з точністю до 0,01 г, переносять в центрифугу Ц-30. Центрифугування проводять при 10°C зі швидкістю обертання 11000 об/хв протягом 25 хв. Супернатант зливають до магістралі К-3. Отриманий осад тілець-включень знімають чистим шпателем та переносять в гомогенізатор Р-32. Процес центрифугування повторюють до повного використання суспензії.

На ваговий дозатор Д-31 подають компоненти розчину для відмивки тілець-включень: 2 М карбамід, 50 мМ Tris-HCl та 1 мМ ЕДТА + 5 мМ β-МЕ на 1 л розчину. Компоненти вносять на гомогенізатор Г-31.

Осад тілець-включень ресуспендують в розчині для промивання та пережають на повторне центрифугування на центрифугу Ц-30. Цикл відмивки повторюють 3 рази.

Після завершення чотирьох циклів центрифугування осад відмитих тілець-включень переносять чистим шпателем в реактор-змішувач Р-34.

ТП 8 Розчинення очищених тілець-включень

На ваговий дозатор Д-33 подають компоненти буферного розчину для ресуспендування відмитих тілець-включень: 50 мМ Tris-HCl, 1 мМ ЕДТА + 2 мМ β-МЕ на 1 л розчину.

Осад очищених тілець-включень від Ц-30 переносять в реактор-змішувач Р-34, де ресуспендують.

В утворену суспензію через дозатор Д-33 вносять сечовину до досягнення кінцевої концентрації 8 М. Після внесення сечовини розчин інкубують при кімнатній температурі при швидкості перемішування мішалки 50 об/хв протягом 15-45 хв до повного розчинення білка.

Готовий буферний розчин сечовини з розчиненим цільовим продуктом концентрацією 2 мг/мл передають через насос Н-35 на ділянку пакування та маркування ПМ-36.

ПМВ 9 Пакування, маркування та відвантаження

					<i>ДП ББ11 25.000 ПЗ</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		49

Буферний розчин сечовини з розчиненим цільовим білком розливають в стерильні пластикові флакони за допомогою автоматичних піпеткових дозаторів з одноразовими пластиковими наконечниками та закривають кришками. Для додаткового забезпечення герметизації продукту додатково герметизують парафіллом.

На флакони наносять етикетки, на яких зазначено країну- та підприємство-виробника, товарний знак та адресу виробництва, назву компоненту, концентрацію та об'єм, номер серії, умови зберігання та термін придатності. Обов'язковим є позначення «in vitro» на маркуванні. Умови транспортування продукту є відповідними до умов зберігання.

Флакони укладають в картонні коробки, на які додатково наклеюється відповідне до флаконів маркування, та відправляють на склад.

ПВ 10 Переробка відходів

Обладнання та матеріали, що можуть використовуватись повторно, обробляють та очищують для використання.

Повітряні фільтри стерилізують насиченою водяною парою при тиску 0,12-0,2 МПа та $t = 120^{\circ}\text{C}$, після чого промивають водою та обробляють дезинфікуючими розчинами.

					<i>ДП ББ11 25.000 ПЗ</i>	Арк.
						50
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		

ПІДБІР ТА ХАРАКТЕРИСТИКА ОБЛАДНАННЯ

4.1 Розрахунок потужності виробництва

Згідно з даними, в Україні відсутнє промислове виробництво з виготовлення рекомбінантного білка gag p24 для використання в якості сировини для виготовлення систем для ІФА. Цей білок виробляється в невеликих кількостях безпосередньо в лабораторіях локальних виробництв тест-систем типу ELISA. При культивуванні в лабораторних умовах, вихід цільового продукту становить 170 мг/мл [26].

Метод виробництва цільового білка при культивуванні рекомбінантного штаму *E. coli* StarDE3 з подальшим виділенням продукту через відмивку тілець-включень є експериментальним для промислових масштабів.

За даними Центру громадського здоров'я України, за 2024 рік було зареєстровано 10017 нових випадків ВІЛ-інфекції. Враховуючи, що кількість антигену, що використовується для виготовлення однієї тест-системи типу ELISA в середньому становить 10,7 мг, то лише для одноразового тестування всіх нових випадків захворювання було використано 107,19 г антигену.

За клінічним протоколом, для підтвердження діагнозу необхідним є неодноразовий позитивний результат аналізу. Також цільовий продукт може використовуватись для виготовлення тест-систем для кількісного визначення не лише самого антигену в сироватці людини, а й до антитіл анти-p24, що дозволяє використовувати його для моніторингу процесу лікування при АРТ.

Зважаючи на використання нетрадиційного методу виробництва цільового продукту, невелику потребу ринку в продукті в порівнянні з іншими промисловими виробництвами, потенціал імпорту, а також масові втрати під час виробництва рекомбінантного білка та використання його в якості сировини, доцільним буде розглядати створення підприємства низької потужності.

Проектна потужність виробництва становить 1 кг рекомбінантного білка

					<i>ДП ББ11 25.000 ПЗ</i>			
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розробив</i>		<i>Шоломинський В.А.</i>			<i>Біотехнологія рекомбінантного білка Gag p24 з використанням штаму E. coli StarDE3</i>	<i>Лім.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушіє</i>
<i>Конс.</i>							51	
<i>Керівн.</i>		<i>Левтцен ІІ</i>				<i>КПІ ім. Ігоря Сікорського, ФБТ</i>		
<i>Затв.</i>								

p24 на рік, що є еквівалентним 20000 флаконів з 20 мл розчину цільового білка з концентрацією 2 мг/мл.

В подальшому існує потенціал розширення асортименту виробництва та його масштабування при доведенні ефективності технології.

Оскільки основною та найбільш тривалою стадією виробництва є стадія культивування штаму бактерій *E. coli*, доцільним буде визначати загальну тривалість виготовлення однієї партії за тривалістю культивування.

За умови безперервного функціонування підприємства протягом року, з закладанням 30 календарних днів на технічне обслуговування обладнання, проектна потужність виробництва становить:

$$Q = \frac{V}{T} \cdot t = \frac{1}{335} \cdot 2 = 0,00597 \frac{\text{кг}}{\text{партію}} = 5,97 \frac{\text{г}}{\text{партію}}, \quad (4.1.1)$$

де V – загальна запланована потужність підприємства на рік, кг/рік;

T – тривалість календарного року, дні;

t – час культивування, дні.

Враховуючи повне відтворення лабораторних умов виробництва при масштабуванні, приймаємо, що кінцевий вихід рекомбінантного продукту становить 170 мг/л культуральної рідини.

