

**НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»
Факультет біотехнології і біотехніки
Кафедра промислової біотехнології та біофармації**

ЗАТВЕРДЖУЮ
в.о. завідувача кафедри
_____ Валентина ПОЛІЩУК
«10» червня 2023 р.

**Дипломний проєкт
на здобуття ступеня бакалавра
за освітньо-професійною програмою «Біотехнології»
спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»
на тему «Технологія виробництва мозаїчного рекомбінантного антигену
вірусу гепатиту С. Дільниця біосинтезу»**

Виконав:
студентка IV курсу, групи БТ-91
Вознюк Мирослава Ярославівна _____

Керівник:
проф. каф. пром. біотехнології та біофармації, д.б.н.,
Дуган Олексій Мартем'янович _____

Консультант з Розділу 5. Розрахунок обладнання для
проведення технологічного процесу:
доц. каф. біотехніки та інженерії, к.т.н.,
Шибєцький Владислав Юрійович _____

Рецензент:
проф. каф. біоенергетики, біоінформатики та екобіотехнології
Горго Юрій Павлович _____

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

Київ – 2023 року

ВІДОМІСТЬ ДИПЛОМНОГО ПРОЕКТУ

[illegible]

				ДП БТ-9106 00.0000.00		
	ПІБ	Підп.	Дата	Відомість дипломного проєкту	Лист	Листів
Розробн.	Вознюк М. Я.				1	85
Керівн.	Дуган О. М.				КПІ ім. Ігоря Сікорського Каф. ПББФ Гр. БТ-91	
Консульт.	Шидецький В. Ю.					
Н/контр.						
Зав. каф.	Поліщук В. Ю.					

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

Факультет біотехнології і біотехніки

Кафедра промислової біотехнології та біофармації

Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)

Спеціальність – 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Освітньо-професійна програма «Біотехнології»

ЗАТВЕРДЖУЮ

в.о. завідувача кафедри

_____ Валентина ПОЛІЩУК

«19» квітня 2023 р.

ЗАВДАННЯ

на дипломний проєкт студентці

Вознюк Мирославі Ярославівні

1. Тема проєкту «Технологія виробництва мозаїчного рекомбінантного антигену вірусу гепатиту С. Дільниця біосинтезу», керівник проєкту Дуган Олексій Мартем'янович, д.б.н., проф, затверджені наказом по університету від «22» травня 2023 р. № 1889-с.
2. Термін подання студентом проєкту 10.06.2023 р.
3. Вихідні дані до проєкту: кінцевий продукт – рекомбінантний антиген NS3 вірусу гепатиту С; ферментер для промислового культивування – об'єм 12,5 м³; спосіб очистки продукту – хроматографія.
4. Зміст пояснювальної записки: підібрати та надати характеристику продуцента для виробництва мозаїчного рекомбінантного антигену NS3 вірусу гепатиту С; здійснити аналіз різних методів створення високопродуктивних промислових продуцентів, надати обґрунтування схеми отримання обраного продуцента, який використовується в проєкті; проаналізувати основні фізико-хімічні характеристики кінцевого продукту і встановити біохімічні основи його виробництва; скласти матеріальний баланс виробництва, розробити технологічну

і апаратурну схему; обґрунтувати вибір конструкції ферментеру, здійснити технологічний, конструктивний та тепловий розрахунки.

5. Перелік графічного матеріалу (із зазначенням обов'язкових креслеників, плакатів, презентацій тощо): креслення загального виду ферментеру – 1 арк. А1, технологічна схема – 1 арк. А1, апаратурна схема – 1 арк. А1.

6. Консультанти розділів проекту

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Розділ 5	Шибецький В. Ю., доц. каф. біотехніки та інженерії		

7. Дата видачі завдання: _____

Календарний план

№ з/п	Назва етапів виконання дипломного проекту	Термін виконання етапів проекту	Примітка
1.	Характеристика біологічного агента	19.04.23-28.04.23 р.	
2.	Біохімічні основи виробництва	28.04.23-02.05.23 р.	
3.	Методи отримання промислових продуцентів	02.05.23-07.05.23 р.	
4.	Виконання технологічної частини	07.05.23-15.05.23 р.	
5.	Складання апаратурної схеми	15.05.23-20.05.23 р.	
6.	Розрахунок обладнання для проведення технологічного процесу	20.05.23-27.05.23 р.	
7.	Оформлення пояснювальної записки	27.05.23-30.05.23 р.	
8.	Подання дипломного проекту на рецензування	31.05.23-05.06.23 р.	
9.	Подання дипломного проекту та рецензії до екзаменаційної комісії	до 10.06.23 р.	

Студентка _____

Мирослава ВОЗНЮК

Керівник _____

Олексій ДУГАН

Пояснювальна записка
до дипломного проєкту
на тему: «Технологія виробництва мозаїчного
рекомбінантного антигену вірусу гепатиту С. Дільниця
біосинтезу»

Київ – 2023 року

РЕФЕРАТ

Дипломний проєкт викладено на 85 сторінках друкованого тексту і містить 6 рисунків, 4 таблиці, 3 кресленики, 43 літературних посилання.

Метою роботи є розробка технології виробництва мозаїчного рекомбінантного антигену вірусу гепатиту С з використанням технології біосинтезу.

Запропоновано в якості продуцента використовувати штам *Escherichia coli* XL1- Blue, який характеризується низькою вірогідністю спонтанної індукції, що значно оптимізує процес біосинтезу. Проведено аналіз морфологічних, культурних та фізіолого-біохімічних характеристик обраного мікроорганізму-продуцента, а також вивчено його пробіотичні властивості.

У даній роботі були проведені розрахунки та вибрано відповідне обладнання для культивування бактерій *Escherichia coli* XL1- Blue. Проведені технологічні, конструктивні та теплові розрахунки дозволили оптимізувати виробничий ферментер. Також розроблені технологічна та апаратурна схеми для ефективного виробництва обраної продукції.

У цій роботі презентована технологія, яка відповідає екологічним та санітарно-гігієнічним стандартам. Були вжиті необхідні заходи з безпеки та охорони праці, щоб забезпечити безпечність та здоров'я працівників.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: ГЕПАТИТ С, РЕКОМБІНАНТНИЙ БІЛОК NS3, ВИРОБНИЦТВО БІЛКУ, БІОСИНТЕЗ, *ESCHERICHIA COLI*, ІНДУКЦІЯ, ВИРОБНИЧЕ КУЛЬТИВУВАННЯ.

					ДП БТ-9106. 00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Вознюк М. Я.			РЕФЕРАТ	Стадія	Аркуш	Аркушів
Конс.						Д	5	85
						КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		
Керівн.		Дуган О. М.						
Затв.								

ABSTRACT

The diploma project is presented in a printed text of 85 pages, which includes 6 figures, 4 tables, 3 drawings and 43 references.

The aim of this work is to develop a technology for the production of mosaic recombinant hepatitis C virus antigen using biosynthesis technology.

It is proposed to use *Escherichia coli* strain *XL1-Blue* as a producer, which is characterised by a low probability of spontaneous induction, which significantly optimises the biosynthesis process. The morphological, cultural, physiological and biochemical characteristics of the selected microorganism-producer were analysed, and its probiotic properties were studied.

The appropriate equipment for cultivation of *E.coli XL1-Blue* bacteria was calculated and selected. The technological, structural and thermal calculations made it possible to optimise the production fermenter. The technological and equipment schemes for the efficient production of selected products are substantiated and presented in the work.

This paper presents a technology that meets environmental and health and safety standards. Necessary health and safety measures have been taken to ensure the safety and health of employees.

KEYWORDS: HEPATITIS C, RECOMBINANT NS3 PROTEIN, PROTEIN PRODUCTION, BIOSYNTHESIS, ESCHERICHIA COLI, INDUCTION, PRODUCTION CULTIVATION.

					ДП БТ-9106. 00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	ABSTRACT	Стадія	Аркуш	Аркушів
Розроб.		Вознюк М. Я.				Д	6	85
Конс.								
Керівн.		Дуган О. М.				КПІ ім. Ізгоря Сікорського ФБТ		
Затв.								

ЗМІСТ

ВСТУП	9
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	11
1.1. Основні промислові продуценти.....	11
1.2. Класифікація продуцента.....	15
1.3. Морфолого-цитологічні ознаки.....	15
1.4. Культуральні ознаки.....	16
1.5. Фізіолого-біохімічні ознаки.....	18
1.6. Серологічні ознаки	21
1.7. Поширення в природі та стійкість до зовнішніх факторів.....	21
РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА	23
2.1. Характеристика цільового продукту	23
2.2. Схема хімічних перетворень	24
2.3. Характеристика компонентного складу біотехнологічного препарату, отриманого в процесі реалізації технології.....	28
2.4. Методи очистки цільового продукту	31
2.5. Механізми впливу цільового продукту на біохімічні процеси	36
РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ	32
3.1. Генетична вивченість біологічного об'єкту.....	37
3.2. Загальні методи створення високопродуктивного промислового продуценту (відповідно до типових технологій).....	38
3.2.1. Використання природного та штучного добору для отримання промислових продуцентів	38
3.2.2. Використання індукованого мутагенезу	39
3.2.3. Регуляція метаболізму у мікробній клітині	40
3.2.4. Використання методів генної та клітинної інженерії	40

					ДП БТ-9106. 00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	ЗМІСТ	Стадія	Аркуш	Аркушів
Розроб.		Вознюк М. Я.				Д	7	85
Конс.								
Керівн.		Дуган О. М.				КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		
Затв.								

3.3. Схема отримання продуцента, що використовується в роботі	40
3.4. Особливості технології або апаратурного оформлення у зв'язку з використанням обраного продуцента	42
РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА	43
4.1. Характеристика кінцевої продукції виробництва	43
4.2. Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовуються у виробництві	44
4.3. Опис технологічного процесу	46
4.4. Матеріальний баланс	58
4.5. Контроль виробництва	61
4.6. Технологічна схема виробництва.....	64
РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ	65
5.1. Обґрунтування вибраної конструкції. Підбір конструкційних матеріалів для окремих елементів апарату	65
5.2. Технологічний, конструктивний, гідравлічний розрахунки	68
5.3. Вибір загальнозаводського обладнання	75
5.4. Вимоги до охорони праці та навколишнього середовища	77
ВИСНОВКИ	80
ДЖЕРЕЛА.....	81

					ДП БТ-9106. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		8

ВСТУП

Гепатит С є соціально значущою глобальною інфекцією, що чинить вплив на мільйони людей по всьому світу. Це одне з найпоширеніших вірусних захворювань, що веде до цирозу печінки та печінкової недостатності. Розробка ефективних методів діагностики та лікування гепатиту С є актуальною темою сучасної медицини.

Вже відомі методи діагностики та лікування мають певні обмеження та недоліки, що стоять на заваді у вирішенні цієї проблеми. Наприклад, висока вартість та складність виробництва антигенів, що застосовуються при розробці вакцин проти такого інфекційного захворювання. Традиційні методи одержання антигенів потребують складних процедур очищення і досить часто не відповідають вимогам якості продукту [1].

Останні роки свідчать про значний прогрес у галузі біотехнологій, що відкриває нові можливості для розробки більш ефективних методів виробництва антигенів гепатиту С. Однією з можливих технологій виробництва антигенів гепатиту С є біосинтез, що забезпечує виробництво рекомбінантних білків за допомогою живих організмів (бактерії, дріжджі).

Використання цього методу для виробництва мозаїчного рекомбінантного антигену вірусу гепатиту С є перспективним напрямком досліджень. Ця технологія дозволяє поєднувати різні епітопи антигену в одному білку, створюючи мозаїчну структуру, що посилює імунну відповідь. Це водночас сприяє підвищенню ефективності діагностики та лікування захворювання [2].

Метою даного дипломного проєкту є розробка технології виробництва мозаїчного рекомбінантного антигену вірусу гепатиту С з використанням біосинтезу.

Високий рівень смертності, а також великі витрати на лікування зробили

					ДП БТ-9106. 00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	ВСТУП	Стадія	Аркуш	Аркушів
Розроб.		Вознюк М. Я.				Д	9	85
Конс.						КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		
Керівн.		Дуган О. М.						
Затв.								

розробку ефективних вакцин та діагностичних засобів важливими пріоритетами. Розробка технології виробництва мозаїчного рекомбінантного антигену вірусу гепатиту С виступає як перспективний підхід для поліпшення діагностики та вакцинації проти HCV.

Для розв'язання проблемного аспекту складної структури та генетичної варіабельності HCV, передбачається використання стратегії мозаїчного антигену. Цей підхід передбачає синтез антигену, який складається з ключових епітопів з різних варіантів вірусу гепатиту С, що максимально відображає генетичний спектр цього вірусу. Такий мозаїчний антиген забезпечує широкий охоплення імунітету та здатність розпізнавання різних штамів HCV, підвищуючи ефективність діагностики та вакцинації.

					ДП БТ-9106. 00.000 ПЗ	Арк.
						10
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

1.1. Основні промислові продуценти

З метою отримання цільового продукту в біотехнології використовують як еукаріотів, так і прокаріотів. Найбільш розповсюдженими у використанні, для отримання рекомбінантних мозаїчних білків, є бактерії *Escherichia coli* та одноклітинні дріжджі *Saccharomyces cerevisiae*.

Бактерія *E. coli* являється одним із найкраще вивчених організмів. Часто використовується в біологічних дослідженнях завдяки своїй здатності до швидкого росту та розмноження на бідних на поживні компоненти середовищах.

Дріжджі *S. cerevisiae* також є цікавим біологічним об’єктом. З огляду на стандартну клітинну структуру цих організмів, вони є доволі зручною моделлю для досліджень. Короткий життєвий цикл сприяє швидкому та ефективному проведенню досліджень [3].

Таблиця 1.1. Порівняння систем експресії [4,5]

Продуцент	Переваги	Недоліки
I	II	III
<i>Escherichia coli</i>	- швидкі темпи росту; - велика продуктивність; - швидке розмноження; - значний рівень вияву білків;	- кодони, що можуть бути альтернативними для еукаріотичних; - обмежений успіх у створенні дисульфідних зв’язків;

					ДП БТ-9106. 00.000 ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА		
Розроб.		Вознюк М. Я.					
Конс.							
Керівн.		Дуган О. М.					
Затв.							
					Стадія	Аркуш	Аркушів
					Д	11	85
					КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		

	● зручність у застосуванні та проведенні лабораторних досліджень; ● низька вартість; ● більш передбачувана; ● розмаїтість технологій для модифікації та контролю клітини; невимогливість до умов культивування;	● можливість виникнення проблем з синтезом білків у цитоплазмі; ● слабка посттрансляційна модифікація; неефективний рефолдинг в in vitro умовах;
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	● високий рівень білкового укладання; ● ефективне виділення білка, що спрощує процес очищення; ● можливість вибору між експресією у клітині та експресією за межами клітини; ● економічна вигідність; ● можливість контролю; ● здатність здійснювати більшість	● прояв підвищеної схильності до глікозилювання білків; ● відмінність у механізмах глікозилювання (в порівнянні з клітинами вищих еукаріотів); ● більшість N-гліканових структур мають потенційну алергенність; ● менша кількість проведених

	еукаріотичних посттрансляційних модифікацій.	досліджень у порівнянні з <i>E. coli</i> ; ● молекулярно- генетична база менш розгорнута порівняно з <i>E. coli</i> ; ● прогнозовано нижчий рівень секреції порівняно з <i>Pichia pastoris</i> .
<i>Pichia pastoris</i>	● економічна вигідність; ● високий рівень білкового укладання; ● високі обсяги синтезу; ● можливість здійснення більшості посттрансляційних модифікацій, характерних для еукаріотичних систем; ● можливість вибору між експресією у клітині та експресією за межами клітини; ● невимогливість до умов культивування.	● відмінність у механізмах глікозилювання в порівнянні з клітинами вищих організмів; ● використання рідини зі швидким займанням у ролі індуктора.

<i>Baculovirus</i>	● високий рівень виходу продукту; ● відсутні внутрішні конкуренти; ● відсутність внутрішніх конкурентів.	● значні витрати; ● вимогливість до оптимізації; ● обмежена потужність виробництва; ● можливість виникнення контамінації; ● обмежена можливість синтезу складних білків; ● тривалий час виробництва;
--------------------	--	---

Передбачення впливу експресивної системи на вихід білка є складною задачею. На даний момент не існує універсальної системи експресії, яка була б ефективною для всіх типів білків. Тому при виборі конкретної системи експресії важливо аналізувати переваги й недоліки цієї системи, враховувати особливості цільового білка і, якщо можливо, порівнювати кілька доступних варіантів систем експресії. Такий підхід дозволяє збільшити шанси на успішне виробництво білка з високою якістю і виходом.

Порівнявши переваги і недоліки декількох перспективних систем експресії, ми можемо знайти найбільш оптимальну варіант.

NS3 білок є важливим білком вірусу гепатиту С і відіграє роль у розмноженні і поширенні вірусу. Тому для отримання цільового продукту, можна успішно використовувати прокаріотичні організми, зокрема *E. coli*. Незважаючи на наявні недоліки та враховуючи численні переваги, що були описані раніше, у даній роботі було запропоновано використання *E. coli* як продуцента цільового продукту.

					ДП БТ-9106. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		14

1.2. Класифікація продуцента

Згідно з визначником Берджі *E. coli* відносять до п'ятої групи (факультативно анаеробні грамнегативні палички), підгрупи 1 (сімейство *Enterobacteriaceae*), рід *Escherichia*, вид *Escherichia coli*.

Домен – *Bacteria* (Бактерії)

Відділ – *Proteobacteria* (протеобактерії)

Клас – *Gamma Proteobacteria* (Гамма-протеобактерії)

Ряд – *Enterobacteriales*

Родина – *Enterobacteriaceae*

Рід – *Escherichia*

Вид – *Escherichia coli* (Кишкова паличка).

Escherichia coli - це широко поширений та досліджений вид бактерій, які існують у кишечнику людей та тварин. Ці бактерії є дуже значимими, оскільки використовуються як модельний організм у біологічних дослідженнях та в багатьох біотехнологічних застосуваннях: синтез білків, виробництво фармацевтичних речовин, біопалив та біосенсорів.

Бактерії роду *Escherichia* – це поодинокі або попарні прямі палички розміром 1,15 x 2,0-6,0 мкм. Є факультативними анаеробами. Аспорогенні. Серед них відомі як сапрофітні, так і патогенні форми. Здійснення руху відбувається за рахунок перетрихіальних джгутиків. Таке є зовсім нерухомі представники. Бактерії: грамнегативні; оксидазонегативні; каталазопозитивні; негативні за ознаками утворення H_2S_2 , активності ліпази та гідролізу сечовини. Оптимальна температура для здійснення процесів життєдіяльності становить 37°C. Значна кількість штамів характеризується наявністю капсул або мікрокапсул [5].

1.3. Морфолого-цитологічні ознаки

В даному проєкті для отримання цільового продукту використовується *E. coli*, що має мутацію в гені *lacIq* і пригнічує експресію лактозного операціонального гена (*lacO*) на плазміді, таким чином забезпечує ефективну

					ДП БТ-9106. 00.000 ПЗ	Арк.
						15
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

експресію цільового білка.

E. coli (рис. 1.1): грамнегативні, паличкоподібні бактерії розміром $0,4 - 0,8 \times 1 - 3$ мкм та мають заокруглені кінці. Об'єм клітини становить приблизно $0,6-0,7$ мкм³. Переміщення здійснюється за допомогою джгутиків, які розташовані перитрихально. Джгутики - вигнуті, тонкі, жорсткі структури діаметром 10-20 нм.

Дані бактерії за типом дихання є факультативними анаеробами, через це не утворюють спори. Можуть розвиватись в діапазоні температур 10-45°C, але оптимальна температура - 37°C. Оптимальний показник рН 7,2-7,5. Не потребують додаткових факторів росту [6].



Рисунок 1.1. Кластер бактерій *E. coli*. Кратність збільшення $\times 10\,000$ [6]

1.4. Культуральні ознаки

Бактерії *E. coli* добре ростуть і здатні до поділу на простих живильних середовищах: м'ясопептонному бульйоні (МПБ), м'ясопептонному агарі (МПА). Для організму може бути достатнім фактором наявність лише глюкози у середовищі. У свою чергу глюкоза метаболічним шляхом може трансформуватись на потрібні макромолекулярні складові для дикого типу і бути джерелом росту. Задля збільшення виходу цільового продукту та

					ДП БТ-9106. 00.000 ПЗ	Арк.
						16
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

зменшення часу поділу варто дотримуватись оптимальних умов культивування та збагатити живильне середовище [5].

На МПБ можна спостерігати за утворенням пристінкового кільця та рясним зростанням при значному помутнінні середовища; осад утворюється незначний, сірого відтінку і здатний легко розбиватись; відсутність плівки на поверхні бульйону.