Номінальний об'єм реактора для культивування становить:

$$V_H = \frac{Q}{K_3 \cdot C_{II}} = \frac{5,97 \cdot 10^{-3}}{0,3 \cdot 170 \cdot 10^{-3}} = 0,117 \text{ м}^3, \quad (4.1.2)$$

де K_3 – коефіцієнт заповнення реактора 0,4;

C_{II} – концентрація білка при проведенні одного циклу виробництва, кг/л;

За вимогами ДСТУ 2238-96, обираємо реактор типу 1 з еліптичним днищем та плоскою кришкою з номінальним об'ємом 0,16 м³.

					ДП ББ11 25.000 ПЗ	Арк.
						52
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

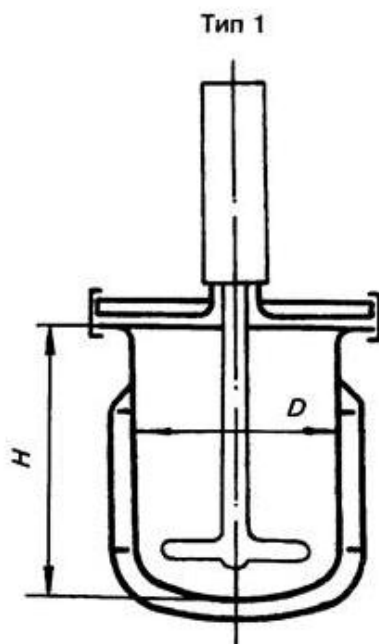


Рисунок 4.1 Апарат з механічним перемішувальним пристроєм 1 типу з еліптичним днищем та пласкою кришкою [27]

4.2 Конструктивний розрахунок апарату

Згідно з ДСТУ 2238-96 відповідно до номінального об'єму апарату $V_H = 0,16$ м³ визначаємо геометричні характеристики апарату та еліптичного днища:

Внутрішній діаметр: $D_{вн} = 600 \text{ мм} = 0,6 \text{ м}$;

Висота відбортової частини: $h_1 = 25 \text{ мм} = 0,025 \text{ м}$;

Висота еліптичної частини: $h_b = 150 \text{ мм} = 0,15 \text{ м}$;

Товщина стінки: $S = 6 \text{ мм} = 0,006 \text{ м}$;

Внутрішня поверхня днища: $F = 0,44 \text{ м}^2$;

Об'єм днища: $V_{дн} = 35,2 \text{ дм}^3 = 0,0352 \text{ м}^3$; [27]

Висота днища апарату становить:

$$H_{дн} = h_1 + h_b = 0,025 + 0,15 = 0,175 \text{ м}, \quad (4.2.1)$$

Об'єм циліндричної частини апарату становить:

$$V_{ц} = V_H - V_{дн} = 0,16 - 0,0352 = 0,1248 \text{ м}^3, \quad (4.2.2)$$

Висота циліндричної частини становить:

$$H_{ц} = \frac{V_{ц}}{F} = \frac{V_{ц} \cdot 4}{\pi \cdot D^2} = \frac{0,1248 \cdot 4}{3,14 \cdot 0,6^2} = 0,4416 \text{ м}, \quad (4.2.3)$$

									Арк.
									53
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	<i>ДП ББ11 25.000 ПЗ</i>				

Висота рівня рідини в циліндричній частині становить:

$$H_{\text{цр}} = H_{\text{ц}} \cdot K_3 = 0,4416 \cdot 0,3 = 0,132 \text{ м}, \quad (4.2.4)$$

Загальна висота стовпа рідини становить:

$$H_p = H_{\text{цр}} + H_{\text{дн}} = 0,132 + 0,175 = 0,307 \text{ м}, \quad (4.2.5)$$

Загальна висота апарату становить:

$$H = H_{\text{дн}} + H_{\text{ц}} = 0,175 + 0,4416 = 0,6166 \text{ м}, \quad (4.2.6)$$

Для забезпечення рівномірного розподілу кисню, поживних речовин та культури продуцента в всьому об'ємі культуральної рідини забезпечують перемішування. Для забезпечення ефективного перемішування було обрано відкриту турбінну мішалку з прямими лопатями відповідно до вимов ГОСТ 20680-75.

Параметри перемішуючого пристрою визначаються за співвідношеннями, наведеними в таблиці:

Таблиця 4.1 Співвідношення геометричних параметрів турбінної мішалки [27]

Параметр перемішуючого пристрою	Співвідношення для визначення
Діаметр мішалки	$D/d_M=3/4$
Висота лопаті мішалки	$h_M/d_M=0,2$
Довжина лопаті мішалки	$l/d_M=0,25$
Висота розміщення мішалки	$h/d_M=0,4$
Коефіцієнт гідравлічного опору	8,4

Орієнтовний діаметр мішалки становить:

$$d_m = \frac{D}{4} = \frac{0,6}{4} = 0,15 \text{ м}, \quad (4.2.7)$$

За стандартним рядом значень діаметрів турбінної мішалки відповідно до ГОСТ 20680-75 обираємо значення діаметру мішалки $d_m = 0,16$ м.

Висота лопаті мішалки становить:

$$h_m = 0,2 \cdot d_m = 0,2 \cdot 0,16 = 0,032 \text{ м}, \quad (4.2.8)$$

Довжина лопаті мішалки становить:

$$l_m = 0,25 \cdot d_m = 0,25 \cdot 0,16 = 0,04 \text{ м}, \quad (4.2.9)$$

Висота розміщення мішалки складає:

$$h = 0,4 \cdot d_m = 0,4 \cdot 0,16 = 0,064 \text{ м}, \quad (4.2.10)$$

За технічним регламентом технології швидкість обертання мішалки становить 200 об/хв, $n = 3,33$ об/с.

4.3 Розрахунок глибини воронки

В процесі перемішування на поверхні рідини утворюється воронка, глибина якої залежить від гідродинамічного режиму. Режим характеризується параметрами γ , E , ψ .