На середовищі МПА можна спостерігати за утворенням прозорих округлих колоній з характерним сірувато-блакитним відливом, мають блискучу поверхню та рівний край. Приблизний розмір колоній становить 2-3 мм в діаметрі.

На Ендо середовищі (рис. 1.2) колонії набувають рожевого, червоного або синьо-чорного забарвлення. Спостерігається збільшення розмірів клітин і зміна форми, зокрема формування витягнутих або згорнутих клітин.



Рисунок 1.2. Колонії *E. coli* на середовищі Ендо [7]

На середовищі Плоскірева колонії зазвичай мають блакитний колір. Характеризуються округлою формою з рівними краями та гладкою поверхнею. Приблизний розмір колоній становить 1-2 мм в діаметрі.

На середовищі Левіна (ЕМС) формуються колонії білого чи кремового забарвлення, круглої або овальної форми [8].

1.5. Фізіолого-біохімічні ознаки

E. coli – це мікроорганізм, який не вимагає особливих умов для росту. Основне джерело вуглецю - глюкоза. Метаболічна система *E. coli* використовує три шляхи розкладу глюкози: шлях Ембдена-Мєєргофа-Парнаса, цитратний цикл і фосфоглюконатний шлях. Оскільки *E. coli* є факультативним анаеробом, вона може отримувати АТФ з пірувату, утвореного в результаті гліколізу, шляхом ферментації. Збагачення поживного середовища та дотримання оптимальних умов культивування дозволяють скоротити час поділу *E. coli* і збільшити вихід цільового білка.

Цей мікроорганізм є гетеротрофом за типом живлення. Він є факультативним анаеробом, що означає, що він може рости як в анаеробних, так і в аеробних умовах. Початково, коли він посівається на вуглеводне середовище, він розвивається як анаеробний організм, використовуючи бродіння для отримання енергії. Однак з плином часу, коли продукти бродіння вичерпуються, він починає використовувати кисень для окислення, і розвивається як аеробний організм. При промисловому культивуванні, зазвичай забезпечують достатню концентрацію розчинного кисню в середовищі, щоб культура могла отримувати енергію шляхом аеробного дихання, оскільки це сприяє вищому виходу цільового продукту [6].

Селективні поживні середовища сприяють переважному розвитку конкретного організму і зазвичай використовуються на початкових етапах отримання чистої культури. Аналізуючи склад таких селективних середовищ, як середовище Левіна та середовище Кесслера, можна визначити, які компоненти пригнічують ріст інших мікроорганізмів та сприяють росту *E. coli*. У даному випадку, такими компонентами є лактоза і жовчні кислоти. Можна припустити, що для *E. coli* елективним середовищем буде бідне поживне середовище, до якого додають лактозу і жовчні кислоти. Також, як елективні середовища для нашого трансформованого штаму, можна використовувати промислові середовища з додаванням відповідного антибіотика.

Клітини *E. coli* можуть процвітати в простих поживних середовищах, які

					ДП БТ-9106. 00.000 ПЗ	Арк.
						18
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

містять основні компоненти, такі як джерело вуглецю (зазвичай глюкоза або гліцерин), іони NH_4^+ , HPO_4^{2-} , SO_4^{2-} , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Cl^- , а також необхідні мікроелементи. Додатково, для збільшення швидкості поділу клітин і підвищення виходу цільового продукту, може бути необхідно додати джерело азоту, вітаміни та інші компоненти. У промисловому культивуванні поширеним середовищем є LB (середовище Luna-Bertam), яке складається з 0,5% дріжджового екстракту, 1,5% триптонну та 0,5% NaCl; середовище №3, яке містить 2,4% дріжджового екстракту, 1,2% триптонну, 0,5% глюкози та 0,0195% MgSO_4 ; а також середовище TB, що складається з 10% дріжджового екстракту, 10% пептонну, 0,94% K_2HPO_4 , 0,22% KH_2PO_4 та 0,8% гліцерину [6].

Клітина *E. coli* є типовим прокаріотичним мікроорганізмом і містить 10-30% сухої речовини, що складається з білків, ліпідів, нуклеїнових кислот, полісахаридів та інших компонентів.

Клітинна стінка *E. coli*, як і у багатьох грамнегативних бактерій, має багат шарову структуру з товщиною 14-17 нм. Внутрішній шар стінки, який складає 1-10% сухої маси, складається з пептидоглікану. У *E. coli* цей шар є дуже тонким і може бути лише одношаровим. Полісахаридний остов стінки складається з залишків N-ацетилглюкозаміну і N-ацетилмурамової кислоти, зв'язаних між собою глікозидними зв'язками β -1,4. До N-ацетилмурамової кислоти приєднаний короткий пептидний ланцюжок, який складається з послідовних залишків молочної кислоти, L-аланіну, D-глутамінової кислоти, мезо-діамінопімелінової кислоти і D-аланіну.

Зовнішній шар клітинної стінки *E. coli* включає фосфоліпіди, ліпопротеїни і ліпосахарид. Особливим компонентом зовнішньої мембрани є ліпосахарид, який складається з ліпиду А, галузистого цукрового ланцюга та О-антигену. В *E. coli* пептидоглікан відноситься до типу А. Ліпопротеїн складається з 58 амінокислотних залишків, серед яких 15 амінокислот повторюються з різною частотою. У ньому відсутні пролін, гліцин, гістидин, триптофан і фенілаланін. Структура ліпопротеїну включає блоки, а на кінці знаходиться гліцерил-цистеїн, який зв'язаний з жирними кислотами [7].

					ДП БТ-9106. 00.000 ПЗ	Арк.
						19
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

E. coli розмножується шляхом бінарного поділу, що є формою нестатевого розмноження. Під час поділу виникає викривлення цитоплазматичної мембрани і клітинної стінки, яке поступово збільшується. Зростання мембран і клітинної стінки відбувається в області полюсів. Час поділу при сприятливих умовах складає 20-25 хвилин.

E. coli є чутливим до антибіотиків організмом, але він також здатний набувати резистентність. Ця особливість широко використовується в біотехнології та генній інженерії. Набуття стійкості може бути результатом зміни генетичної інформації або зміни рівня експресії деяких генів.

Можна виділити шість основних біохімічних механізмів, які сприяють формуванню лікарської стійкості в бактеріальних клітинах:

1. Зміна проникності клітинної стінки, що призводить до зниження проникнення препарату.

2. Ферментативна інактивація препарату, коли бактерії виробляють ферменти, які руйнують або змінюють структуру препарату, що нейтралізує його дію.

3. Інактивація препарату, який активує антибіотик, наприклад, бактерії можуть виробляти фактори, які перешкоджають активації препарату в клітині.

4. Модифікація мішені препарату, коли бактерії змінюють структуру мішеневого білка, що знижує його здатність зв'язуватись з препаратом.

5. Підвищена експресія білка-мішені, який взаємодіє з лікарським препаратом, що дозволяє бактеріям збільшити вироблення цього білка і, відповідно, зробити препарат менш ефективним.

6. Підсилене виведення препарату з бактеріальної клітини, коли бактерії здатні активно виводити препарат з клітини, уникнувши його накопичення та дії [9].

Ці механізми є широко розповсюдженими в бактеріальній резистентності і можуть бути використані різними видами бактерій, включаючи *E. coli*.

					ДП БТ-9106. 00.000 ПЗ	Арк.
						20
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

1.6. Серологічні ознаки

Escherichia coli володіє кількома серологічними ознаками, що можуть бути використані для здійснення ідентифікації та класифікації. Перш за все, *E. coli* характеризується складною антигенною структурою, що включає різні компоненти, що можуть викликати імунну відповідь.

Відомо, що близько 171 серогруп визначаються О-антигеном. О-антигени розміщені на зовнішній поверхні бактерій і являють собою полісахаридні ланцюжки. Вони є основною складовою ліпосахаридів в зовнішній мембрані. Ліпідний компонент відповідальний за токсичні ефекти, білковий - імуногенні властивості, полісахаридний – серологічні.

Н-антигени представлені білковими структурами та є головними компонентами рухливих структур, джгутиків. Джгутики утворені протеїнами-флагелінами, що оточені полісахаридами ланцюгами Н-антигену. Загалом, відомо 50 різних типів Н-антигенів [7,9].

К-антигени представлені капсульними мукополісахаридами, що покривають поверхню *E. coli*. Характеризуються наявністю водорозчинних полісахаридів, що накладаються на зовнішню мембрану бактерій і таким чином формують захисну капсулу. Забезпечують імунну відповідь та захист від фагоцитозу. Капсула з К-антигенами відповідає за властивість бактерій утворювати плівку для подальшого можливого прикріплення до поверхні та формування колоній. Розрізняють три групи К-антигенів за чутливістю до температурних показників: А-група – термостабільна, В- та L- групи – термолабільні. К-антигени здатні до маскування О-антигенів.

1.7. Поширення в природі та стійкість до зовнішніх факторів

Escherichia coli – це широко розповсюджений мікроорганізмом в природі і займає різні екологічні ніші. Цей організм може бути присутнім у різних середовищах: кишковий тракт людей та тварин, ґрунт, водойми та рослини.

У кишковому тракті цей мікроорганізм відповідає за підтримання

					ДП БТ-9106. 00.000 ПЗ	Арк.
						21
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

нормального травлення, синтез вітамінів та захист від інфекційних агентів. Відіграють важливу роль у продукуванні низькомолекулярних пептидів, вітамінів. Проте, деякі штами *E. coli* можуть бути патогенними і спричиняти захворювання такі як діарея, сепсис, сечова інфекція тощо, у людей та тварин. Залежно від патогенності, розрізняють умовно-патогенні і патогенні.

Патогенні *E. coli* поділяють на групи:

1. Ентеропатогенні, ЕТКП – викликають діарею у немовлят;
2. Ентеротоксичні, ЕТЕК – продукують токсини, що спричиняють діарею;
3. Ентероінвазивні, ЕІКП – збудники дизентерієподібних захворювань;
4. Ентерогеморагічні, ЕПКП – можуть спричиняти ураження кишечника та пошкодження судин;
5. Ентероагративні, ЕАКП – вражають епітелій дією токсинів [10].

У природних середовищах (грунт і вода) *E. coli* може існувати як вільно існуючий мікроорганізм. Він може бути присутнім у великих кількостях, особливо в умовах забруднення фекальними стоками. Це може стати причиною контамінації водних джерел і продуктів харчування, що може призвести до виникнення захворювань, які передаються шляхом фекально-орального шляху.

У взаємодії з іншими організмами, *E. coli* може виступати як симбіонт або патоген. Наприклад, вони можуть утворювати симбіотичні відносини зі здоровою мікрофлорою кишечника, сприяючи збалансованому функціонуванню екосистеми кишечника [10].

					ДП БТ-9106. 00.000 ПЗ	Арк.
						22
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА

2.1 Характеристика цільового продукту

Кінцевим продуктом є білок NS3. NS3 білок вірусу гепатиту С (HCV) присутній у вірусній частинці у вигляді поліпротеїну. Розташовується всередині вірусної частинки гепатиту С та утворює складну структуру разом з іншими компонентами вірусу.

NS3 білок є цінним інструментом для виробництва антитіл і тест-систем, що відіграє важливу роль у діагностиці та визначенні імунної відповіді організму на інфекцію гепатитом С.

Зрілий білок NS3 складається з 5 доменів: N-кінцеві 2 домени утворюють серинову протеазу разом із кофактором NS4A, а С-кінцеві 3 домени утворюють геліказу. Геліказну частину NS3 можна відокремити від протеазної частини шляхом розщеплення лінкера. Оскільки частина протеази є більш гідрофобною, її видалення дозволяє фрагменту гелікази NS3 експресуватися як більш розчинний білок на вищих рівнях у *E. coli*. Фрагмент NS3, який має геліказну активність («HCV геліказ»), як було показано більше десяти років тому, гідролізує АТФ, щоб підживити реакцію, яка розкручує дуплексну РНК. Протеазна активність забезпечує розщеплення протеїнів-прекурсорів вірусу HCV. Розщеплені протеїни-прекурсори включають NS2-3, NS3-4A, NS4A-4B, NS4B-5A та NS5A-5B, що сприяє формуванню функціональних білків, необхідних для реплікації вірусу.

Крім того, протеїн взаємодіє з іншими білками вірусу HCV, такими як NS4A, що забезпечує оптимальну активність NS3 білка та сприяє його правильній локалізації та функціонуванню під час вірусного циклу. Загалом, NS3 білок має складну тривимірну структуру, яка може бути представлена у вигляді спіралей чи згортань [11].

					ДП БТ-9106. 00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА	Стадія	Аркуш	Аркушів
Розроб.		Вознюк М. Я.				Д	23	85
Конс.						КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		
Керівн.		Дуган О. М.						
Затв.								

2.2 Схема хімічних перетворень

Протеаза NS3 є сериною протеазою, яка належить до надродини протеаз трипсину/хімотрипсину. Фермент складається з двох β -бочкових доменів, які фланкуються двома короткими α -спіралями. Один з β -ланцюгів N-кінцевого β -бочонка походить від центральної гідрофобної ділянки NS4A. Структура стабілізована іоном Zn^{2+} , який координується трьома залишками цистеїну та однією молекулою води. Зв'язування Zn^{2+} необхідне для виконання функції (30). Субстрат-зв'язуюча кишеня може вмістити шість амінокислотних залишків (P4-P2').

Однак ефективність розщеплення є найкращою, коли субстрат містить 10 амінокислотних залишків (P6-P4'), що свідчить про те, що відбувається взаємодія субстрату з поверхнею NS3. Для протеазної активності необхідна каталітична тріада (Ser-139, His-57 та Asp-81) та оксианіонна дірка (аміди Gly-137 та Ser-139). Кофактор NS4A сприяє правильному розташуванню каталітичної тріади та субстрату, що пояснює його роль у каталітичній ефективності та субстратній специфічності [12].

Подібно до інших вірусних протеаз, субстрати протеази NS3 визначаються кількома амінокислотними залишками, а не лише тими, що знаходяться у ножичному зв'язку (P1-P1'). Консенсусний сайт розщеплення має цистеїн і серин у ножичному зв'язку. Дослідження *in vitro* з пептидами показали, що розщеплення на з'єднанні NS5A/NS5B принаймні на порядок ефективніше, ніж на інших ділянках, включаючи з'єднання NS4B/NS5A, яке також має цистеїн і серин у зшивці. Це спостереження узгоджується з існуванням декількох детермінант розпізнавання субстрату. У всіх дослідженнях, які оцінювали субстратну специфічність протеази NS3 кількісно, для визначення цієї специфічності використовували стаціонарну кінетику і такі параметри, як k_{cat} , K_m і k_{cat}/K_m . Загальне припущення для серинових протеаз полягає в тому, що k_{cat} свідчить про утворення ацильного проміжного продукту ферменту з амідів, тобто вивільнення обох пептидів продукту відбувається швидше, ніж утворення цього проміжного продукту

					ДП БТ-9106. 00.000 ПЗ	Арк.
						24
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

[13].

Варто зазначити, що деякі продуктові пептиди Pn-P1 проявляють значну інгібіторну активність, яка може бути збільшена шляхом заміни амінокислот. Тому не виключено, що спорідненість протеази NS3 до N-кінцевого пептиду продукту може змінювати швидкість лімітуючої сходинки в стаціонарному стані. Подібні зміни в стаціонарній кінетиці є суттєвими протипоказаннями для використання лише стаціонарної кінетики для розуміння субстратної специфічності протеази NS3 ВГС. Додавання попереднього стаціонарного кінетичного аналізу до вивчення субстратної специфічності NS3 може бути виправданим, але про це ніколи не повідомлялося.

Каталітичний механізм каталізованого протеазою NS3 розщеплення пептидних зв'язків, ймовірно, ідентичний тому, що спостерігається для інших серинових протеаз на основі збереження каталітичної тріади. Передбачається, що His-57 слугує загальною основою для активації нуклеофілу Ser-139. Значення рКа для His-57 підвищується до рівня, необхідного для депротонування Ser-139 за рахунок водневого зв'язку з Asp-181, який, ймовірно, також має підвищене значення рКа. Після зв'язування субстрату нуклеофільна атака карбонільного карбону ножичного зв'язку Ser-139 призводить до утворення тетраедричного інтермедіата, що містить оксианіон, який стабілізується оксианіонною діркою ферменту. Колапс тетраедричного проміжного продукту призводить до утворення ацил-проміжного продукту ферменту та N-кінцевого пептиду продукту. Дисоціація цього пептиду продукту дозволяє зв'язувати воду, гідролізувати ацил-ферментний проміжний продукт і утворювати C-кінцевий пептид продукту. Дисоціація цього продукту перезапускає систему для наступного раунду каталізу [14].

Патоген-асоційовані молекулярні патерни (ПАМП), такі як патоген-специфічні нуклеїнові кислоти, білки, вуглеводи та ліпіди, розпізнаються рецепторами розпізнавання патогенів (RRP). Толл-подібні рецептори (TIR) - це RRP, які розташовані на поверхні клітини і розпізнають позаклітинні ПАМП, хоча деякі TIR здатні виявляти і внутрішньоклітинні ПАМП. Більшість

					ДП БТ-9106. 00.000 ПЗ	Арк.
						25
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

внутрішньоклітинних ПАМП виявляються рецепторами, подібними до рецепторів, що індукуються геном І ретиноєвої кислоти (РК-І), включаючи РК-І і АДМ5 (антиген диференціювання меланоми 5). Після активації РРРП активують вроджену імунну відповідь, індукуючи експресію інтерферону (ІЕІ)- β . Вивільнення ІЕІ - β викликає ауто- та паракринну відповідь, яка включає активацію ІЕІ -стимульованих генів, продукти яких є ефекторами вродженої імунної відповіді [15].

У випадку ВГС-інфекції вірусна РНК розпізнається за допомогою двох механізмів. Перший вимагає TLR3, який може виявляти вірусну РНК під час проникнення та зняття оболонки з віріона. Другий – за участю РК-І, який, як вважають, виявляє цитозольну РНК ВГС та проміжні продукти її реплікації. PRRs розпізнають різноманітні особливості, пов'язані з РНК ВГС, наприклад, 5'-трифосфат, дволанцюгову РНК, пов'язану з NTR, і, можливо, навіть одноланцюгові ділянки, такі як поліпіримідиновий тракт. Активація TLR3 або РК-І призводить до активації (фосфорилювання та димеризації) ІФР3 (інтерфероновий регуляторний фактор 3). Активований ІФР3 транслокується в ядро і трансактивує промотор ІЕІ - β . Сигнальний шлях від ПАМП-активованого TLR3 до активованого ІФР3 вимагає TRIF (Toll/інтерлейкін-1 receptor resistance domain-containing adaptor-inducing ІЕІ protein). Сигнальний шлях від ПАМП-активованого РК-І до активованого ІФР3 вимагає МПСБ (мітохондріальний противірусний сигнальний білок). МПСБ також відомий як білок-стимулятор ІФН- β 1, вірус-індукований сигнальний адаптер [16].

Інфекція ВГС здатна блокувати активацію ІФР3 у відповідь на залучення ПАМА за допомогою TLR3 і РК-І. Цей антагонізм вродженої імунної відповіді опосередковується активністю протеази NS3. І TRIF, і МПСБ є субстратами для протеази NS3. Як показано на рис. 2а, обидва білки розщеплюються після залишку цистеїну, як це спостерігається для більшості субстратів протеази NS3. Подібність також очевидна за межами положення Р1 [14].

Інгібування, резистентність до інгібіторів та гіпотеза оболонки субстрату
Значний досвід фармацевтичної промисловості у розробці клінічно корисних

					ДП БТ-9106. 00.000 ПЗ	Арк.
						26
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

інгібіторів протеази вірусу імунодефіциту людини (ВІЛ ПР) призвів до розробки противірусних програм, спрямованих на активність протеази NS3, дуже рано. Ці ранні інвестиції наповнили конвеєр численними сполуками, які знаходяться на різних стадіях клінічної розробки. Хоча протеаза NS3 і РНК ВІЛ виконують схожі функції у життєвому циклі вірусу (процесинг поліпротеїнів), протеаза NS3 також антагонізує активацію вродженої імунної відповіді. Тому пригнічення активності протеази NS3 не тільки знизить ефективність вірусної реплікації, але й відновить, принаймні частково, вроджену імунну відповідь в клітинах, інфікованих ВГС [16].

Більшість інгібіторів протеази NS3 є конкурентними по відношенню до субстрату і, таким чином, націлені на сайт зв'язування субстрату. Найперші інгібітори були засновані на пептидах продукту. Спроби видалити реакційноздатні групи та створити молекули з покращеними фармакологічними властивостями призвели до розробки макроциклічних сполук, і саме цей клас сполук використовувався в перших клінічних дослідженнях, що підтверджували концепцію. Хоча ці початкові макроциклічні сполуки так і не були схвалені, нові макроциклічні сполуки в даний час проходять клінічні випробування.

Другий клас сполук, які є перспективними в клінічних випробуваннях – це лінійні пептидоподібні молекули, які вводять електрофільну α -кетамідну групу в ножицеподібний зв'язок, з якою може реагувати каталітичний серин, утворюючи ковалентний зв'язок, який є оборотним [14, 16].

Основною складністю для розробки терапевтичних засобів, спрямованих на активність, кодовану РНК-вірусами, є розвиток стійких до ліків мутантів. Враховуючи високу частоту мутацій і великий розмір популяцій РНК-вірусу, практично кожна окрема нелетальна заміна амінокислоти буде присутня на початку медикаментозної терапії. Потім будуть швидко відібрані мутанти, здатні до реплікації в присутності препарату. Як і очікувалося, цей сценарій реалізувався для інгібіторів активності протеази NS3. Було показано, що численні позиції протеази NS3 сприяють резистентності в культурі клітин і в

					ДП БТ-9106. 00.000 ПЗ	Арк.
						27
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

клініці. Багато з позицій надають стійкість як до макроциклічних, так і до лінійних інгібіторів. Амінокислотні залишки протеази NS3, пов'язані зі стійкістю до ліків. Крім того, що активність протеази NS3 є мішенню для протівірусної терапії, вона використовується для розробки нових аналізів для вивчення вірусної інфекції в первинних клітинних культурах, для виконання візуалізації живих клітин та аналізу окремих інфікованих клітин, і для визначення інгібіторів. Ці нові можливості пов'язують локалізацію, активність або функцію репортера з обробкою активністю протеази NS3, введеної в клітини шляхом інфекції [17].

2.3 Характеристика компонентного складу біотехнологічного препарату, отриманого в процесі реалізації технології

Основним компонентом препарату є сам рекомбінантний білок NS3, який виробляється з використанням генетично модифікованих мікроорганізмів, таких як *E. coli*. Цей білок є ключовим компонентом вірусу гепатиту С і відіграє важливу роль у його реплікації та інфекційному процесі.

При виготовленні біотехнологічного препарату можуть використовуватись додаткові компоненти для поліпшення стабільності, розчинності або активності NS3 білку. Це можуть бути стабілізатори, буферні розчини, розчинники, антиоксиданти та інші речовини, які допомагають зберегти та зберігати активність білку.

Препарат може містити незначні кількості забруднень, які виникають в процесі виробництва, такі як рештки реагентів, розчинників або інших білків, які можуть бути присутніми в початковій культурі або у процесі очищення [17].

Виробництво рекомбінантного NS3 білку може включати використання різних плазмід або векторів для введення гена NS3 в геном *E. coli*. Вони містять необхідні промотори, регулятори та інші елементи для ефективного виразу гена NS3 та його продукції в мікроорганізмі.

Зокрема, експресійні вектори, що містять промотори та інші регуляторні елементи і дозволяють розпочати процес синтезу рекомбінантного білку та

					ДП БТ-9106. 00.000 ПЗ	Арк.
						28
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

забезпечують його вираз на високому рівні.

Виразові плазмідні, що можуть містити оптимізовані промотори, оптимальні регуляторні елементи та оптимізовані послідовності для забезпечення високої продуктивності [18].

У деяких випадках можуть використовуватися вектори для секреції, що дозволяють вивільнення рекомбінантного білку NS3 з клітини *E. coli* у зовнішнє середовище. Це спрощує процес очищення та отримання чистого продукту.

Деякі вектори можуть містити сигнальні послідовності, які дозволяють перенесення рекомбінантного білку NS3 до певних клітинних компартментів, наприклад, периплазматичного простору або позаклітинного середовища. Це може полегшити процес очищення та отримання чистого білкового продукту.

Вектори можуть містити маркери селекції, які дозволяють відрізнити трансформовані клітини, що містять ген NS3, від немодифікованих клітин. Це може бути, наприклад, резистентність до антибіотиків, що дозволяє відбирати тільки трансформовані клітини під час вибіркової культивування.

Під час виробництва рекомбінантного білку NS3 вірусу гепатиту С з використанням продуцента *E. coli* використовуються розчини та буфери, які є необхідними для виконання різних кроків технологічного процесу. Для розбивання клітин *E. coli* та отримання внутрішньоклітинного матеріалу, використовуються розчини, які містять буфери для лізису. Ці буфери можуть включати різні компоненти, такі як трис-гідроксиметиламінометан (Tris), етаноламін (TEA), гліцерол, лізоцим тощо. Вони допомагають розчинити клітинні мембрани та отримати внутрішньоклітинний матеріал, включаючи білкові фракції. Під час процесу очищення рекомбінантного білку NS3 використовуються різні буфери для фракціонування та очищення білку. Наприклад, можуть використовуватися буфери на основі фосфатного буферу (PBS), трихлорацетатного буферу (TCA), трис-буферу тощо. Ці буфери допомагають забезпечити оптимальні умови для фракціонування білку та його очищення від забруднень. Для забезпечення стабільності та зберігання

					ДП БТ-9106. 00.000 ПЗ	Арк.
						29
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

рекомбінантного білку NS3 використовуються спеціальні буфери. Ці буфери можуть містити стабілізуючі речовини, такі як гліцерол, сорбітол або буфери з низьким рН. Вони допомагають зберегти активність та структуру білку під відповідними умовами зберігання. Крім того, в процесі виробництва можуть використовуватися буфери для розбивання клітин (буфери для лізису), які допомагають розчинити клітинні мембрани та отримати внутрішньоклітинний матеріал, що містить білкові фракції. Також застосовуються буфери для фракціонування та очищення білку, які дозволяють відокремити цільовий NS3 білок від інших компонентів. Загалом, використання відповідних розчинів та буферів дозволяє забезпечити ефективність та якість процесу виробництва рекомбінантного білку NS3 вірусу гепатиту С [16].

Для підтримки стабільності гену NS3 та відбору модифікованих клітин *E. coli*, можуть використовуватися антибіотики або селективні резистентності. Це допомагає зберігати клони, що містять ген NS3, та відокремлювати їх від немодифікованих клітин. При конструюванні плазміди або вектора для експресії гену NS3 в *E. coli* можуть бути включені гени антибіотикорезистентності. Це дозволяє використовувати антибіотики під час вибіркової культивування для відбору трансформованих клітин, які мають плазмідну з вбудованим геном NS3. Зазвичай використовуються антибіотики, такі як ампіцилін, карбеніцилін, канаміцин або хлорамфенікол.

Селективна резистентність до антибіотиків дозволяє виділити клітини, що успішно експресують рекомбінантний білок NS3, від неперетворених клітин. Таким чином, під час вибіркового росту тільки клітини, які мають плазмідну з геном NS3 та відповідну антибіотикорезистентність, виживають, тоді як інші клітини загинуть.

З метою забезпечення довготривалого зберігання та стабільності рекомбінантного NS3 білку, до препарату можуть додаватися стабілізатори та консерванти. Це допомагає підтримувати його біологічну активність та запобігати деградації. Консерванти, такі як натрій азид (NaN₃) або тіомертал (TME), можуть бути використані з метою запобігання мікробного забруднення

					ДП БТ-9106. 00.000 ПЗ	Арк.
						30
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

та збереження чистоти білкового продукту. Вони мають бактерицидну або фунгіцидну дію, що допомагає підтримувати стерильність інкубаційних середовищ та забезпечувати довготривале зберігання продукту.

Застосування стабілізаторів та консервантів у процесі виробництва допомагає зберегти якість та стабільність рекомбінантного білку NS3, забезпечуючи його ефективне функціонування та збереження протягом тривалого періоду часу [20].

2.4 Методи очистки цільового продукту

У процесі виробництва рекомбінантного білку NS3 вірусу гепатиту С використовуються різні методи очищення для отримання чистого цільового продукту.

Електрофорез є одним з важливих методів, який використовується у процесі виробництва рекомбінантного білку NS3 вірусу гепатиту С. Цей метод ґрунтується на руху заряджених частинок у електричному полі. У електрофорезі зразки, що містять білки, наносяться на гель або на електрофоретичний гелевий матрикс, і під дією електричного поля білки починають рухатись.

Електрофорез дозволяє відокремлювати білки за їхньою електричною зарядом та розміром. У методі гель-електрофорезу зразки білків наносять на гель, наприклад, поліакриламідний гель, і проходять через нього під дією електричного поля. Білки рухаються через гель залежно від їхнього заряду та розміру, забезпечуючи їхнє відокремлення. Після електрофорезу гель може бути підданий фарбуванню або імунодетекції для визначення положення та кількості білків.

Електрофорез є важливим інструментом для контролю якості та очищення рекомбінантного білку NS3. Він дозволяє визначити чистоту білкової проби, виявити наявність забруднень та визначити розмір та заряд цільового білка. Крім того, електрофорез може бути використаний для порівняльного аналізу різних зразків білків та визначення їхньої концентрації

					ДП БТ-9106. 00.000 ПЗ	Арк.
						31
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

[21].

В процесі виробництва рекомбінантного білку NS3 вірусу гепатиту С, ультрафільтрація та діаліз виконують важливі функції для очищення та концентрування білкової проби.

Ультрафільтрація використовується для розділення білків за їхньою молекулярною масою шляхом проникнення через мембрану з відомим порозривом. Зразок білка пропускається через мембрану, а молекули білків меншої маси проникають через пори мембрани, тоді як білки більшої маси залишаються задержаними. Це дозволяє відокремити та концентрувати рекомбінантний білок NS3 від інших молекул та забруднень, таких як солі, нуклеїнові кислоти або забруднюючі речовини. Ультрафільтрація може бути проведена за допомогою різних типів мембран, залежно від потреби у відокремленні та концентрації білка [18].

Діаліз використовується для видалення розчинених забруднень та інших малих молекул з білкової проби. Процес полягає в розміщенні білкової проби в контейнері, який містить мембрану з порозривом, що пропускає лише речовини певного розміру. Забруднюючі речовини, які мають меншу молекулярну масу, проникають через пори мембрани, тоді як рекомбінантний білок NS3 залишається у контейнері. Цей процес допомагає покращити якість та чистоту білкової проби перед наступними етапами обробки.

Перегонка та фракціонування за допомогою холоду є методами, які можуть бути використані в процесі очищення та розділення рекомбінантного білку NS3 вірусу гепатиту С.

Перегонка - це процес фізичного розділення речовин на основі різниці їх кипіння. За допомогою перегонки можна відокремити компоненти змішаної рідини шляхом нагрівання і наступного охолодження. В процесі перегонки, різні компоненти розміщуються в різних шарах або фракціях, залежно від їх кипіння. Це дозволяє відокремити білкову пробу від інших забруднень або небажаних компонентів.

Фракціонування за допомогою холоду використовується для розділення

					ДП БТ-9106. 00.000 ПЗ	Арк.
						32
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

речовин на основі їх розчинності при низькій температурі. За допомогою зниження температури, розчинені компоненти можуть випадати з розчину або утворювати кристали. Це дозволяє отримати окремі фракції, включаючи рекомбінантний білок NS3, шляхом видалення їх з розчину при холодних умовах [22].

Використання перегонки та фракціонування за допомогою холоду може доповнити інші методи очищення та розділення, що використовуються в процесі виробництва рекомбінантного білку NS3. Ці методи можуть бути корисними для отримання більш чистої та концентрованої проби білку шляхом видалення забруднень та небажаних компонентів.

У процесі виробництва рекомбінантного білку NS3 вірусу гепатиту С було використано хроматографію як метод виділення та очищення білку. Він є найбільш оптимальним, оскільки забезпечує високу чистоту продукту, вибірковість, виходу та контрольовані умови процесу. Крім того, він є ефективним, масштабованим, широко застосовується і дозволяє досягти стабільних та повторюваних результатів. Цей метод включає в себе ряд етапів, таких як хроматографія на іонообмінних колонках, афінна хроматографія або гель-фільтрація, які дозволяють відокремити та очистити рекомбінантний білок NS3 вірусу гепатиту С від інших неклітинних компонентів.

Хроматографія на іонообмінних колонках є одним з методів хроматографії, що використовуються в процесі очищення білків. У цьому методі, колонка містить сорбент заряджений протионами або аніонами, які взаємодіють зі зарядженими групами білків. Зразок, що містить рекомбінантний білок NS3, наноситься на колонку, а потім проходить через неї розчин, який називається елюент. Рекомбінантний білок може бути затриманий на колонці, а не зацікавлені компоненти пройдуть крізь колонку. Потім застосовується градієнт елюента, що дозволяє розмити зв'язок між білком та колонкою, щоб білок можна було зібрати. Залежно від властивостей цільового білку та забруднень, можуть використовуватись різні типи колонок з різною стаціонарною фазою. Наприклад, для розділення білків за розміром можуть

					ДП БТ-9106. 00.000 ПЗ	Арк.
						33
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

використовуватись колонки з гель-фільтрацією, а для розділення за зарядом – іонообмінні колонки. Крім того, фракціонування за допомогою хроматографії може включати використання специфічних афінних сорбентів, які взаємодіють з цільовим білком, що сприяє його відокремленню від інших компонентів суміші. Це можуть бути антитіла, афінні таги або інші молекули, що специфічно взаємодіють з цільовим білком. Завдяки цьому специфічному зв'язуванню білок може бути відокремлений від інших компонентів суміші [23].

Афінна хроматографія базується на використанні специфічного зв'язування між білком та лігандом, який знаходиться на поверхні сорбента. Ліганд може бути антитілом, афінним тегом або іншим специфічним зв'язуючим агентом. Зразок, що містить рекомбінантний білок NS3, наноситься на колонку з афінним сорбентом, на якому розташований відповідний ліганд. Рекомбінантний білок зв'язується з лігандом, тоді як інші компоненти пройдуть через колонку. Після цього проводять елюцію, використовуючи розчин, що розриває зв'язок між білком та лігандом, що дозволяє відокремити і зібрати білок.

Гель-фільтрація (також відома як розмірно-висотний ексклюзивний хроматографічний метод) є ще одним методом очищення білків у процесі виробництва рекомбінантного білку NS3 вірусу гепатиту С. У цьому методі використовується колона з гелевим матриксом, який має пори різних розмірів. Зразок, що містить суміш білків, наноситься на колонку і проходить через неї. Великі білки не можуть проникнути через пори гелю і проходять біля колонки, тоді як менші білки проникають в гель і рухаються повільніше. На виході з колонки збираються окремі фракції, які містять рекомбінантний білок NS3 та інші білки, відокремлені від більшого білкового комплексу.

Гель-фільтрація є важливим методом очищення, оскільки дозволяє відокремити білки за їхнім розміром і формою, не вимагаючи специфічного зв'язування або зарядових властивостей. Цей метод допомагає усунути забруднення, такі як невинні агрегати білків, фрагменти ДНК або різні забруднюючі речовини. Крім того, гель-фільтрація може бути використана для

					ДП БТ-9106. 00.000 ПЗ	Арк.
						34
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

зміни буферної системи, що є корисним для подальшої характеристики та стабілізації білку NS3.

За умов використання методу хроматографії в процесі виробництва досягаються такі результати:

1. висока чистота продукту: хроматографія дозволяє ефективно видалити супутні забруднення та небажаний матеріал з білкової суміші;
2. висока вибірковість: за допомогою підбору оптимальних умов хроматографії, можна досягти вибіркового утримання NS3 на сорбенті, тим самим виділяючи його з решти білкової суміші;
3. високий вихід продукту;
4. контрольовані умови: можливість точно контролювати умови проведення процесу, такі як рН, інтенсивність сорбції, температура і склад буферу. Це дозволяє оптимізувати процес, забезпечити стабільність та повторюваність результатів;
5. гнучкість та масштабованість: від лабораторних масштабів до промислових виробництв;
6. малі витрати на обладнання та матеріали: хроматографічні системи та сорбенти виготовляються у широкому асортименті та доступні на ринку. Це робить метод хроматографії відносно вигідним з точки зору вартості обладнання та матеріалів, особливо порівняно з іншими складними методами очищення та виділення білків;
7. можливість інтеграції з іншими методами: хроматографію можна комбінувати з іншими методами очищення, які допомагають усунути специфічні типи забруднень. Наприклад, перед хроматографією може бути застосована фільтрація для видалення частинок, а після хроматографії може бути проведена ультрафільтрація для концентрації та очищення білку;
8. відтворюваність та стандартизація: добре вивчений та стандартизований метод очищення білків [21].

					ДП БТ-9106. 00.000 ПЗ	Арк.
						35
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

2.5 Механізми впливу цільового продукту на біохімічні процеси

Природне середовище може включати фактори, які взаємодіють з NS3 білком гепатиту С і сприяють його біохімічним перетворенням. Наприклад, NS3 білок може бути розкладений або модифікований під впливом ендогенних або екзогенних ферментів, що присутні в середовищі. Це може вплинути на активність та структуру білку.

Крім того, в природних середовищах NS3 білок може взаємодіяти з іншими біологічними молекулами, такими як білки, нуклеїнові кислоти або ліпіди. Ці взаємодії можуть відігравати роль у формуванні комплексів або активувати різні біохімічні шляхи в природному середовищі.

Механізми впливу на біохімічні процеси:

1. Участь у вірусній реплікації: NS3 білок гепатиту С має геліказну активність, що розкручує геном HCV і стимулює синтез вірусного РНК. Це спричиняє поширення інфекції в організмі.

2. Вплив на імунну систему: NS3 білок взаємодіє з імунними компонентами, такими як цитокіни, інтерферони та інші фактори, що регулюють імунну відповідь. Це може призводити до модуляції імунної системи, зниження відповіді на інфекцію та забезпечення виживання вірусу в організмі.

3. Вплив на обмінні процеси: NS3 білок може взаємодіяти з різними молекулами і ферментами в клітині, включаючи білки, РНК та ДНК. Це може впливати на обмінні процеси в клітині, такі як сигнальні шляхи, метаболізм речовин та енергетичні процеси.

Участь у біохімічних перетвореннях в природних середовищах: NS3 білок може бути вивільнений з інфікованих клітин в природне середовище, таке як кров або сироватка [23].

РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ

3.1. Генетична вивченість біологічного об'єкту

Кишкова паличка є одним з найбільш інтенсивно досліджуваних організмів і широко використовується в наукових дослідженнях і промисловому застосуванні. Найбільш широко використовуються *E. coli*, отримані зі штамів В і К-12, що є результатом роботи з використанням К-12 для генетичних і біохімічних досліджень, а В – для вивчення вірулентних бактеріофагів, рестрикційних систем, мутагенних аналізів і бактеріальної еволюції [13, 24].

Вперше було визначено повногеномну послідовність штаму К-12 MG1655 [24] та показано на рисунку 3.1.

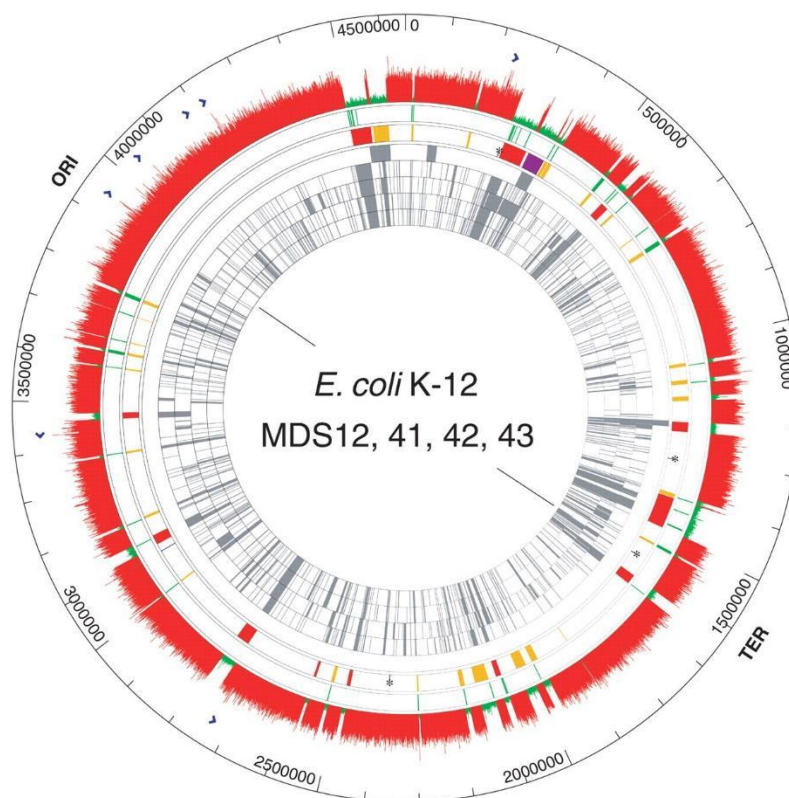


Рисунок 3.1. Кругова карта геному [23]

					ДП БТ-9106. 00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Вознюк М. Я.				РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ	Стадія	Аркуш	Аркушів
Конс.						Д	37	85
						КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		
Керівн.	Дуган О. М.							
Затв.								