Параметр висоти завантаження γ складає:

$$\gamma = 8 \frac{H_p}{D} + 1 = 8 \frac{0,307}{0,6} + 1 = 5,093, \quad (4.3.1)$$

Параметр гідравлічного опору мішалки E розраховуємо за формулою:

$$E = \frac{\gamma}{\xi_M z_M Re_{\psi}^{0,25}}, \quad (4.3.2)$$

де ξ_M – коефіцієнт гідравлічного опору мішалки;

z_M – кількість мішалок на одному валу;

Re_{ψ} – центробіжний критерій Рейнольдса;

Центробіжний критерій Рейнольдса становить:

$$Re_{\psi} = \frac{n \cdot d_M^2}{\nu} = \frac{3,33 \cdot 0,16^2}{1,45 \cdot 10^{-6}} = 58792, \quad (4.3.3)$$

$$E = \frac{5,093}{8,4 \cdot 1 \cdot 58792^2} = 0,0175$$

					<i>ДП ББ11 25.000 ПЗ</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		55

За значенням параметра гідравлічного опору відповідно до графіку на рисунку 4.2 знаходимо значення параметра ψ .

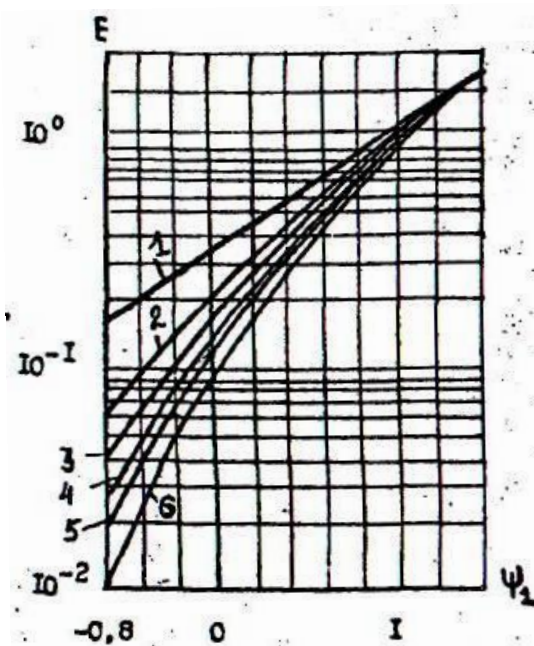


Рисунок 4.2 Параметр розподілення швидкості $\psi=fE$ для мішалок: трьохлопастної (01), турбінна відкритої (03), шестилопастної (05), лопастної (07), емальований лопастних, фрезерної та пропелерної при $zD \geq 1,5$ [27]
 $\psi = -0,5$ – значення параметру розподілення

За значенням параметру розподілення з графіку на рисунку 4.2 знаходимо параметр глибини воронки.

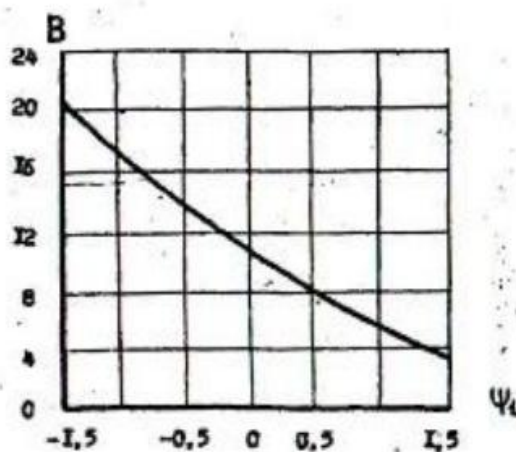


Рисунок 4.3 Параметр глибини воронки

$$B=f(\psi) [27]$$

Параметр глибини воронки $B = 13$.

Глибину воронки знаходять за формулою :

$$h_B = \frac{Bn^2 d_M^2}{2} = \frac{13 \cdot 3,33^2 \cdot 0,16^2}{2} = 1,85 \text{ м} \quad (4.3.4)$$

Гранично допустима глибина воронки:

$$h_{zp} = H_p - h = 0,307 - 0,064 = 0,243 \text{ м}, \quad (4.3.5)$$

де h – висота встановлення мішалки над днищем.

Якщо виконується співвідношення, то в апараті встановлюють перегородки.

$$h_b > h_{zp} = 1,85 > 0,243,$$

Отже, в апараті встановлюємо перегородки.

4.4 Розрахунок потужності, що витрачається на перемішування

Потужність, що витрачається на перемішування визначаємо за формулою:

$$N = K_N \cdot \rho \cdot n^3 \cdot d_M^5, \quad (4.4.1)$$

де K_N – критерій потужності, що залежить від інтенсивності перемішування і характеризується центробіжним критерієм Рейнольдса.

Критерій потужності визначаємо за графіком нормалі на рисунку 4.4.

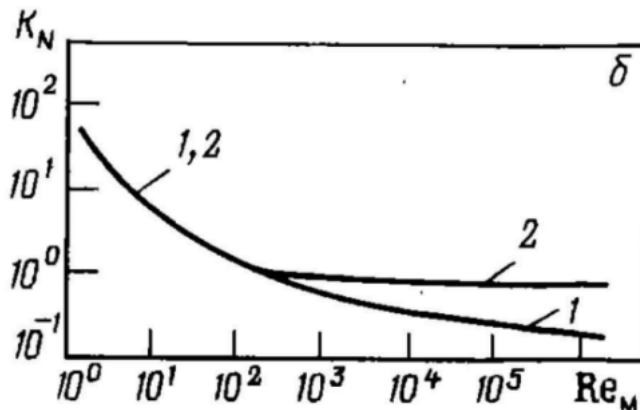


Рисунок 4.4 Графік залежності $K_N = f(Re_{ц})$ [27]

За графіком $K_N = 8$. Отже:

$$N = 8 \cdot 1050 \cdot 3,33^3 \cdot 0,16^5 = 12,176 \text{ Вт}$$

4.5 Тепловий розрахунок апарату

Для визначення необхідної для проведення культивування площі теплообміну проводимо тепловий розрахунок процесу.

										Арк.
										57
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	ДП ББ11 25.000 ПЗ					

Загальний робочий об'єм апарату становить:

$$V_p = V_n \cdot K_3 = 0,16 \cdot 0,048 \text{ м}^3, \quad (4.5.1)$$

Тоді об'єми поживного середовища та посівного матеріалу для проведення процесу становлять відповідно:

$$V_{пс} = 0,9 \cdot V_p = 0,9 \cdot 0,048 = 0,0432 \text{ м}^3, \quad (4.5.2)$$

$$V_{пм} = 0,1 \cdot V_p = 0,1 \cdot 0,048 = 0,0048 \text{ м}^3, \quad (4.5.3)$$

Джерелами енергії процесу є поживне середовище, посівний матеріал, повітря, що надходить від барботера, теплота хімічних реакцій, що відбуваються при культивуванні та дисипація механічної енергії мішалки

Загальне рівняння надходження теплоти в процесі культивування має вигляд:

$$\sum E_{\text{надх}} = E_{пс} + E_{пм} + E_{пов1} + E_p + E_{\text{дис}}, \quad (4.5.4)$$

де $E_{пс}$, $E_{пм}$, $E_{пов1}$, E_p та $E_{\text{дис}}$ – енергія, що надходить в процес від різних джерел.

$E_{пс}$ та $E_{пм}$ визначаємо за формулою:

$$E = M \cdot C \cdot t = \rho \cdot V \cdot C \cdot t, \quad (4.5.5)$$

$$E_{пс} = 1050 \cdot 0,0432 \cdot 3820 \cdot 37 = 6411,182 \text{ КДж}$$

$$E_{пм} = 1050 \cdot 0,0048 \cdot 37 \cdot 3820 = 712,354 \text{ КДж}$$

Енергію повітря визначаємо за формулою:

$$E_{пов1} = \rho_{пов} \cdot V_{пов} \cdot \tau \cdot C_{пов} \cdot t_{пов}, \quad (4.5.6)$$

$$E_{пов1} = 1,1391 \cdot 0,005 \cdot 43200 \cdot 1005 \cdot 37 = 9149,205636 \text{ КДж}$$

Енергію теплоти хімічних реакцій визначаємо за формулою:

$$E_p = m_{\text{цук}} \cdot r_{\text{цук}}, \quad (4.5.7)$$

де $r_{\text{цук}} = 16,5 \text{ МДж/кг}$.

$$m_{\text{цук}} = 0,1 \cdot 0,9 \cdot V_p \cdot \rho_c, \quad (4.5.8)$$

$$m_{\text{цук}} = 0,1 \cdot 0,9 \cdot 0,048 \cdot 1050 = 4,536 \text{ кг}$$

$$E_p = 4,536 \cdot 16,5 \cdot 10^6 = 74,844 \text{ МДж}$$

					<i>ДП ББ11 25.000 ПЗ</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		58

Енергію теплоти, яка виділяється в результаті дисипації механічної енергії перемішувачів визначаємо за формулою:

$$E_{\text{дис}} = N_{\text{м}} \cdot \tau_{\text{пр}} = 12,176 \cdot 43200 = 526 \text{ КДж}, \quad (4.5.9)$$

Таким чином, сумарна кількість теплоти надходжень до ферментеру :

$$\sum E_{\text{надх}} = 6411,182 \cdot 10^3 + 712,354 \cdot 10^3 + 9149,2 \cdot 10^3 + 74,844 \cdot 10^6 526 \cdot 10^3 = 91,643 \text{ МДж}, \quad (4.5.10)$$

Витрати енергії при процесі культивування складаються з втрат при контакті з повітрям, на нагрівання культуральної рідини та втрат в навколишнє середовище:

Втрати на нагрівання повітря становлять:

$$E_{\text{пов}_2} = M_{\text{пов}} \cdot C_{\text{пов}} \cdot t_c = \rho_{\text{пов}} \cdot V_{\text{Г}} \cdot \tau_{\text{пр}} \cdot C_{\text{пов}} \cdot t_c = 1,1391 \cdot 0,005 \cdot 43200 \cdot 1005 \cdot 37 = 9149,206 \text{ КДж}, \quad (4.5.11)$$

Втрати на нагрівання культуральної рідини становлять:

$$E_{\text{к}} = 1050 \cdot 0,048 \cdot 3820 \cdot 37 = 7123,536 \text{ КДж}$$

Витрати енергії в навколишнє середовище становлять:

$$E_{\text{втр}} = 0,02 \cdot (E_{\text{к}} + E_{\text{пов}_2}); \quad (4.5.12)$$

$$E_{\text{втр}} = 0,02 \cdot (7123,536 + 9149,206) = 325,455 \text{ КДж}$$

Таким чином, сума теплових витрат складає:

$$\sum E_{\text{витр}} = 7123,536 \cdot 10^3 + 9149,206 \cdot 10^3 + 325,455 \cdot 10^3 = 16598,197 \text{ КДж}$$

Розраховуємо теплове навантаження у ферментері:

$$E_{\text{т}} = 16598,197 - 91643 = -75044,803 \text{ КДж}, \quad (4.5.13)$$

Від'ємне значення теплового навантаження свідчить про підвищення температури в процесі культивування. Для підтримування оптимальних умов культивування продуцента необхідно охолоджувати апарат.

Визначаємо початкову та кінцеву температури теплоносія. Оскільки відбувається процес охолодження, то:

$$t_{\text{т}} = t_{\text{р}} - \Delta t_{\text{ср}}, \quad (4.5.14)$$

де $\Delta t_{\text{ср}} = 10^{\circ}\text{C}$.

$$t_{\text{т}} = 37 - 10 = 27^{\circ}\text{C}, \quad (4.5.15)$$

					<i>ДП ББ11 25.000 ПЗ</i>	Арк.
						59
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Витрата теплоносія становить:

$$G_B = \frac{E_T}{C_B \cdot \Delta t_{cp}} = \frac{75,044 \cdot 10^6}{4187 \cdot 10} = 179,2 \frac{\text{кг}}{\text{с}}, \quad (4.5.16)$$

Коефіцієнт теплопередачі від середовища культивування до стінки апарата розраховуємо за формулою:

$$\alpha_1 = \frac{Nu_1 \cdot \lambda_1}{D}, \quad (4.5.17)$$

Критерій Нусельта розраховуємо за формулою:

$$Nu_1 = C \cdot Re_{\text{ц}}^n \cdot Pr_1^{0,33}, \quad (4.5.18)$$

Де $C=0,760$, $n=0,67$ – коефіцієнти для апарату з сорочкою, перегородками та відкритою турбінною мішалкою;

Pr_1 – критерій Прандтля для середовища.