Штам *E.coli* містить плазмиду pACYC184 з IPTG-індукованим геном *birA* для надмірної експресії біотинлігази (pBIRAcм).

Особливості плазмиди pBIRAcм

- Основа pACYC184.
- Фрагмент розміром 1,3 Кб містить *lacIq*, вставлений у сайт *EcoRV* (таким чином порушуючи роботу гена *tetR*).
- *BirA* експресується з промоторного оператора *tac*.
- Термінаторна конструкція *rrnB* знаходиться між ділянкою *lacIq* і руйнує ділянку *XbaI* в pACYC184.

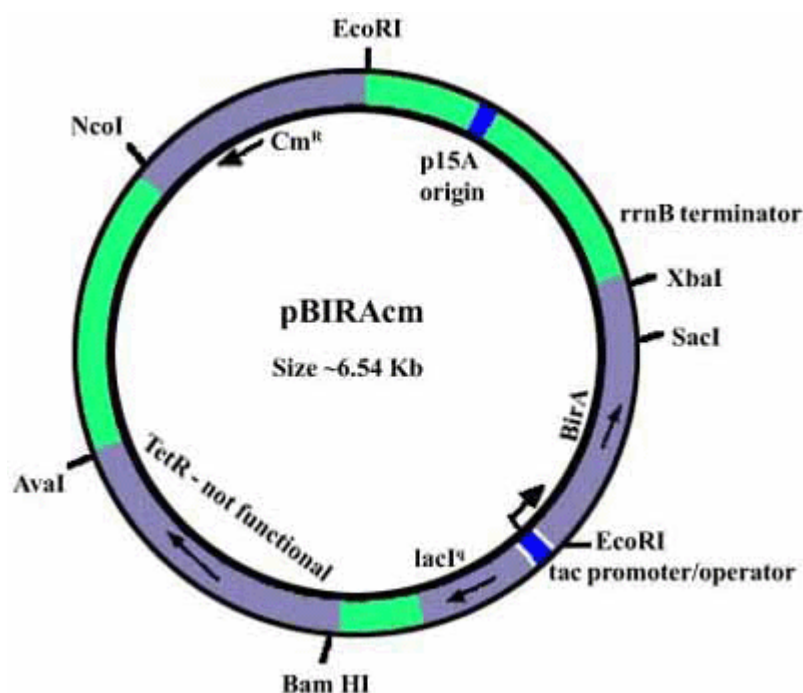


Рисунок 3.2. Плазмиди pBIRAcм у штамі *E.coli* [24]

3.2. Загальні методи створення високопродуктивного промислового продуценту (відповідно до типових технологій)

3.2.1. Використання природного та штучного добору для отримання промислових продуцентів

Штучний добір – вибірка найбільш продуктивних і невибагливих зразків мікроорганізмів і культивування їх у штучному середовищі

E.coli здатна до росту на простому середовищі, що містить тільки глюкозу та неорганічні солі.

					ДП БТ-9106. 00.000 ПЗ	Арк.
						38
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Штучний мутагенез – зовнішній вплив на життєдіяльність мікроорганізмів. Застосування ультрафіолету, радіації, хімічних речовин для отримання необхідної мутації.

Ультрафіолет впливає на ДНК, то більше формується димерів. Вони накопичуються – це уповільнює темпи розмноження мікроорганізмів, що призводить до вимирання колонії бактерій. За малої дози УФ-опромінення клітина послаблюється, за середньої – мутує, а за великої вона може відразу загинути.

Іонізуюче випромінювання на мікроорганізми здебільшого діє згубно, тому що здебільшого має стійку бактерицидну дію (вбиває бактерії) і викликає мутації [25].

Ешерихії чутливі до більшості дезінфекційних речовин (формальдегіду, препаратів хлору, гідроксиду натрію тощо) та антибіотиків (тетрациклінів, аміноглікозидів, рифампіцину тощо) і антибіотиків (тетрациклінів, аміноглікозидів, рифампіцину та ін.). Однак вони здатні швидко ставати стійкими до антимікробних препаратів переважно за рахунок набуття R-плазмід.

3.2.2. Використання індукованого мутагенезу

Найбільша ефективність досягається при трансформації 1 мкл 0,1 нг/мкл супер згорнутої ДНК pUC18 за реакцію. Більшу кількість колоній можна отримати, трансформуючи до 50 нг ДНК, хоча результуюча ефективність (КУО/мкл ДНК) може бути нижчою. Об'єм розчину ДНК, що додається в реакцію, можна збільшити до 10% від об'єму реакції, але при цьому ефективність трансформації

Оптимальна ефективність трансформації спостерігається, коли клітини піддаються тепловому імпульсу при 42°C протягом 45-50 секунд. Ефективність різко знижується, коли клітини піддаються тепловому імпульсу протягом < 45 секунд або протягом > 60 секунд [25].

					ДП БТ-9106. 00.000 ПЗ	Арк.
						39
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

3.2.3. Регуляція метаболізму у мікробній клітині

Клітини XL-1 стійкі до тетрацикліну. Клітини XL1-Blue мають дефіцит ендонуклеази (endA), що значно покращує якість міні препаратів ДНК.

Використання β -меркаптоетанолу (β -ME): доведено, що β -ME підвищує ефективність трансформації. Наданий β -ME розбавлений і готовий до використання. Можна використовувати свіже розведення 1:10 (із запасу 14,2 М), однак Stratagene не може гарантувати результати з β -ME з інших джерел [16].

3.2.4. Використання методів генної та клітинної інженерії

У генетичній інженерії основними інструментами молекулярного маніпулювання є ферменти, які можна розділити на три основні групи:

Ферменти, що фрагментують нуклеотидні послідовності – нуклеази. Наприклад, рестриктаза EcoRI розпізнає послідовність нуклеотидів, розташованих у кожному з ланцюгів на рівній відстані від осі симетрії та комплементарних один одному (5'-GAATTC-3'). Під час фрагментації молекул ДНК із використанням ферментів рестриктаз можуть утворюватися фрагменти з «тупими» і «липкими» кінцями.

У генетичній інженерії для синтезу ДНК на матриці ДНК або РНК використовуються ДНК-полімераза I і зворотна транскриптаза (ревертаза).

Ферменти, що лігують фрагменти ДНК, - лігази. У генетичній інженерії для лігування (зв'язування) фрагментів молекул ДНК часто використовується ДНК-лігаза фага T4 [27].

3.3. Схема отримання продуцента, що використовується в роботі

Синтетичний ген, що кодує рекомбінантний білок ВГЛ с33с отримують у вигляді фрагментів XbaI/SalI у векторі pPCRscript. Цей синтетичний ген клонують, використовуючи сайти рестрикції XbaI та SalI, у експресійний вектор pR2M6 [28], який включає в білок стабілізуючий фрагмент IL-2 довжиною 60 а.о. З метою очищення до гена додають ділянку, що кодує мітку

					ДП БТ-9106. 00.000 ПЗ	Арк.
						40
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

6-His.

Клітини *Escherichia coli* XL1- Blue, трансформовані вектором pR2M6-NS3-His, вирощують в 5 мл середовища LB [19], доповненого ампіциліном (100 мкг/мл), протягом 8 годин за 37 °С. Далі 5 мл культури пересівають в 300 мл середовища LB, доповне ампіциліном, та інкубують при 37 °С протягом ночі при струшуванні. Клітини збирають центрифугуванням (3000 об/хв) при 4°С протягом 30 хвилин. Отримують новий штам *Escherichia coli* XL1- Blue, який перевіряють та визначають морфологічні, культуральні та біохімічні властивості.

Схема отримання продуцента наведена на рисунку 3.3:

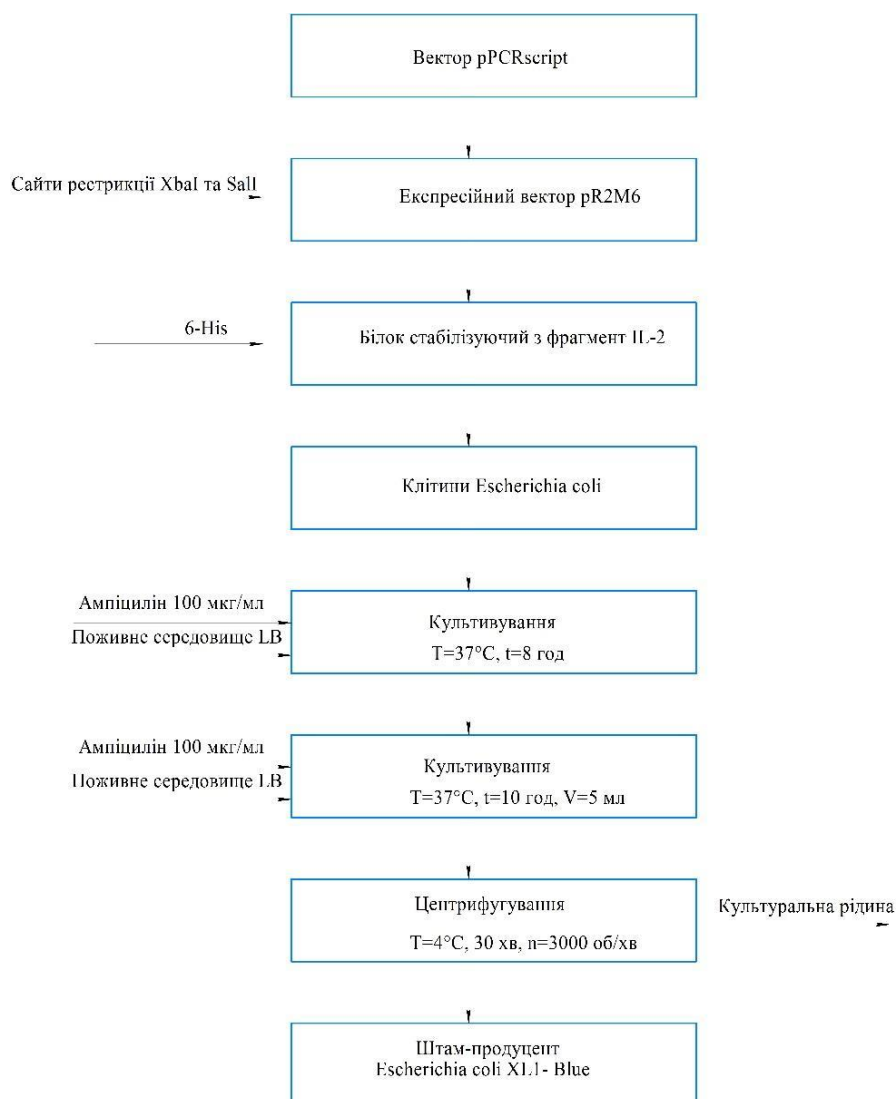


Рисунок 3.3. Схема отримання продуцента *Escherichia coli* XL1- Blue [26]

3.4. Особливості технології або апаратурного оформлення у зв'язку з використанням обраного продуцента

Агрегація білків та утворення тілець включення часто спостерігається, коли рекомбінантні білки надмірно експресуються в *Escherichia coli* [26]. Аналіз розчинності свідчить про те, що білок NS3с33с експресується у вигляді цитоплазматичного тільця включення. Через нерозчинну природу білка NS3-с33с, що експресується *E. coli*, використовують сечовину як денатурат.

Солюбілізований білок NS3-с33с очищають за допомогою металоафінної хроматографії за допомогою мітки 6х His, прикріпленої до С-кінця білка. Елюювання проводять за допомогою низхідного градієнта рН.

Кінцевий очищений білок NS3-с33с має масу 37 кД та отриманий у вигляді двох фракцій при рН=4,5 з чистотою понад 90%. Вилучення становить приблизно 58% від кількості NS3с33с, введенного в колонку [20].

					ДП БТ-9106. 00.000 ПЗ	Арк.
						42
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

4.1. Характеристика кінцевої продукції виробництва

Характеристика кінцевої продукції виробництва включає:

Назву продукції – рекомбінантний білок NS3 вірусу гепатиту С

Категорію та номер діючого нормативно-технічного документу: ТУ У 24.4-24265186- 014:2012 «Білки-антигени рекомбінантні очищені».

Опис кінцевого продукту та його склад: л Рекомбінантний вірус гепатиту С (HCV) (серотип 1a, ізолят H77) NS3 складається з 335 амінокислот і передбачає молекулярну масу 37,9 кДа. Чистота – > 95 %. Ліофілізований із стерильним 50 мМ Tris, 500 мМ NaCl. Зазвичай містить 5–8 % трегалози, маніту та 0,01 % Tween80 додають як захисні засоби перед ліофілізацією.

Вимоги до упаковки, маркування, транспортування, зберігання та терміну придатності продукції.

Транспортування: рекомбінантні білки постачаються у вигляді ліофілізованого порошку, який відвантажується при температурі навколишнього середовища.

Фасування: флакони заповнюють розчином, закривають пластиковими кришками, додатково герметизують парафіллом. На флакон наклеюють етикетки-самоклейки за ТУ У 21521832.001-98.

Не фасовані упаковки рекомбінантних білків поставляються у вигляді замороженої рідини. Вони відвантажуються з блакитним льодом, якщо клієнти не вимагають іншого.

Стабільність і зберігання: Зразки стабільні протягом дванадцяти місяців з дати отримання при температурі від -20°C до -80°C.

Зберігати в стерильних умовах при температурі від -20°C до -80°C. Для оптимального зберігання рекомендується аліквотувати білок. Уникати

					ДП БТ-9106. 00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Вознюк М. Я.			РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА	Стадія	Аркуш	Аркушів
Конс.						Д	43	85
						КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		
Керівн.		Дуган О. М.						
Затв.								

повторних циклів заморожування-розморожування [29].

4.2. Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовуються у виробництві

Таблиця 4.1. Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів

Найменування	Категорія і номер НТД, згідно якої перевіряються показники якості	Показники, що обов'язкові для перевірки та їх нормативне значення	Примітка
1	2	3	4
1. Основна сировина:			
Дигідрофосфат калію	ГОСТ 4198-75	Показники відповідності ГОСТу у з	Посівне середовище
Магній сульфат	ДСТУ ISO 2479-2001	Показники відповідності ДСТУ у з	Посівне середовище
Натрій хлорид	ДСТУ ISO 2479-2001	Показники відповідності ДСТУ у з	Посівне середовище
Амоній хлорид	ГОСТ 2210-73	Показники відповідності ГОСТу у з	Посівне середовище
Ампіцилін натрієва сіль	ДСТУ ГОСТ 4919.2:2008	Показники відповідністю ДСТУ у з	Посівне середовище
Бактотриптон	ТУ 9385-002-00479327-94	Показники відповідністю з ТУ у з	Посівне середовище
Гідрохлорид тіаміну	ДСТУ EN 12821:2005	Показники відповідністю ДСТУ у з	Посівне середовище
Глюкоза	ДСТУ 4464:2005	Показники відповідністю ДСТУ у з	Посівне середовище
Дріжджовий екстракт	ТУ 9385-007-39484474-03	Показники відповідністю з ТУ у з	Посівне середовище
Кальцій хлорид	ГОСТ 450-77	Показники відповідності ГОСТу у з	Посівне середовище
Марганець хлористий	ГОСТ 612-75	Показники відповідності ГОСТу у з	Посівне середовище

Арк.

ДП БТ-9106. 00.000 ПЗ

44

Зм. Арк. № докум. Підпис Дата

Натрій фосфорнокислого двозаміщеного	ГОСТ 4172-76	Показники відповідності ГОСТу	у з	Посівне середовище
Цинк хлорид	ГОСТ 4529-78	Показники відповідності ГОСТу	у з	Посівне середовище
2. Допоміжна сировина:				
PMSF (фенілметил-сульфонілфторид)	Merck № 107349	-		Для приготування розчинів
Вода водопровідна	ДСТУ 7525:2014	Показники відповідності ДСТУ	у з	Для виробництва
Динатрієва сіль EDTA - Трилон Б	ГОСТ 10652-73	Показники відповідності ГОСТу	у з	Для приготування розчинів
ДНКаз	-	-		Для приготування розчинів
Етиловий спирт	ДСТУ 4221:2003	Показники відповідності ДСТУ	у з	Для приготування розчинів
Натрій гідроксид	ДСТУ ISO 979-2001	Показники відповідності ДСТУ	у з	Для регулювання рН
Перекис водню	ТУ 6- 224.00556-052-98	Показники відповідності ГОСТу	у з	Для санітарної підготовки
Реагент Келланда	ГОСТ 30333-2007	Показники відповідності ГОСТу	у з	Для приготування розчинів
Сірчана кислота	ДСТУ ГОСТ 2184:2018	Показники відповідності ДСТУ	у з	Для приготування розчинів
Тріс-НСІ	Merck, кат. № 420322- 100GM	Показники відповідності з НД	у з	Для приготування розчинів
3. Матеріали:				
Картон коробчастий	ДСТУ 2798- 00	Показники відповідності ДСТУ	у з	Для пакування
Пластикові кришечки	ДСТУ 4260:2003	Показники відповідності ДСТУ	у з	Для пакування

Пластикові флакони	ДСТУ 4260:2003	Показники відповідності ДСТУ	у з	Для пакування
Фільтри для очищення води	ДСТУ EN 872:2013	Показники відповідності ДСТУ	у з	Для очищення води
Фільтри НЕРА	ДСТУ 3493-96	Показники відповідності ДСТУ	у з	Для очищення повітря
Фільтри ФЯВ	ДСТУ 3493-96	Показники відповідності ДСТУ	у з	Для очищення повітря
Фільтри ФЯКП	ДСТУ 3493-96	Показники відповідності ДСТУ	у з	Для очищення повітря

4.3. Опис технологічного процесу

Технологічний процес виробництва рекомбінантного білка NS3 вірусу гепатиту С включає в себе стадії допоміжних робіт, виробничого синтезу, етапи виділення та очищення білку, пакування, маркування та відвантаження, а також етапи знешкодження та переробки відходів [30].

ДР 1 Санітарна підготовка виробництва

Даний етап містить в собі процеси приготування миючих та дезінфікуючих розчинів, підготовку персоналу та його одягу, прибирання приміщень, підготовку обладнання і комунікацій, приготування робочих розчинів, підготовку вентиляційного повітря та води. Увесь технологічний процес та попередня санітарна підготовка проводяться згідно з ДСанПіН та чинних НТД у галузі фармації та біотехнології.

ДР 1.1 Приготування миючих та дезінфікуючих розчинів

Даний етап виробництва проходить згідно з СОП 20-5-1 «Порядок приготування, зберігання та використання дезінфікуючих засобів», дотримуючись правил техніки безпеки. Уся підготовка розчинів полягає у їх приготуванні та зберіганні. Дезінфікуючі розчини повинні не бути шкідливими для людини та довкілля [31].

					ДП БТ-9106. 00.000 ПЗ	Арк.
						46
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ДР 1.1.1 Приготування розчину миючого засобу

Миючий засіб готують у реакторі-змішувачі, через дозатори наливають миючий засіб «Сульфонол» та воду очищену і інтенсивно перемішують, готовий засіб потрапляє у збірник. У стерильний реактор-змішувач подають 96% етанол та розводять очищеною водою. Задля отримання одного літру етанолу з об'ємною часткою 76% необхідно відміряти 800 мл етанолу з об'ємною часткою 96% та 221 мл очищеної води. Етанол застосовують для обробки рук персоналу, а також дезінфікування різних вузлів обладнання.

Розчин перекису водню готують розведенням пергідроль очищеною водою. Отриманий розчин може зберігатись протягом 5-6 днів [32].

ДР 1.2 Підготовка виробничих приміщень

Даний блок заходів, включає зведення до мінімуму механічних та мікробних забруднювачів. Дезінфекція має забезпечувати зменшення концентрації бактерій на 40-60% від їхнього загального вмісту.

До та після проведення повного процесу виробництва продукту виробничі приміщення обробляють отриманими на стадії допоміжних робіт миючими та дезінфікуючими розчинами.

У виробничих приміщеннях підлогу миють у співвідношенні рівному 100 мл на один квадратний метр підлоги.

Крім дезінфікуючих засобів на етапі генерального прибирання також використовують опромінення. Після дезінфекції чисті приміщення звільняються від персоналу і протягом 2 годин включаються бактерицидні лампи. Принаймні за півгодини до початку роботи вентиляцію.

Усі приміщення оснащені приточно-витяжною вентиляцією з подачею стерильного повітря. Для забезпечення гарантованого підпору приплив повинний бути на 20 % більше витяжки.