Критерій Прандтля для середовища визначаємо за формулою:

$$Pr_1 = \frac{\mu_1 \cdot C_{p1}}{\lambda_1} = \frac{1,55 \cdot 10^{-3} \cdot 3820}{0,545} = 10,86, \quad (4.5.19)$$

$$Nu_1 = 0,760 \cdot (41,62 \cdot 10^4)^{0,67} \cdot 10,86^{0,33} = 9717,84$$

Коефіцієнт тепловіддачі від середовища до стінки апарата становить:

$$\alpha_1 = \frac{9717,84 \cdot 0,545}{0,6} = 8827,038 \frac{\text{Вт}}{\text{м}^2\text{К}}$$

Коефіцієнт тепловіддачі від теплоносія до стінки сорочки знаходять за формулою:

$$\alpha_2 = \frac{Nu_2 \cdot \lambda_2}{d}, \quad (4.5.20)$$

де d – діаметр каналу сорочки;

$$Nu_2 = C(Gr \cdot Pr)^n, \quad (4.5.21)$$

де коефіцієнти $C = 0,15$ і $n=0,33$ знаходять в залежності від величини добутку $Gr \cdot Pr$:

у випадку, коли воду використовують як теплоносій:

$$Gr \cdot Pr = H_p^3 \cdot \Delta t_1 \cdot B, \quad (4.5.22)$$

Значення B для $27^\circ\text{C} = 23,55 \cdot 10^9$

$$\Delta t_1 \approx \frac{\Delta t_{cp}}{2} = \frac{10}{2} = 5, \quad (4.5.23)$$

					<i>ДП ББ11 25.000 ПЗ</i>	Арк.
						60
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

$$Gr \cdot Pr = 0,22^3 \cdot 5 \cdot 23,55 \cdot 10^9 = 1,254 \cdot 10^9$$

$$Nu_2 = 0,15(1,254 \cdot 10^9)^{0,33} = 150,84$$

Еквівалентний діаметр каналу сорочки розраховуємо за формулою:

$$d_{\text{екв}} = \frac{2 \cdot a \cdot b}{a + b}, \quad (4.5.24)$$

Коефіцієнт $b=0,14$.

Коефіцієнт a розраховуємо за формулою:

$$a = \frac{D_c - 2\delta_{cm} - D}{2} = \frac{0,7 - 2 \cdot 0,01 - 0,6}{2} = 0,04 \text{ м}, \quad (4.5.25)$$

Еквівалентний діаметр каналу сорочки розраховуємо за формулою:

$$d_{\text{екв}} = \frac{2 \cdot 0,04 \cdot 0,14}{0,04 + 0,14} = 0,062 \text{ м}, \quad (4.5.26)$$

Коефіцієнт тепловіддачі для води у сорочці становить:

$$\alpha_2 = \frac{150,84 \cdot 0,608}{0,062} = 1479,21 \frac{\text{Вт}}{\text{м}^2\text{К}}$$

Коефіцієнт теплопередачі становить:

$$K = \frac{1}{\frac{1}{\alpha_1} + \frac{\delta}{\lambda} + \frac{1}{\alpha_2}} = \frac{1}{\frac{1}{8827,038} + \frac{0,01}{16} + \frac{1}{1479,21}} = 707,05 \frac{\text{Вт}}{\text{м}^2\text{К}}, \quad (4.5.27)$$

Тоді поверхня теплообміну становить:

$$F = \frac{Q}{K \cdot \Delta t \cdot \tau} = \frac{75044,803 \cdot 10^3}{707,05 \cdot 10 \cdot 43200} = 0,246 \text{ м}^2, \quad (4.5.28)$$

Дійсна поверхня теплообміну сорочки становить $0,9 \text{ м}^2$.

$$F_p < F_d$$

$$0,246 \text{ м}^2 < 0,9 \text{ м}^2$$

Отже, дійсна поверхня теплообміну сорочки апарата забезпечує збереження оптимальних температурних умов культивування протягом процесу.

4.6 Розрахунок барботера

Відстань від перемішуючого пристрою до барботера становить:

$$h_\delta = 0,25d_m = 0,25 \cdot 0,16 = 0,4 \text{ м}, \quad (4.6.1)$$

					<i>ДП ББ11 25.000 ПЗ</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		61

Діаметр барботера становить:

$$D_6 = (0,5 \div 0,75)d_m = 0,75 \cdot 0,16 = 0,12 \text{ м}, \quad (4.6.2)$$

Діаметр отвору барботера становить:

$$d_0 = 2 \text{ мм} = 0,002 \text{ м}, \quad (4.6.3)$$

Загальна кількість отворів в барботері становить:

$$z_{\text{отв}} = \frac{4V_r}{\pi d_0^2 W_0}, \quad (4.6.4)$$

де $V_r = 0,005 \text{ м}^3/\text{с}$.

Приймаємо $W_0 = 20 \text{ м/с}$, тоді:

$$z_{\text{отв}} = \frac{4 \cdot 0,005}{3,14 \cdot 0,002^2 \cdot 20} = 48 \text{ отворів}, \quad (4.6.5)$$

Відстань між отворами барботера становить:

$$t_{\text{отв}} = \frac{\pi D_6}{z_{\text{отв}}} = \frac{3,14 \cdot 0,12}{48} = 0,008 \text{ м}, \quad (4.6.6)$$

Сумарна площа поперечного перерізу отворів барботера становить:

$$S_{\text{отв}} = \frac{\pi}{4} d_0^2 \cdot z_{\text{отв}} = \frac{3,14}{4} \cdot 0,002^2 \cdot 48 = 1,51 \cdot 10^{-4} \text{ м}^2, \quad (4.6.7)$$

4.7 Розрахунок штуцерів

Масова витрата води G_B становить 1792 кг/с .

Приймаємо:

Масова витрата середовища $G_C = 20 \text{ кг/с}$.

Швидкість руху середовища та води в штуцерах $w = 3 \text{ м/с}$.

Діаметр штуцерів розраховуємо за формулою:

$$d = \sqrt{\frac{4G}{\pi w \rho}}, \quad (4.7.1)$$

Діаметр штуцерів для середовища:

$$d = \sqrt{\frac{4 \cdot 20}{3,14 \cdot 3 \cdot 1050}} = 0,0899 \text{ м}$$

Для середовища приймаємо штуцери $d = 90 \text{ мм}$.

					<i>ДП ББ11 25.000 ПЗ</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		62

Діаметр штуцерів для води:

$$d = \sqrt{\frac{4 \cdot 17,92}{3,14 \cdot 3 \cdot 1050}} = 0,085 \text{ м}$$

Для теплоносія приймаємо штуцери $d = 90$ мм.

					<i>ДП ББ11 25.000 ПЗ</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		63

ОХОРОНА ПРАЦІ

Перед початком виробництва усі працівники зобов'язані ознайомитись з інструктажем з техніки безпеки під час роботи на виробництві та правил пожежної безпеки під час роботи з обладнанням. До робочого місця працівник допускається лише в спеціалізованому одязі.