ДР 1.2.1 Щоденне прибирання

До та після виробничого процесу усі виробничі приміщення обробляють розчинами для дезінфекції. Обробку поверхонь слід проводити досить ретельно.

					ДП БТ-9106. 00.000 ПЗ	Арк.
						47
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Після кожного прибирання приміщення опромінюють бактерицидними лампами до початку роботи наступної зміни [33].

Контроль підготовки приміщень здійснюють за допомогою апарата Кротова, а також проводять посів змивів з поверхонь на поживні середовища. Для зон класу А та В – 2 рази на тиждень, а С та D – 1 раз на тиждень (Км 2).

ДР 1.2.2 Генеральне прибирання

Генеральне прибирання проводиться один раз на тиждень. Усі поверхні приміщень, включаючи як робочі, так і усі інші обробляють 3% розчином перекису водню, після цього приміщення закривають на півгодини, а потім надлишковий перекис видаляють губкою [30].

Усі роботи проводять у гумових рукавичках, гумовому фартуху [34].

ДР 1.3 Підготовка спеціального одягу

Підбір кожного комплекту одягу проводять відповідно НТД «Належна виробнича практика. Комплекти одягу для працюючих у чистих приміщеннях виробництв медичної та мікробіологічної промисловості. Види і комплектність».

Цей процес необхідний для роботи в чистих приміщеннях, щоб зменшити ймовірність контамінації виробництва [29].

Контроль на стадії здійснюється поопераційно завдяки дотриманню технологічних режимів часу, температури та тиску (Кт 5).

Прання одягу згідно вимог належної виробничої практики проводиться у чистих приміщеннях класу D.

Прання проводять в пральній машині, в яку завантажуються миючий засіб та одяг і подається питна вода. Прання проводять при температурі води 40°C, протягом 15 хв [35].

Після прання одяг подається в ополіскувальну машину, де при температурі 30°C промивається очищеною водою декілька разів.

Ополіскування одягу проводиться для видалення залишків миючого засобу з одягу. Ополіскування очищеною водою, дозволяє частково видалити контамінуючу мікрофлору з одягу.

					ДП БТ-9106. 00.000 ПЗ	Арк.
						48
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Сушіння одягу проводять у сушильній шафі повітрям, що пройшло двостадійну очистку на фільтрах протягом 30 хвилин. Сушіння проходить при температурі 40-60 °C протягом 4-5 годин. Після сушіння чистий і сухий одяг поступає на прасування.

Одяг прасують та упаковують на спеціальній прасувально-упаковочній машині у пакети з паперу, для стерилізації.

Одяг під час стерилізації направляють у апарат для стерилізації, що являє собою автоклав прохідного типу.

Технологічний одяг повинен виготовляється з матеріалів, які здатні витримувати режим стерилізації. Стерилізація відбувається в стерилізаторі Ст19 при температурі 120°C, з надлишковим тиском 0,2МПа, протягом 30 хв. Після чого стерильний одяг поступає до персональних шаф [36].

ДР 1.4 Підготовка персоналу

Контроль рук на мікробну чистоту систематично проводить працівник відділу контролю якості (ВКЯ), далі цей працівник заповнює протокол мікробіологічного контролю чистоти рук персоналу виробництва.

Задля проведення належного виробничого процесу підприємство має володіти достатньою кількістю кваліфікованого персоналу.

Загальна підготовка персоналу включає в себе два етапи:

1. Навчання персоналу та періодична перевірка отриманих знань.
2. Забезпечення відповідного санітарного стану персоналу.

Підготовка персоналу включає отримання працівниками необхідних знань щодо відповідальної ділянки виробництва, а також здобуття навичок з керування обладнанням, контролю, тощо [32].

Невід'ємним елементом контролю є перевірка набутих знань. Персонал, який не був присутнім на навчанні, не має знаходитись у зоні виробництва або у зоні контролю [33].

Чітке дотримання цих вимог знижує вірогідність випуску неякісної продукції і створення аварійних ситуацій на підприємстві в результаті неправильних дій персоналу.

					ДП БТ-9106. 00.000 ПЗ	Арк.
						49
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Персонал, який працює в приміщеннях з виробництва стерильних лікарських засобів, є основним джерелом забруднення продукції механічними частинками та мікроорганізмами. Тому, підтримання і контроль стану здоров'я персоналу є необхідною складовою підготовки персоналу. Особливу увагу слід приділяти персоналу, що працює в приміщеннях класу чистоти А та В [33].

Належний санітарний стан персоналу залежить від контролю стану здоров'я при прийомі на роботу, особливо враховуючи сьогоденну ситуацію з пандемією у країні та світі, своєчасним медичним оглядом, і обов'язковим дотриманням персоналом основних правил гігієни.

Крім того, важливою частиною у підготовці персоналу є контроль належного санітарно-гігієнічного стану. Для цього необхідно проводити мікробіологічний контроль рук, шкіри та одягу персоналу [35].

Під час роботи в чистих приміщеннях персонал повинен кожні 1,5 чи 2 години повторювати обробку рук. Необхідно максимально обмежити вхід та вихід у чисті приміщення.

ДР 1.5 Підготовка обладнання та комунікацій

Даний блок робіт складається з мийки та обробки обладнання і комунікацій до і після завершення технологічного процесу і має на меті забезпечення чистоти та стерильності обладнання, що безпосередньо впливає на якість продукції.

Підготовка обладнання та комунікацій включає миття та стерилізацію з обов'язковим контролем мікробної контамінації.

Частини обладнання, що безпосередньо контактують з продукцією, виготовляються з матеріалів, які є інертними до нею, не мають абсорбційних властивостей і не виділяють будь-яких речовин, що здатні негативно впливають на якість продукції [37].

ДР 1.5.1 Мийка та дезінфекція

Очищення технологічного обладнання (ємності, система попередньої фільтрації) проводять після наповнення кожної серії препарату. Внутрішню

					ДП БТ-9106. 00.000 ПЗ	Арк.
						50
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

поверхню миють водою очищеною. Миють за допомогою подачі води на душируючий пристрій типу «Sprayball». Обладнання, яке не оснащено душируючими пристроями миють методом багаторазовою промивки водою.

Ємність миють спільно з системою попередньої фільтрації (Н46, Ф47, Ф48). Для цього ємність підключають через систему фільтрації (при цьому картриджі витягують з фільтротримачів і звільняють від активного вугілля) до каналізації [38].

Ємність (оснащена сорочкою з можливістю подачі пари) піддають термічній обробці (кип'ятіння води в ємності протягом 30 хвилин).

Ємнісне обладнання, яке не обладнане сорочкою, обробляють розчином перекису водню 3% з наступним ополіскування очищеною водою [37].

Після кожної обробки обладнання проводять мікробіологічний контроль. У змивах із зовнішніх стінок апаратів є нормальним не більше ніж 2 колоній не спороутворюючих мікроорганізмів на 2 паралельних чашках Петрі.

ДР 2 Підготовка повітря

ДР 2.1. Підготовка вентиляційного повітря

Передбачене триступеневе очищення повітря на фільтрах EUROVENT

1-й ступінь фільтр ФЯВ

2-й ступінь фільтр ФЯКП

3-й ступінь фільтр НЕРА

Контроль та регулювання показників автоматизовано та здійснюється за допомогою установки типу «Трох».

Устаткування для автоматичного регулювання ВКВ забезпечує:

1. Регулювання мікрокліматичних параметрів - підтримка температури в приміщеннях, що кондиціонують в необхідних межах.
2. Вимірювання:
 - вимірювання температури зовнішнього повітря;
 - вимірювання температури повітря в припливних і рециркуляційних повітроводах;

					ДП БТ-9106. 00.000 ПЗ	Арк.
						51
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

- вимірювання перепаду тиску на фільтрах, кондиціонерах та фінішних фільтрах повітророзподільників.

В системі передбачені блокування для забезпечення відключення вентиляторів системи при спрацьовуванні датчика об'єктової пожежної сигналізації.

На пульт управління ЕОМ вноситься наступна інформація:

- про роботу обладнання системи;
- про температуру зовнішнього повітря, повітря в рециркуляційному каналі;
- про засмічення фільтрів кондиціонерів та фінішного ступеня;
- про засмічення фільтрів ламінарії;
- про роботу витяжних вентиляторів систем місцевих відсмоктувачів;
- про наявність підпору в чистих приміщеннях;
- про зниження температури повітря за повітронагрівачем нижче 5°C.

Управління системою цією системою здійснюється дистанційно за допомогою єдиного пульта управління.

ДР 2.2 Підготовка стерильного повітря

Підготовка стерильного повітря в ламінарних боксах відбувається за допомогою фільтру типу НЕРА, що має високу ефективність (99,999%). Повітря подається в робочу камеру односпрямованим спадаючим потоком.

ДР 3 Підготовка флаконів

ДР 3.1 Попередня фільтрація води

Спершу воду фільтрують даки значення концентрації солей не буде меншим ніж 2 мг/л. При цьому застосовують мікрофільтраційні елементи ЕМЕ Ф. Фільтри рулонного типу розроблені на базі мікрофільтраційної трекової мембрани з поліетилентерифталата, що мають діаметр 0,6 мкм.

ДР 3.2 Очистка води зворотнім осмосом

Далі проходить процес зворотного осмосу через напівпровідникову мембрану ЗУ-13. Температура, при якій відбувається процес дорівнює 20°C, рН – 4,5-7 .

					ДП БТ-9106. 00.000 ПЗ	Арк.
						52
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ДР 4 Підготовка тари

Кінцевий продукт фасують у флакони та закривають їх герметично кришками. Флакони та кришки закупаються у відповідній кількості, перевіряють на наявність дефектів, миють та стерилізують.

Миють тару миючими засобами за температури 60°C протягом 30 хв. Висушують у сухо-жарових шафах за температур 50°C протягом 20-30 хв. Стерилізують протягом 20 хв з температурою на вході 120°C. Стерилізовані флакони та ковпачки направляють до стадії пакування в якості первинної тари.

ДР 5 Приготування поживного середовища

ДР 5.1 Середовище для посівного матеріалу

В якості середовища для вирощування посівного матеріалу обрано середовище LB. Середовища LB багаті поживними речовинами і застосовуються для підтримки культури. *E. coli*, вони містять триптон, який забезпечує азот, вітаміни, мінерали та амінокислоти, необхідні для росту; дріжджовий екстракт є джерелом вітамінів, особливо групи В; хлорид натрію постачає необхідні електроліти для транспортного та осмотичного балансу; бактеріологічний агар - гелеутворювач. Також можуть бути додані антибіотики – ампіциліну натрієва сіль.

Поживне середовище стерилізують за температурою 120°C протягом 30 хвилин та тиску 0,1 Мпа. Охолоджують до температури 50-55°C та розливають у пробірки та колби.

ДР 5.2 Середовище для виробничого біосинтезу

В якості середовища для проведення виробничого процесу обрано модифікований склад Н15 на основі глюкози, пептону та мінеральних солей: гідролізат казеїну – 6г; пептон казеїну – 6 г; дріжджовий екстракт – 6 г; глюкоза – 8г; KH_2PO_4 – 3 г; NH_4Cl – 1 г; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – 15г; MgSO_4 – 0,3 г; NaCl – 0,5 г; ампіциліну натрієва сіль – 0,2 мг; MnCl_2 – 0,15г; ZnCl_2 – 0,1 г; CaCl_2 – 0,1 г.

Поживне середовище стерилізують за температурою 120°C протягом 30 хвилин та тиску 0,1 Мпа. Охолоджують до температури 50-55°C та

					ДП БТ-9106. 00.000 ПЗ	Арк.
						53
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

направляють до ферментеру.

ДР 6 Вирощування посівного матеріалу

ДР 6.1 Зберігання та відновлення музейної культури гібридом

Заморожені у рідкому азоті культури музейного штаму при температурі - 196 °С відновлюють у стерильні пробірки з розлитим поживним середовищем від ДР 6.1 та зберігають у термостаті при 28°С протягом 5 діб. Після інкубації оцінюють культуральні властивості, мікроскопічні та морфологічні ознаки продуценту візуальним шляхом. Відновлену культуру пересівають за допомогою мікробіологічних гачків та петель у колби з поживним середовищем від ДР 4.1 та поміщають у термостат при 28°С протягом 5 діб на качалці $n = 120$ об/хв.

ДР 6.2 Нарощування посівного матеріалу в інокуляторі

Відновлену культуру поміщують у інокулятор об'ємом, коефіцієнт заповнення 0,7 з поживним середовищем від ДР 6.1. Процес нарощування культури відбувається за температури 37 ± 1 °С протягом 12 годин, апарат обладнано механічним перемішувальним пристроєм з частотою обертів $n = 145$ об/хв; подача повітря здійснюється через барботер зі швидкістю 3 л/хв.

ТП 7 Виробничий біосинтез Escherichia coli XL1- Blue

Процес біосинтезу відбувається у апараті – ферментері, з коефіцієнтом заповнення 0,6. Апарат обладнано мішалкою та барботером для подачі кисню. Посівний матеріал надходить до апарату у кількості 8-10% від загального об'єму поживного середовища, середовище надходить від ДР 4.2 по трубопроводам. Апарат містить сорочку з насиченою парою для підтримання постійної температури під час процесу.

Процес відбувається при температурі 36 ± 1 °С, режим аерації – 7 л/хв, кожні 30 хвилин відбирається проба.

ТП 8 Відділення біомаси

Після ферментації культуральна рідина відділяється на центрифугі зі швидкістю обертання 3000об/хв протягом 15 хв. Отриманий фугат направляють на стадію знешкодження відходів, а біомасу відділяють та

					ДП БТ-9106. 00.000 ПЗ	Арк.
						54
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

подають на наступну стадію. При необхідності збирають у пакети, зважують та зберігають у морозильній камері при $-75\pm 5^{\circ}\text{C}$ до появи потреб в біомасі.

ТП 9 Виділення та очистка

ТП 9.1 Відмивання біомаси

Отриману біомасу направляють у збірник та промивають розчином: Трис- HCl - 50 мМ, $\text{Na}_2\text{-ЕДТА}$ - 7 мМ та вода деіонізована - до 1 л. Суспензію направляють на центрифугування для відділення частинок біомаси від рідини, центрифугують зі швидкістю обертання 12000 об/хв протягом 15 хвилин за температури 4°C , кількість повторення тричі. Супернатант, що утворився направляють на знешкодження. Отриману біомасу зважують на вагах.

ТП 9.2 Лізис клітин біомаси

В утворену біомасу від ТП 8 вносять буферний розчин наступного складу: 100 мМ Tris-HCl (рН 8), 100 мМ NaCl та 1.0 мМ PMSF (фенілметилсульфонілфторид). Збірнику з розчином має мішалку для гомогенізації розчинів. Додатково вносять розчин лізоциму з розрахунку (50 мг на 1 мл води), суспензію залишають на 2-3 години за температури 25°C .

ТП 9.3 Заморожування суміші

Після відстоювання заморожують за температурі -25°C (12-14 год) в морозильній камері та розморожують при $+25^{\circ}\text{C}$ на водяній бані. Операцію проводять тричі.

ТП 9.4 Обробка розчином ДНКази

В отриману суміш вносять розчин ДНКази у співвідношенні 1 мл на 100 г біомаси. Додають 2М розчину сульфату магнію у кількості 6 мл на 100 г біомаси. Час витримки 2-3 години при температурі 25°C . В'язкість суспензії зменшується.

ТП 9.5 Обробка ультразвуком

Для повноцінного руйнування клітинної стінки продуцента використовують звуковий дезінтегратор. Отриману суспензію охолоджують на водяній бані з льодом для запобігання тепловій денатурації. Обробка суспензії здійснюють при режимі: 3 імпульси по 15 сек з інтервалом між імпульсами – 30

					ДП БТ-9106. 00.000 ПЗ	Арк.
						55
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

сек, після кожного імпульсу біомасу перемішують.

ТП 9.6 Відмивання суспензії

Суспензію після обробки направляють на центрифугування при швидкості обертання 11 000 об/хв, час – 20 хв, температура 10-12 °С. Отриманий супернатант направляють до знешкодження відходів.

Осад відмивають буферним розчином: 2М карбамід, 50мМ Tris-HCl, 1 мМ EDTA. Суспензію направляють на центрифугування центрифугують, цикл повторюють тричі. Отриманий супернатант направляють до знешкодження відходів

ТП 10 Хроматографічна очистка білку

ТП 10.1 Переведення частинок у розчинний стан

Відділений осад після центрифугування переводять у розчинний стан, для цього додати наступні розчини: 8 М карбамід, 50 мМ Tris-HCl, 1 мМ EDTA та 10 мМ реагент Келланда. Осад ресуспендують, витримують 2 години за температури +20 °С та 16 годин при температурі +4°С.

Отриману суспензію знову направляють на центрифугування при 11000 об/хв протягом 20 хв при температурі +4°С. Отриманий осад направляють до знешкодження відходів.

ТП 10.2 Очищення з низькою роздільною здатністю

Розчин Tris-HCl наносять на колонку для промивання у співвідношенні об'ємів 1:5 до буферного розчину. Утворену фракцію елюату, яка містить білок, направляють на електрофорез.

ТП 10.3 Очистка на аніонообмінній колонці

Отриману фракцію розводять деіонізованою водою десятикратно та наносять на аніонообмінну колонку зі швидкістю 2 мл/хв. Після внесення Потім колонку промивають п'ятьма об'ємами Tris-HCl для промивки та елюють розчином 20мМ Tris-HCl + 1М NaCl.

ТП 10.4 Гель-фільтрація

Розчин білка направляють на колонку очищення фосфатним буфером: NaCl, KCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, NaOH (до pH 7,4). Хроматографічну колонку

					ДП БТ-9106. 00.000 ПЗ	Арк.
						56
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

регенерують і консервують до наступної операції.

ТП 11 Пакування та фасування білку у флакони

Розчин білку розливають у стерильні пластикові флакони за допомогою автоматичного дозатора по 1 мл. Флакони закривають пластиковими кришками та герметизують парафіном. На флакони наноситься етикетки з інформацією про виробника, підприємство, товарний знак, адреса, назва, об'єм, склад, термін придатності, умови зберігання тощо. Інформацію за потребою дублюють англійською мовою.

Флакони пакують у первинну тару – картоні коробки, в кожену коробку поміщають вкладиш з інструкцією, далі по 100 коробок пакують у вторинну тару більшого об'єму та направляють на склад.

ПВ 11 Переробка відходів

На стадію переробки відходів направляють відпрацьовані фільтрувальні матеріали, водяну пару, органічні розчинники тощо.

Повітряні фільтри та фільтри для води вимочують у гарячій воді з дезінфікуючими розчинами для знешкодження контамінації.

Сорбенти промивають великою кількістю води, органічні розчинники відновлюють та очищують.

ЗВ 12 Знешкодження відходів

Відпрацьовані дезінфекційні розчини, миючі засоби та рідкі відходи розбавляють водою, за необхідністю регулюють значення рН сірчаною кислотою або лугом до 7,0 -7,2. Рідкі відходи направляють по трубопроводу у міську каналізацію.

Тверді відходи піддають автоклавуванню для знезараження, сортують за видом – папір, пластик, метали, тканина тощо та відправляють до контейнерів збору сміття у відповідності за видом.

					ДП БТ-9106. 00.000 ПЗ	Арк.
						57
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

4.4. Матеріальний баланс

Таблиця 4.2. Матеріальний баланс виробничої серії

Використано					Отримано				
Стадія	Назва сировини, матеріалів та напівпродуктів	Кількість			Стадія	Назва сировини, матеріалів та напівпродуктів	Кількість		
		кг	шт	л			кг	шт	л
ДР 5.1	Пептон	18,96			ДР 5.1	Поживне середовище для ПМ			59,06
	Дріжджовий екстракт	15,80				Втрати			4,13
	Натрій хлорид	6,32							
	Вода питна			22,12					
Всього:		63,20			Всього:		63,20		
ДР 5.2	гідролізат казеїну			88,60	ДР 5.2	Поживне середовище для біосинтезу			690,00
	пептон казеїну			103,36		Втрати			48,30
	дріжджовий екстракт			59,06					
	глюкоза			118,13					
	KH ₂ PO ₄			44,30					
	NH ₄ Cl			66,45					
	Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O			20,67					
	MgSO ₄			30,27					
	NaCl			51,68					
	MnCl ₂			59,06					

	ZnCl ₂			36, 92				
	CaCl ₂			51, 68				
	ампіцилін натрієва сіль			8,1 2				
Всього:		738,30			Всього:		738,30	
ДР 6	Поживне середовище для ПМ			59, 06	ДР 6	Нарощена культура		60,0 0
	Музейна культура			5,1 4		Втрати		4,20
Всього:		64,20			Всього:		64,20	
ТП 7	Поживне середовище для біосинтезу			690 ,00	ТП 7	Культурал ьна рідина		690, 00
	Нарощена культура			60, 00		Втрати		48,3 0
Всього:		750,00			Всього:		750,00	
ТП 8	Культурал ьна рідина	690, 00			ТП 8	Біомаса	11 7,3 0	
						Фугат		517, 50
						Втрати		55,2 0
Всього:		690,00			Всього:		690,00	
ТП 9	Біомаса	117, 30			ТП 9	Біомаса	10 8,6 7	
	Tris-HCl			0,2 3		Відпрацьо вані розчини		13,5 8
	NaCl			0,3 5		Тверді відходи	2,7 2	
	PMSF			0,9 4		Втрати		10,8 7
	ДНКаз			0,5 9				
	сульфату магнію	9,38						

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ДП БТ-9106. 00.000 ПЗ

Арк.

59

	Карбамід	7,04							
Всього:		135,83			Всього:		135,83		
ТП 10	Біомаса	108,67			ТП 10	Розчин білка			52,47
	EDTA	3,26				Відпрацьовані розчини			98,39
	Tris-HCl	2,17				Втрати			13,12
	реагент Келланда	1,30							
	Деонізова на вода			38,03					
	KCl	2,39							
	Na ₂ HPO ₄	1,96							
	KH ₂ PO ₄	2,93							
	NaOH	3,26							
Всього:		163,98			Всього:		163,98		
ТП 11	Розчин білка			52,47	ТП 11	Флакони з розчином		50000,00	50,00
	Флакони		50000,00			Закупорені кришки		50000,00	3,50
	Кришки		50000,00			Етикетки на флаконах		50000,00	
	Етикетки		50000,00			Парафілм для герметичного закривання		50000,00	
	Парафілм		50000,00			Картоні коробки для флаконів		50000,00	
	Первина тара		50000,00			Групова тара		500,00	
	Вторина тара		500,00			Втрати			2,47
Всього:		250552,47			Всього:		250555,97		

4.5. Контроль виробництва

Таблиця 4.3. Перелік контрольний точок

Назва стадії та номер контрольної точки	Об'єкт контролю та показник, що вивчається	Метод контролю	Періодичність перевірки	Нормативна характеристика показника
ДР 1.1.1 Приготування розчину миючого засобу	Концентрація	Ваги, мірний посуд, концентрато мір	Протягом процесу	35% «Сульфонол» ⁹ 6% етанол 6% H ₂ O ₂
ДР 1.2 Підготовка виробничих приміщень	Мікробіологічна контамінація	Змиви з поверхонь	Протягом процесу	Класи чистоти, КУО: А – < 1; В – не більше 5; С – не більше 25; D – не більше 50
ДР 1.3 Підготовка спеціального одягу	Тривалість мийка обладнання та комунікацій	Годинник	Протягом процесу	15 хв 5 год
	Температура мийка обладнання та комунікацій	Термометр		40-60°C 120 °C
ДР 1.5 Підготовка обладнання та комунікацій	Мікробіологічна контамінація	Змиви з поверхонь	Протягом процесу	Класи чистоти, КУО: А – < 1; В – не більше 5; С – не більше 25; D – не більше 50
ДР 2 Підготовка повітря	Ступінь очистки повітря	Седиментаційний метод	Протягом процесу	Відсутність часток більше 5 мкм
	Мікробіологічна	Бактеріологічний контроль		Класи чистоти,

		контамінація поверхонь обладнання			КУО/м³ : А – < 1; В – не більше 5; С – не більше 25; D – не більше 50
ДР 3		Наявність іонів	Прилад деонізації	Протягом процесу	Не виявлено
Підготовка води					
ДР 4		Чистота	Миття	Протягом процесу	Вода очищена
Підготовка тари		Тривалість мийка обладнання та комунікацій	Годинник		20-30 хв
		Температура мийка обладнання та комунікацій	Термометр		50-60°C 120 °C
ДР 5		Вага, концентрація	Ваги, мірний посуд, концентратомі р	Протягом процесу	Згідно технології
Приготування поживного середовища					
		Тривалість мийка обладнання та комунікацій	Годинник		300 хв
		Температура мийка обладнання та комунікацій	Термометр		120±1°C
		Тиск	Манометр		0,1 МПа
ДР 6		Температура мийка обладнання та комунікацій	Термометр	Протягом процесу	-196°C 28°C 37±1°C
Вирощування посівного матеріалу					
		Частота обертання	Мішалка		120 об/хв
		Аерація	Барботер		3 л/хв
		Тривалість мийка	Годинник		5 діб 12 год

	обладнання та комунікацій			
ТП 7 Виробничий біосинтез Escherichia coli XL1- Blue	Температура мийка обладнання та комунікацій	Термометр	Протягом процесу	36±1°C
	Аерація	Барботер		7 л/хв
	Тривалість мийка обладнання та комунікацій	Годинник		72 год
ТП 8 Відділення біомаси	Температура мийка обладнання та комунікацій	Термометр	Протягом процесу	-75±5°C
	Тривалість мийка обладнання та комунікацій	Годинник		15 хв
	Частота обертання	Мішалка		8000 об/хв
ТП 9 Виділення та очистка	Вага, концентрація	Ваги, мірний посуд, концентратомір	Протягом процесу	Згідно технології
	Частота обертання	Мішалка		
	Тривалість мийка обладнання та комунікацій	Годинник		
	Температура мийка обладнання та комунікацій	Термометр		
ТП 10 Хроматографі	Температура мийка обладнання	Термометр	Протягом процесу	20°C 4°C

чна очистка білку	та комунікацій			
	Тривалість мийка обладнання та комунікацій	Годинник		20 хв 2 год
	Частота обертання	Мішалка		11000 об/хв
ПМВ 11 Пакування та фасування білку у флакони	Концентрація продукту	Диференційний метод	Протягом процесу	1 мг/мл
	Температура зберігання	Термометр		Залежно від способу: +4°C; -20°C; -70°C
ЗВ 12 Знешкодженн я відходів відпрацьованих	Температура мийка обладнання та комунікацій	Термометр	Протягом процесу	120°C
	Тривалість мийка обладнання та комунікацій	Годинник		40 хв
	Кислотність	pH-метр		7,0-7,2

4.6. Технологічна схема виробництва

Технологічна схема виробництва представлена на листі формату А1.

РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ

5.1. Обґрунтування вибраної конструкції. Підбір конструкційних матеріалів для окремих елементів апарату

Для глибинного культивування бактерій у промислових і лабораторних умовах застосовують біореактори або ферментери.

Продукт - *Escherichia coli* XL1- Blue. Оптимальні параметри здійснення процесу культивування: температура – $36 \pm 1^\circ\text{C}$, перемішування – 120 об/хв, аерація – 7 л/хв, тривалість процесу – 72 год.

Ферментер (біореактор) - це прилад, що здійснює перемішування культурального середовища в процесі мікробіологічного синтезу, являє собою герметичний казан, у який заливають рідке поживне середовище.

Роботу ферментерів слід розглядати в тісному зв'язку з функціонуванням комплексу допоміжного обладнання та арматури. Управління процесами біосинтезу та створення оптимальних умов для біосинтезу цільових продуктів можливе за умови організації чіткого контролю та регулювання технологічних параметрів.

Ферментер з турбінною мішалкою та барботером (зображено на рис. 5.1) є одним з найпоширеніших типів ферментерів. Турбінна мішалка є важливим та ефективним засобом для забезпечення однорідного змішування реагентів у ферментері. Вона забезпечує інтенсивне та рівномірне перемішування середовища, що сприяє оптимальному контакту між мікроорганізмами та необхідними поживними речовинами для біосинтезу NS3 антигену вірусу гепатиту С. Барботер, або система аерації, гарантує постійне подання кисню до ферментера, що є критичним для росту та метаболізму мікроорганізмів, використовуваних у процесі біосинтезу. Забезпечення оптимального рівня

					ДП БТ-9106. 00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Вознюк М. Я.			РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ	Стадія	Аркуш	Аркушів
Конс.		Шидецький В. Ю.				Д	65	85
						КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		
Керівн.		Дуган О. М.						
Затв.								

кисню у середовищі є ключовим фактором для збереження активності ферментів та досягнення максимальної продуктивності процесу. Крім того, барботер сприяє видаленню надлишкового вуглекислого газу та інших побічних продуктів.

Ферментер має вбудовані технологічні штуцери для введення миючих засобів, штуцери для входу та виходу теплоносія. Зливний штуцер розташований на нижній частині. На кришці ферментера є кілька штуцерів: для подачі очищеної води, повітря, пари для стерилізації, миючих засобів, завантаження поживного середовища, а також технічний люк. На днищі корпусу розміщений штуцер для зливу розчину після завершення процесу.

Вибір одинарного торцевого ущільнення був обумовлений його високою герметичністю. Торцеве ущільнення відзначається високим коефіцієнтом корисної дії, високою стійкістю до зношування, довговічністю і ефективно працює навіть при наявності биття вала.

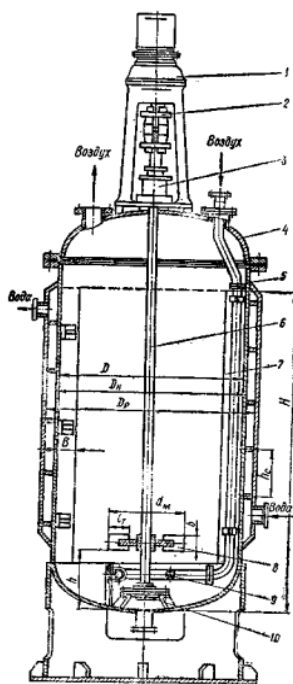


Рис. 5.1. Загальний вид ферментеру з механічним перемішуючим пристроєм і барботером [38]:

1 - привод перемішуючого приладу; 2 - муфта; 3 - ущільнення валу; 4 - кришка корпусу; 5 - корпус; 6 - вал перемішуючого пристрою; 7 - відбивні перегородки; 8 - мішалка; 9 - барботер; 10 - кінцева опора валу.

					ДП БТ-9106. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		66

Частини ферментера [39]

1. Матеріали, що використовуються для будівництва корпусу.

Властивості матеріалу, що використовується для проектування ферментера: не агресивний, нетоксичний, стійкий до багаторазових циклів стерилізації парою, витримують високий тиск, протистояти змінам рН.

Вибір матеріалу також залежить від типу процесу ферментації. У світі для виготовлення ферментаторів використовують переважно два типи матеріалів: скло, нержавіюча сталь, скляні ферментери.

Ферментери зазвичай виготовляються з нержавіючої сталі або, принаймні, мають облицювання (або шари) з нержавіючої сталі для обмеження корозії. Американський інститут чавуну і сталі (AISI) стверджує, що сталі, які містять менше 4% хрому, класифікуються як сталеві сплави, а ті, що містять більше 4%, класифікуються як нержавіючі сталі.

Сталі марки AISI 316, які містять 18% хрому, 10% нікелю і 2-2,5% молібдену, зараз широко використовуються у виробництві ферментерів. Збільшення вмісту хрому підвищує стійкість до корозії, але ефективну плівку утворюють лише марки сталі, що містять щонайменше 10-13% хрому.

2. Ущільнення

Важливо враховувати способи забезпечення надійного асептичного ущільнення між металом і металом, наприклад, між ємністю ферментера і знімною верхньою або нижньою кришкою/дном.

3. Компоненти для змішування

Мішалка - це пристрій, що забезпечує перемішування. Він повинен бути належним чином ущільнений, щоб забезпечити довготривалу асептичну роботу.

4. Повітряний фільтр

Використовується для фільтрації повітря, що виходить з ферментера, щоб запобігти забрудненню навколишнього середовища будь-якими біологічними небезпеками [40].

					ДП БТ-9106. 00.000 ПЗ	Арк.
						67
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

5.2. Технологічний, конструктивний, гідравлічний розрахунки

1. Номінальний об'єм, $V_n, \text{м}^3$ 1,25 ;
 2. Температура середовища в апараті, $t_c, ^\circ\text{C}$ 36;
 3. Коефіцієнт заповнення апарату, φ 0,75;
 4. Тиск, $P, \text{МПа}$ 0,1;
 5. Тривалість змішування, $\tau, \text{год}$ 72;
 6. Кількість мішалок, $Z_M, \text{шт}$ 1;
 7. Частота обертання валу мішалки, $n, \text{с}^{-1}$ 2,67;
 8. Тип мішалки – турбінна;
- Середовище поживне:
9. Коефіцієнт динамічної в'язкості, $\mu, \text{Па} \cdot \text{с}$ $1,79 \cdot 10^{-3}$;
 10. Густина, $\rho, \text{кг/м}^3$ 1183;
 11. Температура середовища:
 - на вході, $t_1, ^\circ\text{C}$ 20;
 - на виході, $t_2, ^\circ\text{C}$ 30;
 12. Температура води в сорочці:
 - на вході, $t_3, ^\circ\text{C}$ 45;
 - на виході, $t_4, ^\circ\text{C}$ 38;
 13. Час нагріву $\tau_n, \text{год}$ 50.

Конструктивний розрахунок реактора

Мета – визначення розмірів апарата та його конструктивних елементів.

Робочий об'єм середовища:

$$V_p = V_a \cdot \varphi = 1,25 \cdot 0,6 = 0,75 \text{ м}^3.$$

Було обрано апарат з еліптичним днищем і еліптичною знімною кришкою (тип 0). За ГОСТ 20680–86 приймаємо внутрішній діаметр апарату [10]:

$$D = 1 \text{ м.}$$

Отримане значення округлюють до стандартного відповідно до ГОСТ 20680-75.

$$d_M = \frac{1}{4} = 0,25 \text{ м.}$$

Відстань від днища реактора до мішалки

$$h = 0,2 \cdot d_M = 0,2 \cdot 0,25 = 0,05 \text{ м.}$$

Довжина лопатей:

$$l = 0,25 \cdot d_M = 0,25 \cdot 0,25 = 0,05 \text{ м.}$$

$$b = 0,1 \cdot d_M = 0,1 \cdot 0,25 = 0,025 \text{ м.}$$

Висота днища:

$$h_d = 0,25 \cdot D = 0,25 \cdot 1 = 0,25 \text{ м.}$$

Висота відбортної частини:

$$h_b = \frac{25}{1000} = 0,025 \text{ м.}$$

Повна висота днища:

$$H_d = h_d + h_b = 0,25 + 0,025 = 0,275.$$

Оскільки еліптичні днища є стандартними виробами, то за ГОСТ 6533–78 знаходимо решту конструктивних розмірів днища апарату [31]:

Внутрішня поверхня еліптичного днища : $F = 1,16 \text{ м}^2$

Товщина стінки еліптичного днища : $S_{дн} = 10 \text{ мм} = 0,01 \text{ м.}$

Об'єм еліптичного днища : $V_d = 0,15 \text{ м}^3.$

Маса днища : $m_{дн} = 93,4 \text{ кг.}$

Знаходимо висоту рідини в апараті:

					ДП БТ-9106. 00.000 ПЗ	Арк.
						69
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

$$H_p = \frac{V_p - V_{дн}}{0,785 \cdot D^2} + H_d = \frac{0,75 - 0,15}{0,785 \cdot 1^2} + 0,275 = 1,04 \text{ м.}$$

Параметр висоти завантаження апарата реактора:

$$\gamma = 8 \cdot \frac{H_p}{D} + 1 = 8 \cdot \frac{1,04}{1} + 1 = 9,3.$$

Визначаємо критерій Рейнольдса:

$$Re = n \cdot d_M^2 \cdot \frac{\rho}{\mu} = 2,67 \cdot 0,25^2 \cdot \frac{1183}{1,79 \cdot 10^{-3}} = 1,103 \cdot 10^5.$$

Параметр гідравлічного опору мішалки:

$$E = \frac{\gamma}{\xi_M \cdot z_M \cdot Re^{0,25}} = \frac{9,3}{8,4 \cdot (1,103 \cdot 10^5)^{0,25}} = 0,06,$$

$z_M = 1$ – кількість мішалок. За графіком [30] знаходимо $\psi_1 = 0$ та $B = 11$.

Для турбінної мішалки за графіком знаходимо $K_N = 7$

Глибина воронки:

$$h_b = \frac{B \cdot n^2 \cdot d_M^2}{2} = \frac{11 \cdot 2,67^2 \cdot 0,25^2}{2} = 2,45 \text{ м.}$$

Гранично допустима глибина воронки:

$$h_{гр} = H_p - h_1 = 1,04 - 0,075 = 0,964 \text{ м.}$$

$h_b = 2,45 > h_{гр} = 0,964$ – в апараті потрібно встановлювати відбивні перегородки.

Товщина відбивної перегородки:

$$b = 0,1 \cdot d_M = 0,1 \cdot 0,25 = 0,025 \text{ м.}$$

Потужність, що витрачається на перемішування:

$$N_p = K_N \cdot \rho \cdot n^3 \cdot d_M^5 = 3 \cdot 1183 \cdot 2,67^3 \cdot 0,25^5 = 154 \text{ Вт.}$$

$K_N = 7$ – критерій потужності.

Розрахунок потужності привода мішалки:

$C_3 = 0,117$ – для турбінної мішалки

Діаметр валу:

$$d_b = C_3 \cdot d_M = 0,117 \cdot 0,25 = 0,03 \text{ м.}$$

					ДП БТ-9106. 00.000 ПЗ	Арк.
						70
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Для ущільнення валу мішалки обираємо торцьове ущільнення.

Потужність, що витрачається на тертя в ущільненнях:

$$N_{\text{ущ}} = 10440 \cdot d_{\text{в}}^{1,3} = 10440 \cdot 0,03^{1,3} = 106 \text{ Вт},$$

Коефіцієнт рівня рідини:

$$K_H = \sqrt{\frac{H_p}{D}} = \sqrt{\frac{1,04}{1}} = 1,02.$$

Потужність електродвигуна:

$$N_{\text{ел}} = \frac{K_n \cdot K_H \cdot \sum K_i \cdot N_p + N_{\text{ущ}}}{\eta} = \frac{1 \cdot 1,02 \cdot 1 \cdot 154 + 106}{0,6} = 4,4 \text{ кВт},$$

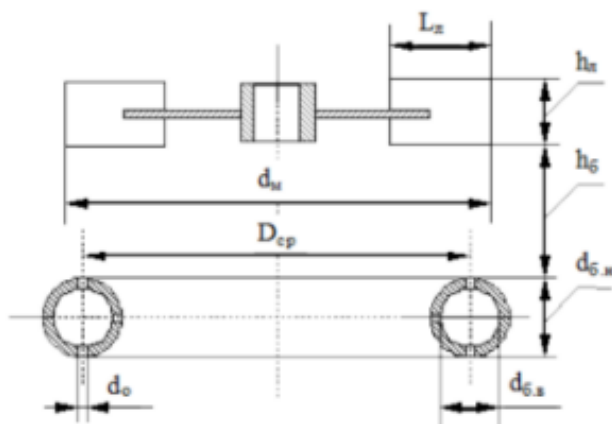
$K_n = 1$ - Коефіцієнт, що враховує наявність перегородок,

$\sum K_i = 1$ - якщо в реакторі не встановлені гільзи для термопар.

Вибираємо двигун CDI DD-3 з номінальною потужністю $N_H = 5$ кВт.

Розрахунок барботеру

Для процесу культивування обираємо барботер кільцевого типу, розміщений під мішалкою.



Висота перемішуючого пристрою над барботером:

$$h_6 = 0,25 \cdot d_M = 0,25 \cdot 0,25 = 0,063 \text{ м.}$$

Середній діаметр барботера:

$$D_6 = 0,5 \cdot d_M = 0,5 \cdot 0,25 = 0,125 \text{ м.}$$

Діаметр отворів:

$$d_0 = 0,005 \text{ мм.}$$

Питома секунда витрата повітря:

					ДП БТ-9106. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		71

$$V_c = \frac{1}{60} = 0,017 \frac{\text{м}^3}{\text{м}^3 \cdot \text{с}}.$$

Для аерації даного об'єму необхідно:

$$V_{\text{заг}} = V_c \cdot V_a = 0,016 \cdot 0,75 = 0,0125 \text{ м}^3.$$

Внутрішній діаметр труби барботера:

$$d_b = \sqrt{4 \cdot \frac{V_{\text{заг}}}{\pi \cdot w_6}} = \sqrt{4 \cdot \frac{0,0125}{3,14 \cdot 25}} = 0,025 \text{ м}.$$

де $w_6 = 25 \text{ м/с}$ - швидкість газу на виході з отворів барботера

За стандартом приймаємо $d_b = 21 \text{ м}$, товщину стінки $s = 2 \text{ мм}$.