Для зменшення зносу обладнання та відповідно збільшення терміну експлуатації та зменшення ризиків аварії на виробництві працівники зобов'язані проводити належний догляд за обладнанням та відслідковувати відхилення в виробничому процесі для вчасного ремонту обладнання.

Контроль концентрації шкідливих речовин у повітрі робочої зони повинен здійснюватися з періодичністю, відповідно до класу небезпеки речовини. Для речовин 3 класу небезпеки цей контроль здійснюється раз на квартал. Для очищення повітря робочої зони необхідно використовувати вентиляційні системи з належним фільтруванням, які відповідають вимогам стандарту ДСТУ Б А.3.2-12:2009 "Системи вентиляційні. Загальні вимоги".

Виробничі приміщення повинні бути оснащені первинними засобами пожежогасіння згідно з ДСТУ 2272:2006 "Пожежна безпека. Терміни та визначення основних понять" та ДСТУ 8828:2019 "Пожежна безпека. Загальні положення".

Виробниче обладнання повинно відповідати вимогам ДСТУ 7234:2011 "Дизайн і ергономіка. Обладнання виробниче. Загальні вимоги дизайну та ергономіки", затвердженому наказом Держстандарту України від 02 лютого 2011 року № 37. Обертіві та рухомі частини обладнання повинні бути захищені відповідно до ГОСТ 12.2.062-81 "ССБТ. Оборудование производственное. Ограждения защитные", затвердженого постановою Держстандарту СРСР від 30 жовтня 1981 року № 4772.

Технічне обслуговування та планові ремонти повинні виконуватися за

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	ДП ББ11 25.000 ПЗ		
Розробив		Шоломинський В.А.			Лім.	Арк.	Акрушіє
Конс.							
Керівн.		Левтун ІІ			КПІ ім. Ігоря Сікорського, ФБТ		
Затв.							

встановленим графіком. Перед експлуатацією обладнання повинні проводитися контроль та оцінка ризиків для ідентифікації можливих небезпек та розробки заходів для їх усунення. Пожежна небезпека може виникнути, головним чином, в результаті пошкоджень, порушення герметичності в апаратах і підвищення тиску вище допустимого значення [27,28].

До роботи з апаратом допускається лише повнолітня особа, яка пройшла інструктажі з техніки безпеки та правил роботи з обладнанням. Працівники зобов'язані дотримуватись правил внутрішнього розпорядку виробництва та вимог стосовно безпеки. Працівник несе відповідальність за чинним законодавством у разі недотримання інструкцій з техніки безпеки [29].

Перед початком роботи з розпилювальною сушаркою оператор повинен: Ознайомитись з загальним інструктажем з техніки безпеки та додатковим інструктажем з правилами роботи з даним апаратом та одягти відповідний спеціалізований робочий одяг [29].

Перед початком робочого процесу працівник повинен перевірити наявність всіх необхідних засобів особистого захисту, стан робочого місця на дотримання вимог техніки безпеки, працездатність огорожень, блокування та звукових сигналів та справність вимикачів [30].

Вимоги безпеки під час роботи:

Під час роботи з розпилювальною сушаркою оператор повинен:

- перебувати в спеціалізованому робочому одязі
- дотримуватись норм технологічної інструкції впродовж всього періоду роботи;
- користуватись лише справними інструментами та робочим інвентарем;
- контролювати справність пристроїв безпеки;
- тримати дверцята силової шафи управління закритими;
- перед проведенням робіт з очистки, догляду та ремонту обладнання та деталей повністю вимикати обладнання;
- не дозволяти перебування на виробничій ділянці осіб, що не залучені у проведення процесу [30].

					<i>ДП ББ11 25.000 ПЗ</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		65

При роботі конвеєра працівнику необхідно:

- перед запуском конвеєра оповістити звуковим сигналом про запуск обладнання;

- контролювати рівень насипу порошку в сушарці та бункерах;

Під час роботи заборонено:

- самостійно ремонтувати, підкручувати та затягувати деталі обладнання;

- покидати робоче місце під час роботи обладнання [30].

У випадках виникнення непередбачуваних обставин: перебій подачі електроенергії, виявлення несправності обладнання, посторонніх звуків чи запахів; працівник сушильної установки повинен зупинити обладнання, повідомити дежурних членів ремонтної бригади, сповістити наявному майстру про виникнення надзвичайної ситуації та, за можливості, залишити на пульті запуску попереджувальну записку [30].

При особистому травмуванні працівник повідомляє відповідального майстра та прямує до медпункту. При травмуванні іншого працівника, надається перша невідкладна медична допомога та повідомляється майстер, а працівник відправляється до медпункту. Якщо це є можливим, то до прибуття відповідних, уповноважених працівників місце травмування залишається недоторканим [18].

При виявленні ознак пожежі працівник повинен відразу викликати пожежну бригаду та сповістити чергового майстра зміни. При можливості працівник проводить заходи щодо гасіння пожежі, збереження цінностей та провести евакуацію [30].

Перед закінченням робочої зміни підприємства, працівник здійснює зупинку та відключення всього робочого обладнання своєї виробничої ділянки, забезпечує відповідний до технологічних умов стан робочого місця та прибирає робочі інструменти та захисний одяг до відведеного місця зберігання [30].

Керівник та/чи майстер зміни повинен бути повідомлений про порушення дотримань техніки безпеки [30].

					<i>ДП ББ11 25.000 ПЗ</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		66

ВИСНОВКИ

1. При аналізі літературних джерел було досліджено основні методи продукування рекомбінантного білка gag p24 в виробничих масштабах. Встановлено, що вихід цільового протеїну при культивуванні *E. coli* становить 170 мг/мл, що на 83% більше ніж при культивуванні *S. cerevisiae*, та на 154% менше ніж при використанні культури *P. pastoris*. Проте, зважаючи на менш доступну та потенційно небезпечну технологію культивування *P. pastoris*, в якості продуцента для виробництва, що проектується, обрано рекомбінантний штам *E. coli* StarDE3 через його здатність до ефективного накопичення біомаси та синтезу цільового продукту.

2. Досліджено морфологічно-цитологічні, та фізіологічно-біохімічні особливості продуцента. На основі даних було встановлено оптимальні умови для культивування *E. coli*: наявність глюкози в середовищі, аерація киснем, температура 37°C. Для виробничого культивування було обрано модифіковане середовище M9, що забезпечить покращення темпів росту біомаси та секрецію протеїну p24. Згідно нормативних документів наведена характеристика кінцевого продукту виробництва, а саме кінцева форма продукту та умови зберігання.

3. Описано технологічну схему виробництва, та параметри, які забезпечують досягнення встановленої продуктивності виробництва продукту відповідно до вимог продукту. Основними етапами виробництва є культивування біомаси продуцента *E. coli* та виділення і очистка тілець-включень цільового продукту. На апаратурній схемі зображено допоміжні апарати для виробництва (реактори-змішувачі для приготування миючих розчинів та станція очистки повітря), апарати для культивування (термостати, інокулятор та ферментер) та апарати для виділення та очистки цільового рекомбінантного білка p24. Наведено перелік сировини та матеріалів

					<i>ДП ББ11 25.000 ПЗ</i>		
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>			
<i>Розробив</i>		<i>Шоломинський В.А.</i>			<i>Лім.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушіє</i>
<i>Конс.</i>						67	
<i>Керівн.</i>		<i>Левтун ІІ</i>			<i>КПІ ім. Ігоря Сікорського, ФБТ</i>		
<i>Затв.</i>							

Біотехнологія рекомбінантного білка Gag p24 з використанням штамму E. coli StarDE3

виробництва, складено матеріальний баланс процесу та встановлено, що за 1 цикл виробництва виготовляється 145 флаконів розчину цільового протеїну.

4. Проведено технологічні розрахунки виробництва, за якими встановлено цільову тонажність виробництва 26390 флаконів/рік. Для досягнення поставленої цілі було підібрано ферментер об'ємом 160 л типу 1 з плоскою кришкою та еліптичним дном, в якому відбувається культивування продуцента та індукція синтезу цільового продукту. Робочий об'єм ферментера становить 48 л. Для перемішування середовища було обрано турбінну мішалку та розраховано її параметри.

5. Запропоновано пропозиції та заходи щодо забезпечення охорони праці, техніки безпеки, охорони довкілля, згідно до нормативних документів.

6. Було виконано графічну частину роботи, що складається з трьох аркушів формату А1: технологічна та апаратурна схеми й креслення апарату ферментера. В технологічній схемі описано стадії підготовки виробництва, культивування біомаси продуцента та виділення і очистки тілець-включень цільового білка. На апаратурній схемі зображено основні та допоміжні апарати виробництва. На кресленні ферментера зображено вид апарату в розрізі збоку, зверху, та виноску розрізу перемішуючого пристрою. Зазначено технічні характеристики апарату та таблицю штуцерів.

					<i>ДП ББ11 25.000 ПЗ</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		68

СПИСОК ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Global HIV & AIDS statistics – Fact sheet. Режим доступу: <http://unaids.org/en/resources/fact-sheet>
2. Епідеміологічна ситуація з ВІЛ-інфекції в Україні станом на 01.04.2025. Режим доступу: <https://phc.org.ua/kontrol-zakhvoryuvan/vilsnid/statistika-z-vilsnidu>
3. Мавров Г.І., Щербакова Ю.В., Іщейкін К.Є., Каменєв В.І., Ємченко Я.О. Механізм проникнення ВІЛ-інфекції // Актуальні проблеми сучасної медицини. – 2019. – Т.19. № 2(66) – с.235-240
4. Wu G, Zuck P, Goh SL, Milush JM, Vohra P, Wong JK, Somsouk M, Yukl SA, Shacklett BL, Chomont N, Haase AT, Hatano H, Schacker TW, Deeks SG, Hazuda DJ, Hunt PW, Howell BJ. Gag p24 Is a Marker of Human Immunodeficiency Virus Expression in Tissues and Correlates With Immune Response. J Infect Dis. 2021 Nov 16;224(9):1593-1598.
5. Новий клінічний протокол із застосування антиретровірусних препаратів для лікування та профілактики ВІЛ-інфекції. Затверджено наказом Міністерства охорони здоров'я України 05.06.2019 №1292.
6. Schütz A, Bernhard F, Berrow N, Buyel JF, Ferreira-da-Silva F, Haustraete J, van den Heuvel J, Hoffmann JE, de Marco A, Peleg Y, Suppmann S, Unger T, Vanhoucke M, Witt S, Remans K. A concise guide to choosing suitable gene expression systems for recombinant protein production. STAR Protoc. 2023 Dec 15;4(4):102572.
7. Sørensen, H.P. Towards universal systems for recombinant gene expression. Microb Cell Fact 9, 27 (2010).
8. Guokun Wang, Mingtao Huang, Jens Nielsen. Exploring the potential of Saccharomyces cerevisiae for biopharmaceutical protein production. Current Opinion in Biotechnology. Volume 48. 2017. Pages 77-84.
9. Sørensen HP, Mortensen KK. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in Escherichia coli. J Biotechnol. 2005 Jan 26;115(2):113-28.

					<i>ДП ББ11 25.000 ПЗ</i>			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив		Шоломинський В.А.			<i>Біотехнологія рекомбінантного білка Gag p24 з використанням штаму E. coli StarDE3</i>	Лім.	Арк.	Акрушіє
Конс.							69	
Керівн.		Левтун ІІ				<i>КПІ ім. Ігоря Сікорського, ФБТ</i>		
Затв.								

10. Thomason LC, Costantino N, Li X, Court DL. Recombineering: Genetic Engineering in Escherichia coli Using Homologous Recombination. Curr Protoc. 2023 Feb;3(2): e656. doi: 10.1002/cpz1.656. Erratum in: Curr Protoc. 2024 Nov;4(11): e70064
11. Компанець Т.А. Курс лекцій «Віруси як вектори». Київ. 2007. 84с.
12. García-Fraga B, da Silva AF, López-Seijas J, Sieiro C. Optimized expression conditions for enhancing production of two recombinant chitinolytic enzymes from different prokaryote domains. Bioprocess Biosyst Eng. 2015 Dec;38(12):2477-86.
13. Baneyx F. Recombinant protein expression in Escherichia coli. Curr Opin Biotechnol. 1999 Oct;10(5):411-21.
14. <https://www.genscript.com/gsfiles/vector-map/bacteria/pET-24a.pdf?1564343972>
15. Bobyr, I. & Bondarenko, V. & Iungin, O.. (2024). Optimization of culture media for industrial cultivation of the recombinant strain Escherichia coli BL21. Ukrainian Journal of Natural Sciences. 17-24.
16. Zhang, B., Liu, D., Bao, Z. et al. High level soluble expression, one-step purification and characterization of HIV-1 p24 protein. Virol J 8, 316 (2011).
17. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=469008&lvl=3&keep=1&srchmode=1&unlock&lin=s&log_op=lineage_toggle
18. Nanninga N. Morphogenesis of Escherichia coli. Microbiol Mol Biol Rev. 1998 Mar;62(1):110-29.
19. Silva RM, Toledo MR, Trabulsi LR. Biochemical and cultural characteristics of invasive Escherichia coli. J Clin Microbiol. 1980 May;11(5):441-4.
20. Sagar Aryal. E. coli (Escherichia coli)- An Overview. 2022 June; 23 https://microbenotes.com/escherichia-coli-e-coli/?utm_source=chatgpt.com
21. <https://www.microbiologyinpictures.com/escherichia%20coli.html>
22. Neidhardt and Umbarger, chapter 3 in Neidhardt F.C. Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology. 2nd edition. Vol 1. American Society of Microbiology (ASM) Press 1996. table 1