Швидкість газу в отворах барботеру

$$w_0 = 3,4 \cdot \sqrt{\rho_{\text{пов}} \cdot \frac{d_b}{\rho_{\text{пов}}}} = 3,4 \cdot \sqrt{1183 \cdot \frac{0,21}{1,3}} = 47 \frac{\text{м}}{\text{с}}.$$

де $\rho_{\text{пов}} = 1,3 \text{ кг/м}^3$ – густина повітря за температури культивування.

Загальна кількість отворів у барботері:

$$z_0 = \frac{4 \cdot V_{\text{заг}}}{\pi \cdot d_0^2 \cdot w_0} = \frac{4 \cdot 0,0125}{3,14 \cdot 0,005^2 \cdot 47} = 13,5.$$

Приймаємо значення $z_0 = 14$ шт.

Кількість отворів в одному ряду

$$z_p = \pi \cdot \frac{D_0}{t} = 3,14 \cdot \frac{0,125}{0,025} = 16 \text{ шт}.$$

$t = 25 \text{ мм}$ – крок між отворами. Приймаємо 16 шт.

Кількість рядів:

$$n_1 = \frac{z_0}{z_p} = \frac{13,5}{16} = 0,86 \text{ шт}.$$

Приймаємо $n_1 = 1$ шт.

Тепловий розрахунок

Вихідні дані:

Середовище поживне;

1. Густина, ρ , кг/м^3 1183;
2. Теплоємність середовища на вході, $C_{2\text{к}}$, $\text{Дж/(кг} \cdot \text{К)}$ 2958;
3. Температура на вході, t_1 , $^{\circ}\text{C}$ 20;
4. Температура на виході, t_2 , $^{\circ}\text{C}$ 30;
5. Діаметр апарату, D , м 1;

					ДП БТ-9106. 00.000 ПЗ	Арк.
						72
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Метою теплового розрахунку є визначення необхідної площі теплообміну та перевірка, чи забезпечить стандартна площа теплообміну рубашки та кількість теплоти, яка необхідна для охолодження речовини.

Розрахуємо потрібну кількість теплоти, що вноситься із поживним середовищем:

$$Q_1 = p_2 \cdot V_p \cdot C_{2p} \cdot t_1 = 1183 \cdot 0,75 \cdot 2958 \cdot 20 = 5,25 \cdot 10^7 \text{ Дж.}$$

Теплота, що виділяється в результаті дисипації:

$$Q_3 = N_p \cdot \tau_n = 66 \cdot 180000 = 1,18 \cdot 10^7 \text{ Дж.}$$

Кількість теплоти, що виноситься:

$$C_{2к} = 2957 \text{ Дж/(кг·К).}$$

$$Q_4 = C_{2к} \cdot p_2 \cdot V_p \cdot t_2 = 2957 \cdot 1078 \cdot 0,75 \cdot 30 = 7,17 \cdot 10^7 \text{ Дж.}$$

Кількість теплоти, витраченої на нагрівання реактора та середовища:

$$Q_5 = m \cdot C_a \cdot (t_1 + 273) = 60 \cdot 4,88 \cdot (20 + 273) = 4,72 \cdot 10^8 \text{ Дж.}$$

m - маса мікроорганізмів

C_a – теплоємність мікроорганізмів КДж/(кг· К).

Тоді кількість теплоти, що віддається теплоносієм:

$$Q_2 = Q_4 + Q_5 - Q_1 - Q_3 = 7,17 \cdot 10^7 + 4,72 \cdot 10^8 - 5,25 \cdot 10^7 - 1,18 \cdot 10^7 = 4,63 \cdot 10^8 \text{ Дж.}$$

Теплові втрати в навколишнє середовище приймемо:

$$Q_6 = 0,1 \cdot Q_2 = 0,1 \cdot 4,63 \cdot 10^8 = 4,63 \cdot 10^7 \text{ Дж.}$$

З урахуванням теплових витрат кількість теплоти, що віддається теплоносієм (Q):

$$Q = Q_2 - Q_6 = 4,63 \cdot 10^8 - 4,63 \cdot 10^7 = 4,17 \cdot 10^8 \text{ Дж.}$$

$$A = \left| \frac{t_1 - t_3}{t_2 - t_3} \right| = \left| \frac{20 - 45}{30 - 45} \right| = 1,67.$$

Середньологарифмічна різниця температур:

$$\Delta t_{cp} = \frac{t_3 - t_4}{\ln \ln \left(\frac{t_3 - t_1}{t_4 - t_1} \right)} \cdot \frac{(A-1)}{A \cdot \ln \ln (A)} = \frac{45 - 38}{\ln \ln \left(\frac{45 - 20}{38 - 20} \right)} \cdot \frac{(1,67-1)}{1,67 \cdot \ln \ln (1,67)} = 16,7^\circ \text{C.}$$

Середня температура води:

$$t_{cp} = \frac{t_1 + t_2}{2} = \frac{20 + 30}{2} = 25^\circ \text{C.}$$

					ДП БТ-9106. 00.000 ПЗ	Арк.
						73
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Температура стінки:

$$t_{\text{ст}} = \frac{t_{\text{ср}} + t_2}{2} = \frac{25 + 30}{2} = 27,5^\circ\text{C}.$$

$$Pr = \frac{\mu_2 \cdot c_2}{\lambda_2} = 1,79 \cdot 10^{-3} \cdot \frac{2958}{0,351} = 15.$$

Критерій Нуссельта визначаємо з критеріального рівняння:

$$Nu = 0,35 \cdot Re_c^{0,67} \cdot Pr_c^{0,33} = 0,35 \cdot (1,1 \cdot 10^5)^{0,67} \cdot 15^{0,33} = 2049.$$

Коефіцієнт тепловіддачі від бурячної меляси у ферментері становить:

$$\alpha_1 = \frac{Nu \cdot \lambda_{c2}}{D} = \frac{2049 \cdot 0,351}{1} = 719 \left(\frac{\text{Вт}}{\text{м}^2 \cdot \text{К}} \right).$$

$$\beta = \frac{1}{273 + \Delta t_{\text{ср}}} = \frac{1}{273 + 24} = 3,4 \cdot 10^{-3}.$$

Критерій Грасгофа:

$$Gr = \frac{[\beta \cdot (t_{\text{ст}} - t_{\text{ср}}) \cdot 9,81 \cdot H_p^3]}{\left(\frac{\mu_1}{\rho_1} \right)} = \frac{[3,45 \cdot 10^{-3} \cdot (27,5 - 25) \cdot 9,81 \cdot 1,04^3]}{\left(\frac{4,26 \cdot 10^{-4}}{992} \right)} = 4,42 \cdot 10^6.$$

Критерій Нусельта:

$$Nu_2 = 0,15 \cdot (Gr \cdot Pr)^{0,33} = 0,15 \cdot (4,42 \cdot 10^6 \cdot 15)^{0,33} = 560.$$

Коефіцієнт тепловіддачі від стінки апарата до води:

$$\alpha_2 = \frac{Nu_2 \cdot \lambda_4}{H_p} = \frac{560 \cdot 0,571}{1,04} = 308 \frac{\text{Вт}}{\text{м}^2 \cdot \text{К}},$$

де $H_p = 1,04 \text{ м}$ – висота рубашки.

$$\lambda_4 = 0,571 \frac{\text{Вт}}{\text{м} \cdot \text{К}} \text{ – теплопровідність води.}$$

Термічний опір стінки реактора:

$$\frac{\delta_{\text{ст}}}{\lambda_{\text{ст}}}, \frac{\text{м}^2 \cdot \text{К}}{\text{Вт}}.$$

де $\delta_{\text{ст}} = 0,02 \text{ м}$ – товщина стінки реактора.

$$\lambda_{\text{ст}} = 17,5 \frac{\text{Дж}}{\text{кг} \cdot \text{К}} \text{ – теплопровідність стінки реактора для нержавіючої сталі.}$$

Коефіцієнт теплопередачі під час нагрівання реактора:

$$K = \frac{1}{\frac{1}{\alpha_1} + r_{\text{заб1}} + \frac{\delta_{\text{ст}}}{\lambda_{\text{ст}}} + r_{\text{заб2}} + \frac{1}{\alpha_2}} = \frac{1}{\frac{1}{719} + \frac{1}{5800} + \frac{0,02}{17,5} + \frac{1}{5800} + \frac{1}{308}} = 163 \frac{\text{Вт}}{\text{м}^2 \cdot \text{К}}.$$

Розрахуємо необхідну поверхню теплообміну реактора:

Тоді площа поверхні теплообміну:

					ДП БТ-9106. 00.000 ПЗ	Арк.
						74
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

$$F = \frac{Q_2}{K \cdot \tau \cdot \Delta t_{cp}} = \frac{4,63 \cdot 10^8}{163 \cdot 180000 \cdot 16,7} = 0,946 \text{ м}^2.$$

$$F_{д.} = 1,16 \text{ м}^2.$$

Умова теплообміну виконується, оскільки:

$$F < F_{д.}$$

$$0,946 \text{ м}^2 < 1,16 \text{ м}^2.$$

Розрахована площа теплообміну, є меншою ніж стандартна, тобто забезпечує необхідну температуру у реакторі на протязі його роботи без додаткових теплообмінників.

5.3. Вибір загальнозаводського обладнання

При конструюванні та розрахунку хімічних апаратів конструктору доводиться мати справу з низкою основних вузлів і деталей, що утворюють той чи інший апарат.

До основних вузлів та деталей хімічних апаратів можна віднести: обичайки, днища, зміцнення отворів у стінках, фланцеві та різьбові з'єднання, кришки, штуцера, вводи та висновки труб, покажчики рівня, оглядові вікна, опори апаратів, перемішувальні пристрої та приводи до них.

Конструювання хімічної апаратури необхідно проводити з максимальним використанням нормалізованих вузлів та деталей. При конструюванні необхідно знати технологію виготовлення та складання апарату, умови транспортування та монтажу, вимоги надійності та безпеки в експлуатації, а також інші специфічні вимоги, що пред'являються до хімічного апарату або його вузла. Вузли та деталі повинні мати просту форму, бути технологічними у виготовленні, розміри їх визначають виходячи з умов міцності, жорсткості та надійності конструкції [41].

Завжди слід прагнути до економії матеріалу і зменшення маси деталей, вузлів і апарату в цілому, але без шкоди вимог, що висувуються до них. Виготовлення деталей необхідно передбачати з мінімальними відходами (при розкрої деталей із листів, при механічній обробці на верстатах тощо).

					ДП БТ-9106. 00.000 ПЗ	Арк.
						75
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

У даній роботі розрахуємо насос, що використовується для подачі ферментативного середовища до реактору.

Вихідні дані:

Середовище

поживне;

густина, ρ , кг/м³

1313;

Висота напору, H , м

5;

Шорсткість поверхні труб:

$$\Delta = 0,0002 \text{ м.}$$

Відносна шорсткість каналу:

$$\varepsilon = \frac{\Delta}{0,108} = \frac{0,0002}{0,057} = 0,0035.$$

$$\lambda = 0,11 \cdot \left(\varepsilon + \frac{68}{Re_2} \right)^{0,25} = 0,11 \cdot \left(0,0035 + \frac{68}{1,103 \cdot 10^5} \right)^{0,25} = 0,028.$$

Потужність:

Приймаємо $H = 10$ м - напір.

$$G = \frac{V_a}{3600} = \frac{0,75}{3600} = 2,08 \cdot 10^{-4}.$$

$$N_n = \rho_2 \cdot 9,81 \cdot H \cdot \frac{G}{1000} = 1183 \cdot 9,81 \cdot 10 \cdot \frac{2,08 \cdot 10^{-4}}{1000} = 0,024 \text{ кВт.}$$

Потужність електродвигуна

$$N_{pe} = \frac{N_n}{\eta_n \cdot \eta_{\pi}} = \frac{0,024}{0,88 \cdot 0,98} = 0,028 \text{ Вт.}$$

Де $\eta_n = 0,88, \eta_{\pi} = 0,98$ – коефіцієнти корисної дії (ККД) насосу та передачі від електродвигуна до насосу відповідно.

Висновок: встановлюємо консольний насос марки К 20/1, з наступною характеристикою:

- продуктивність – 0,008 м³/с;
- напор - 10 м;
- номінальної потужності 1 кВт [29].

					ДП БТ-9106. 00.000 ПЗ	Арк.
						76
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

5.4. Вимоги до охорони праці та навколишнього середовища

Допуск на роботу в лабораторії видається особам:

- які досягли 18-річного віку;
- які мають довідку про медичний огляд і не мають протипоказань;
- які отримали теоретичні знання і практичні навички в процесі навчання;
- які пройшли контроль засвоєних основ техніки безпеки.

З огляду на те, що робота біотехнолога пов'язана з небезпекою можливої дії шкідливих чинників на організм працівника, всі співробітники лабораторії забезпечуються спецодягом і засобами індивідуального захисту органів зору та дихання.

Використання захисного одягу (фартухи, рукавички, бахіли тощо), окулярів, респіраторів та ізолюючих дихальних апаратів регламентується внутрішніми інструкціями лабораторії.

Важливим свідченням відповідального ставлення до охорони праці є наявність у лабораторії загальної припливно-витяжної вентиляції та окремої вентиляційної системи. Обов'язковим є оснащення лабораторних центрів газовиділення додатковою локальною вентиляцією.

Перед тим, як приступити до роботи, працівник лабораторії зобов'язаний:

- одягнутися в спецодяг;
- перевірити готовність до використання засобів персонального захисту;
- увімкнути вентиляцію;
- переконатися в наявності вогнегасника відповідного до умов застосування типу;
- упевнитися в працездатності штатних приладів і обладнання, увімкнути їх.

Робочий процес у лабораторії повинен вестися відповідно до елементарних вимог безпеки. Працівник лабораторії зобов'язаний постійно підтримувати чистоту робочого простору, не допускати заставлення проходів сторонніми предметами (упаковкою, меблями, тарованими реактивами та ін.).

					ДП БТ-9106. 00.000 ПЗ	Арк.
						77
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Здійснення небезпечних за виділенням шкідливих газів лабораторних робіт можливе винятково у витяжних шафах із працюючою місцевою вентиляцією. Використання несправних витяжних шаф і захаращення їх різними предметами неприпустиме.

Кількість реактивів, що містяться в лабораторії, не повинна перевищувати необхідної добової (змінної) норми. Легкозаймисті реактиви потрібно зберігати в оснащеному витяжною вентиляцією приміщенні за межами лабораторії в герметичному товстостінному посуді, що має ярлик із назвою речовини.

Неприпустимо залишати посудини з агресивними речовинами в легкодоступних місцях кабінетів і коридорів. Перенесення посуду, що містить небезпечну рідину, здійснюється працівниками попарно, з використанням спеціальних пристосувань.

Перелив небезпечних рідин проводиться за допомогою безпечної лійки. У разі випадкового проливу речовини її потрібно нейтралізувати, а місце розливу ретельно промити. Працюючи з небезпечними речовинами, необхідно використовувати захисні окуляри і рукавички.

Будь-які маніпуляції з кислотами і лугами слід проводити в спеціально відведеному місці, оснащеному локальною витяжною вентиляцією. У спеціальній робочій зоні мають бути: гідрант, невеликий фонтан для промивання очей, гідрошланг для миття рук, чисті рушники.

Основні вимоги з охорони праці працівників хімічних лабораторій. Для набирання в піпетку токсичних рідин використовують гумову грушу. Для розведення концентрованої кислоти потрібно акуратно вливати її в холодну воду, помішуючи суміш. Пролиту кислоту необхідно присипати нейтралізуючою речовиною і видалити спеціальною лопаткою з дерева, а місце розливу обробити вапном або содою, промити і протерти насухо.

Робота з небезпечними реактивами можлива виключно з дозволу керівництва. Усі шкідливі сильнодіючі речовини підлягають суворому обліку [42].

					ДП БТ-9106. 00.000 ПЗ	Арк.
						78
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Відпрацьовані небезпечні речовини і реактиви, що залишилися, потрібно підготувати до утилізації, попередньо переливши їх у спеціальну ємність. Заборонено зливання в один посуд лугу, кислоти і води.

Ємність з-під токсичних продуктів перед миттям необхідно повністю звільнити від залишків речовини. Відмивання лабораторного посуду потрібно проводити в окремому приміщенні, оснащеному індивідуальною вентиляцією та ізольованому від інших місць вогнетривкою перегородкою.

Приміщення для роботи з небезпечними реактивами не призначене для приймання їжі. Не дозволяється використовувати відкритий вогонь, а також палити в лабораторному приміщенні. Стороннім особам заборонено вхід до лабораторії.

Правила поведінки працівників у разі виникнення аварійних ситуацій створені з метою забезпечення безпеки персоналу лабораторій. Відповідно до них працівник лабораторії повинен:

- у разі розливу вогнєнебезпечних речовин - нейтралізувати джерела можливого загоряння і прибрати небезпечний продукт. У разі пожежі слід знеструмити примусову вентиляцію, закрити вентиляційні заслінки, доповісти про ситуацію службі пожежної охорони, поставити до відома керівництво лабораторії, і лише потім приступити до самостійного усунення вогню;

- увімкнення нагрівальних та освітлювальних приладів проводити тільки після повного провітрювання лабораторії та ліквідації можливих неполадок;

- у разі виникнення нещасного випадку потрібно надати потерпілому посильну медичну допомогу, зателефонувати до служби швидкої допомоги, повідомити про подію керівництву.

Після завершення роботи слід відключити всі прилади та систему вентиляції, навести лад у приміщенні. Усе сміття потрібно скласти в металевий контейнер і віднести в спеціальне місце. Потім працівнику потрібно переодягнутися, вимити руки та прийняти душ [43].

					ДП БТ-9106. 00.000 ПЗ	Арк.
						79
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ВИСНОВКИ

1. В даному дипломному проекті для виробництва рекомбінантного білку NS3 було обрано продуцент *Escherichia coli*.
2. З огляду на фізіолого-біохімічні властивості продуценту *Escherichia coli* було вирішено використовувати поживне середовище H15 із додаванням солей MgSO_4 , MnCl_2 , ZnCl_2 , CaCl_2 .
Оптимальні параметри здійснення процесу культивування: температура – $36 \pm 1^\circ\text{C}$, перемішування – 120 об/хв, аерація – 7 л/хв, тривалість процесу – 72 год.
3. Була створена методика для виділення та очищення цільового рекомбінантного NS3 білка з клітин продуцента.
4. Було розроблено комплексний підхід до виробництва рекомбінантного білка NS3 у вигляді розчину. Розроблені технологічна та апаратурна схеми для отримання високоякісного продукту, який може бути успішно використаний для комерційного розповсюдження, або ж як цінний компонент у виробництві моноклональних антитіл та тестових систем.
5. Обрано ферментер об'ємом $12,5 \text{ дм}^3$, апарат з еліптичним днищем і еліптичною знімною кришкою, барботером і турбінною мішалкою. Були проведені необхідні розрахунки, які підтверджують надійність та ефективність розробленої конструкції.