					<i>ДП ББ11 25.000 ПЗ</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		70

23. Paliy O, Gunasekera TS. Growth of E. coli BL21 in minimal media with different gluconeogenic carbon sources and salt contents. Appl Microbiol Biotechnol. 2007 Jan;73(5):1169-72. Erratum in: Appl Microbiol Biotechnol. 2006
24. Wakim, S., & Grewal, M. Protein Synthesis. Butte College. 2022.
25. Bruce Alberts, Rebecca Heald, Alexander Johnson. Molecular Biology of the Cell. 7-th ed. W. W. Norton & Company, 2022. 1552 с.
26. Teow SY, Mualif SA, Omar TC, Wei CY, Yusoff NM, Ali SA. Production and purification of polymerization-competent HIV-1 capsid protein p24 (CA) in NiCo21(DE3) Escherichia coli. BMC Biotechnol. 2013 Dec 4;13:107.
27. Ружинська Л.І. Проектування реакторів біотехнологічних та фармацевтичних виробництв. Навч. посібник/ Укладачі: Л.І. Ружинська, І А Буртна, В.М.Поводзинський, В.Ю. Шибецький – К.: НТУУ «КПІ», 2014 – 130 с.
28. Крюковська О.А., Левчук К.О. Охорона праці в галузі (для хімічних спеціальностей) під редакцією к.т.н., доцента Толока А.О.: Навч. посібник. – 2011. – 230 с.
29. Закон України —Про охорону праці / від 14.10.1992 року № 49.
30. Охорона праці та промислова безпека. Монографія /К. Н. Ткачук, Л. Д. Третьякова, Д. В. Зеркалов, О. І. Полукаров, С. Ф. Каштанов, / – К.: «Основа». 2014. – 823 с.

					<i>ДП ББ11 25.000 ПЗ</i>	Арк.
						71
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Відомість специфікації обладнання

Індекс і номер за схемою	Найменування	Кількість одиниць	Технічна характеристика
Д-1,3,5,14, 20,23,27,31, 33	Дозатор ваговий	9	Дозатор фасувальник автомат для сипких продуктів. Каталог "Titan techniks". Параметри: Продуктивність 100 кг/год, діапазон похибок 0,1-0,2г, потужність 60 Вт.
Р-2,4,6,16, 28,32,34	Реактор	7	Апарат з механічним перемішуючим пристроєм СЕон 0,01. Каталог «СВРОМАШ». Обладнаний ваговим дозатором. Об'єм 1 м ³ . Параметри: робочий тиск до 4 кПа. Перемішуючий пристрій якірна мішалка, потужність 1,5 кВт.
ПЗ-7	Повітрязабірник	2	Труба сталевая. Каталог «Епіцентр». Параметри: висота труби 18м, діаметр 0,3м.
КП-7.1,24.2	Манометр	1	Манометр промисловий 8012 001 G1/2. Каталог «ARMATURA». Параметри: клас точності 2.5, робочий тиск 0-1 бар.
Ф-8	Фільтр	1	Фільтр попереднього очищення ФЯР. Параметри: пилоємність 200 г/м ² , ефективність 75%, продуктивність 3000 м ³ /м ² год.
В-9	Вентилятор	1	Відцентровий вентилятор високого тиску ВЦ 10-28. Каталог «Вентилятори радіальні». Потужність 5000 об/хв, продуктивність 1000 м ³ /год
Вл-10	Вологорозділювач	1	Вологорозділювач SKL150B. Каталог «Omega-Air». Робочий тиск до 16 Бар. Пропускна здатність – 1500 м ³ /год
Р-11	Ресивер	1	Ресивер повітряний POLMO-WASIAK 393.304.0. Каталог «Пневматичні системи» Параметри: 30л.
Ф-12,13,22, 25	Фільтр	4	Фільтр UPA. Каталог «ECS Group». Параметри: складається з трьох фільтрів HEPA 14, F7 та F9.
Р-15	Реактор	1	Апарат з механічним перемішуючим пристроєм СЕон 1.0. Каталог «СВРОМАШ». Обладнаний конденсатовідвідником. Об'єм 10 м ³ . Параметри: робочий тиск до 4 кПа. Перемішуючий пристрій якірна мішалка, потужність 1,5 кВт.

Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ДП ББ11 25.000 ПЗ

Арк.

72

КП-8,12,13, 15.1, 21.1, 24.1	Термометр	6	Промисловий термометр т7100. Параметри: клас точності 1, діапазон температур -200 – 600С, нержавіюча сталь.
Н-17,35	Насос	2	Насосна станція Metabo HWW 3300/25 G. Каталог «Metabo». Потужність 900 Вт, продуктивність 3300 л/хв. Матеріал – чугун.
Т-18,19	Термостат	2	Інкубатор Memmert IN30. Каталог «Mettler». Об'єм 32 л. Діапазон температур 20–80°С.
Ін-21	Інокулятор	1	Апарат з механічним перемішуючим пристроєм SEon 1.0. Каталог «СВРОМАШ». Обладнаний конденсатовідвідником та ваговим дозатором. Об'єм 10 м3. Параметри: робочий тиск до 4 кПа. Перемішуючий пристрій якірна мішалка, потужність 1,5 кВт.
Ц-26,30	Центрифуга	2	Центрифуга Sorvall BIOS 6. Каталог «BIOS A». Максимальна ємність 8 x 2 л. Максимальна швидкість обертання 5400 об/хв. Діапазон температур -20–40°С.
Дз-29	Дезинтегратор звуковий	1	Дезинтегратор Infitek USCG-T. Каталог «F Series». Діапазон потужності 100-2000Вт. Частота 20 кГц. Об'єм 3 л.

					<i>ДП ББ11 25.000 ПЗ</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		73