					ДП БТ-9106. 00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	ВИСНОВКИ	Стадія	Аркуш	Аркушів
Розроб.		Вознюк М. Я.				Д	80	85
Конс.								
Керівн.		Дуган О. М.						
Затв.						КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		

ДЖЕРЕЛА

1. Hepatitis C. World Health Organization (WHO). URL: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c> (date of access: 10.05.2023).
2. Hepatitis C: an update on the silent epidemic." Journal of Clinical Gastroenterology, vol. 30, no. 2, 2020, c. 125-143.
3. In silico profiling of Escherichia coli and Saccharomyces cerevisiae as terpenoid factories. Evamaria Gruchattka, Oliver Hädicke, Steffen Klamt, Verena Schütz & Oliver Kayser. 2013
4. Yin H, Hu T, Zhuang Y, Liu T. Metabolic engineering of Saccharomyces cerevisiae for high-level production of gastrodin from glucose. Microb Cell Fact. 2020;19:218.
5. Toward biosynthetic design and implementation of Escherichia coli-derived paclitaxel and other heterologous polyisoprene compounds. Jiang M, Stephanopoulos G, Pfeifer BA: Appl Environ Microbiol. 2012
6. Pan, A. et al. Arch. Intern. Med. 172, 555-563 (2012).
7. Song H, Jiang J, Wang X, Zhang J (March 2017). "High purity recombinant human growth hormone (rhGH) expression in Escherichia coli under phoA promoter". Bioengineered. 8 (2): 147–153.
8. Reyhane Keshavarz, Valiollah Babaeipour, Mehdi Mohammadpour-Aghdam, Ali Asghar Deldar: Overexpression, overproduction, purification, and characterization of rhGH in Escherichia coli Biotechnol Appl Biochem 2021
9. Resistance outside the substrate envelope: hepatitis C NS3/4A protease inhibitors. Özen A, Prachanronarong K, Matthew AN, Soumana DI, Schiffer CA. Crit Rev Biochem Mol Biol. 2019

					ДП БТ-9106. 00.000 ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Вознюк М. Я.			ДЖЕРЕЛА	Стадія	Аркуш
Конс.						Д	81
						КПІ ім. Ізгоря Сікорського ФБТ	
Керівн.		Дуган О. М.					
Затв.							
						Аркушів	85

10. Zhou ZR, Huang W, Liu KJ, Lin FL, Wang XL, Wang F, Jiang RW. Soluble Expression, One-Step Purification and Characterization of Recombinant Human Growth Hormone Fused with ompA3 in Escherichia coli. Protein Pept Lett. 2021
- 11.Електронний ресурс :<https://grasobiotech.pl/produkty/endo-agar-3113/>
- 12.Santos-Zavaleta, A. et al. A unified resource for transcriptional regulation in Escherichia coli K-12 incorporating high-throughput-generated binding data into RegulonDB version 10.0. BMC Biol. 16, 91 (2018).
- 13.An E. coli display method for characterization of peptide–sensor kinase interactions. Kathryn R. Brink, Maxwell G. Hunt, Andrew M. Mu, Ken Groszman, Ky V. Hoang, Kevin P. Lorch, Brett H. Pogostin, John S. Gunn & Jeffrey J. Tabor Nature Chemical Biology volume 19, 451–459 (2023)
14. Escherichia coli: Pathotypes and Principles of Pathogenesis": Michael S. Donnenberg. 2nd Edition - June 12, 2013
- 15.György Pósfai et al. „Emergent Properties of Reduced-Genome Escherichia coli.Science312,1044-1046(2006).
- 16.Efficient Biotinylation E. coli XL1-Blue Strain AVB99. Genomics - Proteomics - Cell Biology | Life Science Tools. URL: <https://www1.biocat.com/products/AVB99-GVO-GC> (date of access: 02.06.2023).
- 17.Cohen SN, Chang ACY, Boyer HW, Helling RB: Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. Proc Natl Acad Sci U S A. 1973, 70.
- 18.Nielsen J: Production of biopharmaceutical proteins by yeast. Landes Biosci Bioengineered. 2013, 4 (4): 207-211.
- 19.Georg Dultz, Tetsuro Shimakami, Markus Schneider, Kazuhisa Murai, Daisuke Yamane, Antoine Marion, Tobias M Zeitler, Claudia Stross, Christian Grimm, Rebecca M Richter, Katrin Bäumer, MinKyung Yi, Ricardo M Biondi, Stefan Zeuzem, Robert Tampé, Iris Antes, Christian M Lange, Christoph Welsch. Extended interaction networks with HCV protease NS3-4A substrates explain the lack of adaptive capability against protease

					ДП БТ-9106. 00.000 ПЗ	Арк.
						82
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

inhibitors. J Biol Chem 2020

20. Alteri CJ, Mobley HL. 2016. The Versatile Type VI Secretion System. Microbiology spectrum 4. Ben Zakour NL, Alsheikh-Hussain AS, Ashcroft MM, Khanh Nhu NT, Roberts LW, Stanton-Cook M, Schembri MA, Beatson SA. 2016. Sequential Acquisition of Virulence and Fluoroquinolone Resistance Has Shaped the Evolution of Escherichia coli ST131.
21. Karp PD, Riley M, Saier M, Paulsen IT, Paley SM, Pellegrini-Toole A. The EcoCyc and MetaCyc databases. Nucleic Acids Res. 2000;28:56–59.
22. Artificial selection and selection. | Biology. Biology. URL: <http://ebiology.ru/iskusstvennyj-otbor-i-selekcija/> (date of entry: 06/06/2023).
23. Microbiology: guidelines for laboratory studies and control of students' independent work / Ed. V.V. Lysak, R.A. Zheldakova. - Minsk: BSU, 2002. - 100 p.
24. Zika Virus Proteins NS2A and NS4A Are Major Antagonists that Reduce IFN- β Promoter Activity Induced by the MDA5/RIG-I Signaling Pathway. Ngueyen TTN, Kim SJ, Lee JY, Myoung J. J Microbiol Biotechnol. 2019
25. Smirnov GB, Bodoev IN, Makarova AP, Butusova TB, Veselovsky VA, Gulyaev AS, Shitikov EA, Ilyina EN. Comparative genomics of the Escherichia coli strains AB1157, AB2463, AB2494 and AB1885. Molecular Genetics, Microbiology and Virology. 2019;37(3):134-139.
26. György Pósfai et al., Emergent Properties of Reduced-Genome Escherichia coli. Science 312, 1044-1046 (2006).
27. Efficient Biotinylation E. coli XL1-Blue Strain AVB99. Genomics - Proteomics - Cell Biology | Life Science Tools. URL: <https://www1.biocat.com/products/AVB99-GVO-GC> (date of access: 02.06.2023).
28. Chen Zheng, Markus Schneider, Antoine Marion, Iris Antes. The Q41R mutation in the HCV-protease enhances the reactivity towards MAVS by

					ДП БТ-9106. 00.000 ПЗ	Арк.
						83
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

- suppressing non-reactive pathways. 2022
29. Ittipat Meewan, Xingquan Zhang, Suchismita Roy, Carlo Ballatore, Anthony J. O'Donoghue, Robert T. Schooley, and Ruben Abagyan. Discovery of New Inhibitors of Hepatitis C Virus NS3/4A Protease and Its D168A Mutant. 2019
 30. Cohen SN, Chang ACY, Boyer HW, Helling RB: Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. Proc Natl Acad Sci U S A. 1973, 70.
 31. Nielsen J: Production of biopharmaceutical proteins by yeast. Landes Biosci Bioengineered. 2013, 4 (4): 207-211.
 32. Alteri CJ, Mobley HL. 2016. The Versatile Type VI Secretion System. Microbiology spectrum 4. Ben Zakour NL, Alsheikh-Hussain AS, Ashcroft MM, Khanh Nhu NT, Roberts LW, Stanton-Cook M, Schembri MA, Beatson SA. 2016. Sequential Acquisition of Virulence and Fluoroquinolone Resistance Has Shaped the Evolution of Escherichia coli ST131.
 33. Karp PD, Riley M, Saier M, Paulsen IT, Paley SM, Pellegrini-Toole A. The EcoCyc and MetaCyc databases. Nucleic Acids Res. 2000;28:56–59.
 34. Искусственный отбор и селекция. | Биология. Биология. URL: <http://ebiology.ru/iskusstvennyj-otbor-i-selekciya/> (дата звернения: 06.06.2023).
 35. Микробиология: методические рекомендации к лабораторным занятиям и контроль самостоятельной работы студентов / Авт.-сост. В.В.Лысак, Р.А.Желдакова. - Мн.: БГУ, 2002. - 100 с.
 36. Smirnov GB, Bodoev IN, Makarova AP, Butusova TB, Veselovsky VA, Gulyaev AS, Shitikov EA, Ilyina EN. Comparative genomics of the Escherichia coli strains AB1157, AB2463, AB2494 and AB1885. Molecular Genetics, Microbiology and Virology. 2019;37(3):134-139.
 37. Bing Wang, Maura Mittermeier, Irina Artsimovitch, RfaH May Oppose Silencing by H-NS and YmoA Proteins during Transcription Elongation, Journal of Bacteriology, 204, 4, (2022).
 38. Origins and Molecular Evolution of the NusG Paralog RfaH. Wang B,

					ДП БТ-9106. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		84

Gumerov VM, Andrianova EP, Zhulin IB, Artsimovitch I. 2020

39. Hepatitis C Virus Infection Is Inhibited by a Noncanonical Antiviral Signaling Pathway Targeted by NS3-NS4A. Christine Vazquez, Chin Yee Tan, Stacy M Horner. 2019

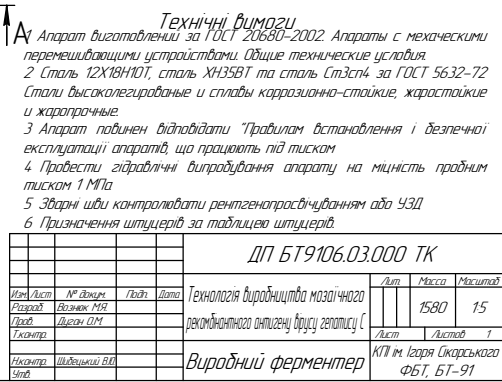
40. Електронний ресурс: <https://www.sinobiological.com/recombinant-proteins/hcv-hcv-ns3-40286-v09e>

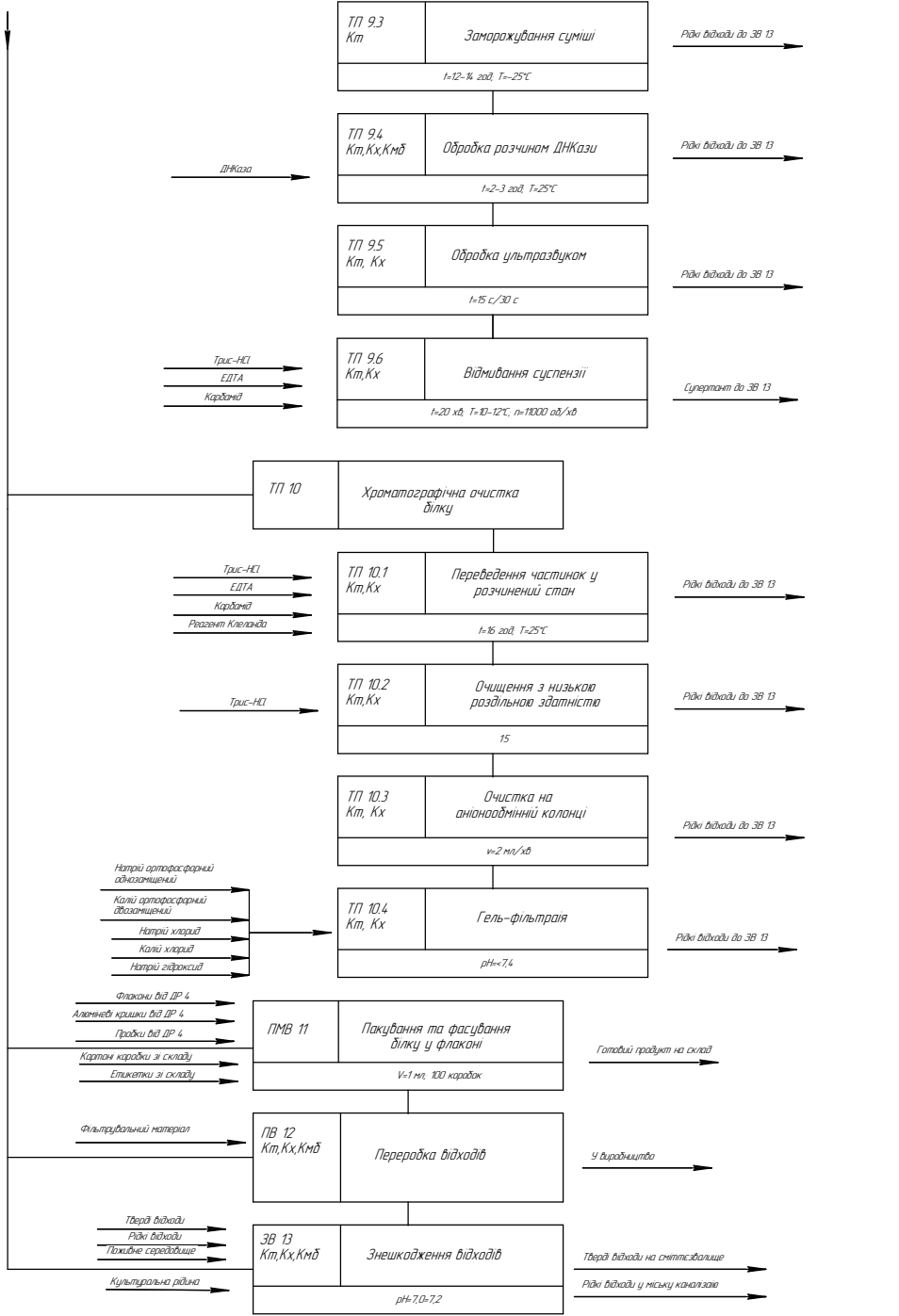
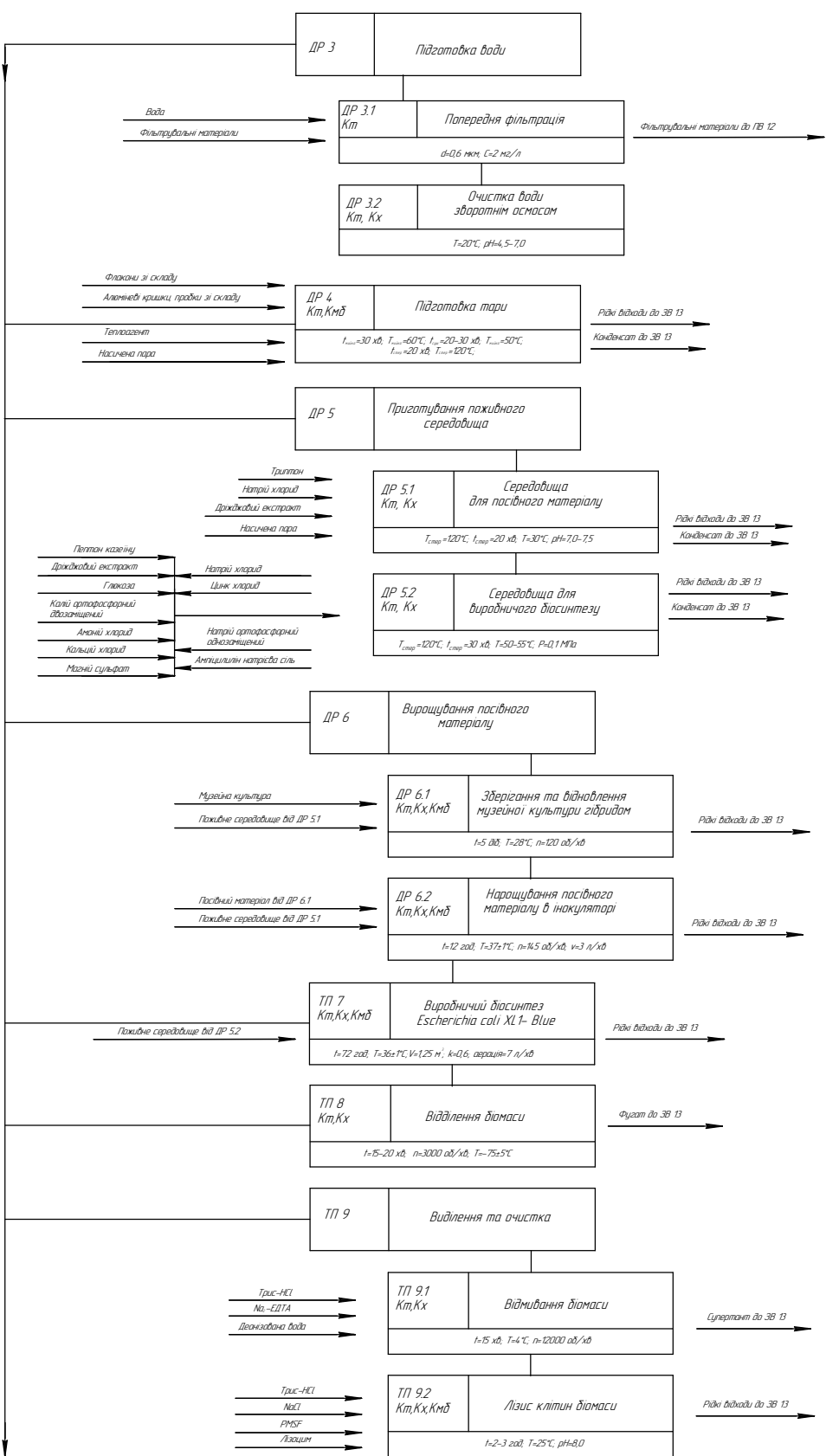
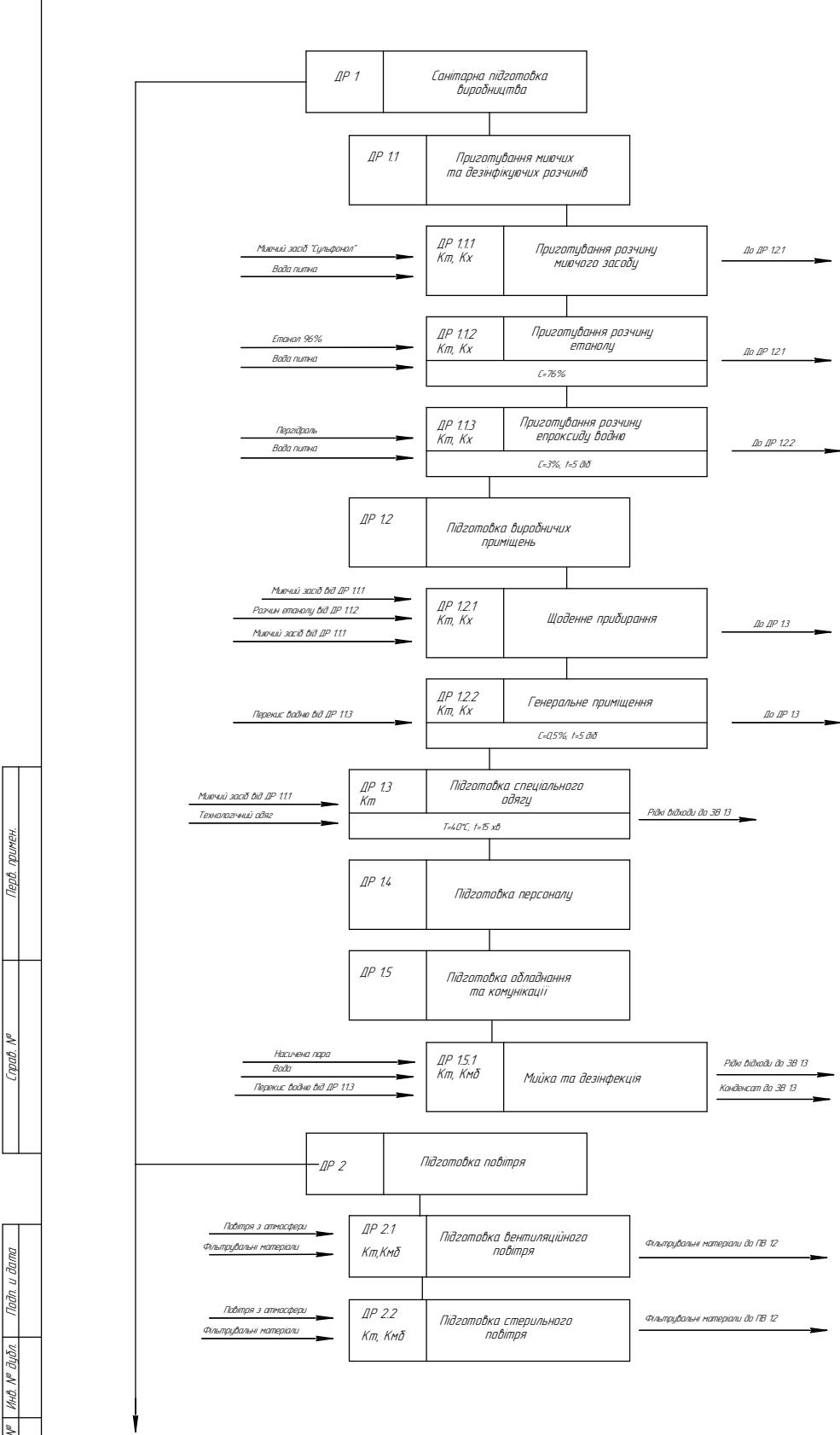
41. Фармацевтический инжиниринг. Чистые помещения. Глава 2. Воздухо- и водоподготовка для фармпроизводств, организованных по GMP // Издательский Дом «Медицинский Бизнес». – 2016. – 41 – 55 С.

42. Наглядна медична біотехнологія: Атлас з дисципліни «Медичні біотехнології» для студентів напряму підготовки «Біотехнологія» / Уклад.: О.Ю. Галкін, Н.В. Дехтяренко, В.Ю. Горчаков, О.М. Дуган. – К.: ІВЦ «Політехніка», 2011 – 36 с.

43. Basic Fermenter Design : External, Agitation & Aeration, Inlets and Outlets. Biotechfront. URL: <https://www.biotechfront.com/2021/12/basic-fermenter-design-external.html> (date of access: 02.06.2023).

					ДП БТ-9106. 00.000 ПЗ	Арк.
						85
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		





Перед. примеч.
Справ. №
Подп. и дата
Имя № подл.
Взам. инв. №
Подп. и дата
Имя № подл.

