

Міністерство освіти і науки України  
Східноукраїнський національний університет імені Володимира Даля

## **ПРОМИСЛОВА БІОТЕХНОЛОГІЯ**

### **МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ**

до практичних занять з дисципліни  
«ПРОМИСЛОВА БІОТЕХНОЛОГІЯ»  
(для здобувачів вищої освіти спеціальності  
226 «Фармація, промислова фармація»)  
(Електронне видання)

ЗАТВЕРДЖЕНО  
на засіданні кафедри ФВТ  
Протокол № 7 від 16. 02. 2024 р.

Київ  
2024

УДК 557.1.002-03.883-02

Методичні вказівки. Практичні заняття з дисципліни: «Промислова біотехнологія» (для здобувачів вищої освіти спеціальності 226 «Фармація, промислова фармація» освітнього ступеню бакалавр) (Електронне видання) / Уклад.: Л.Ф. Горбас, В.П. Шапкін, Н.І. Пономаренко. – Київ: вид-во СНУ ім. В. Даля, 2024. – 76 с.

Викладений теоретичний і методичний матеріал по основних питаннях промислової біотехнології, методи одержання субстанцій на основі біотехнології. Рекомендації допоможуть студентам правильно організувати самостійну роботу при підготовці до практичних занять, а також прищепити практичні навички по виробництву фармацевтичних препаратів на основі промислової біотехнології.

Укладачі:

Л.Ф. Горбас к.х.н., доц.  
В.П. Шапкін, к.х.н., доц.  
Н.І. Пономаренко, к.фарм.н, доц.

Рецензент:

В.Ю. Тарасов, д.т.н., проф.

## Зміст

Вступ	4
1 Практичне заняття № 1. Підготовка і стерилізація повітря для біотехнологічних виробництв	6
2 Практичне заняття № 2. Технологія та устаткування для проведення процесів біосинтезу	19
3 Практичне заняття № 3. Методи виділення, очищення і концентрування продуктів біосинтезу	30
4 Практичне заняття № 4. Виробництво ферментів	35
5 Практичне заняття № 5. Виробництво антибіотиків	43
6 Практичне заняття № 6. Промислове виробництво бактерійних препаратів	45
7 Практичне заняття № 7. Технологія отримання біопрепаратів з клітин тварин і людини	50
8 Практичне заняття № 8. Промислове виробництво людського лейкоцитарного інтерферону	56
9 Практичне заняття № 9. Промислове виробництво біопрепаратів на базі культури тканини і клітин рослин	65
10 Практичне заняття № 10. Система GMP у виробництві продуктів біосинтезу та контроль їх якості	73
Література	76

## Вступ

Об'єкт біотехнології – віруси, клітини, тканини та їх метаболіти – відносяться або до мікробів, або до рослинних чи тваринних організмів.

У результаті виробничого біохімічного процесу за допомогою організму із біологічних об'єктів утворюються препарати профілактичного або лікувального призначення (антибіотики, ферменти та ін.), а також нові біологічно активні речовини (інтерферони, бактерійні препарати).

Дані методичні вказівки містять теоретичні відомості щодо виробництва продуктів біосинтезу, а також методи виділення, очистки, концентрування цих продуктів, підготовки та стерилізації повітря, апаратурного оформлення біотехнологічних процесів.

Після вивчення дисципліни студент повинен:

### **знати:**

- методи підготовки технологічного повітря на підприємствах виготовлення біопрепаратів, вимоги до технологічного повітря підприємств з виготовлення біопрепаратів;
- промислові методи виділення, очищення та концентрування біологічно активних речовин отриманих методом синтезу;
- промислове виробництво ферментів, антибіотиків, вітамінів, органічних кислот методами мікробіологічного синтезу;
- промислове виробництво препаратів із культури тканин і клітин тварин і людини;
- промислове виробництво імунних фармацевтичних препаратів;
- промислове виробництво препаратів із культури клітин і тканин рослин.

### **вміти:**

- проводити підготовку технологічного повітря, використовуючи методи очищення та стерилізації повітря в залежності від технології виготовлення біопрепаратів згідно вимог нормативно-технічної документації;
- вибирати раціональний метод виділення, очищення та концентрування продуктів біосинтезу згідно вимог нормативно-технічної документації;
- виготовляти ферменти, антибіотики, вітаміни, органічні кислоти методами мікробіологічного синтезу, використовуючи необхідні штамп-процедури, поживні середовища, технологічне обладнання згідно вимог нормативно-технічної документації;
- виготовляти імунні препарати;
- виготовляти препарати на основі культури клітин і тканин тварин і людини, рослин, використовуючи основні і допоміжні речовини, технологічне обладнання згідно вимог нормативно-технічної документації;

- здійснювати контроль за операціями та стадіями технологічного процесу виробництва, використовуючи необхідні прилади, засоби і методи контролю згідно вимог нормативно-технічної документації;

- скласти схему технологічного процесу відповідно вибраної технології виробництва фармацевтичного препарату і описання технологічного процесу згідно вимог нормативно-технічної документації;

- виконувати розрахунки виробничих потужностей та завантаження технологічного обладнання, розраховувати основні характеристики механічного, гідромеханічного, теплообмінного, масо обмінного обладнання;

- вибирати контрольно-вимірювальні прилади та автоматизовані системи управління технологічними процесами.

## 1 ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 1

Тема: Підготовка і стерилізація повітря для біотехнологічних виробництв.

Мета: Ознайомитися з класами чистоти повітря, характеристикою мікробних забруднень, визначенням аерозольного та мікробного забруднення.

### Основні теоретичні відомості

Важливим завданням біотехнології є отримання значних об'ємів стерильного повітря, яке використовується для аерації культуральних рідин. Повітря також використовується для вентиляції приміщень і зон, де у асептичних умовах здійснюються, наприклад, стадії очищення готового продукту, а також сушки деяких препаратів.

Ступінь чистоти повітря визначається максимально допустимою кількістю часток та життєздатних мікроорганізмів у 1 м<sup>3</sup> повітря (табл. 1, 2).

Таблиця 1 – Оптимальні значення кількості пилу та мікроорганізмів у виробничих приміщеннях

Клас частоти	Максимальна кількість часток розміром		Максимальна кількість мікроорганізмів у 1 м <sup>3</sup>
	0,5-5,0 мкм	> 5 мкм	
A*	3500	відсутність	< 1
B	35000	відсутність	5
C	350000	2000	100
D	3500000	20000	500

Таблиця 2 – Допустимі значення кількості пилу та мікроорганізмів у функціональних виробничих приміщеннях

Клас частоти	Максимальна припустима кількість часток у 1 м <sup>3</sup> повітря, розміром		Кількість колонієутворюючих одиниць у 1 м <sup>3</sup> повітря
	0,5-5,0 мкм	> 5 мкм	
A*	3500	0	< 1
B	350000	2000	10
C	3500000	20000	100
D	не визначається		200

\* – Приміщення з ламінарним потоком повітря

У атмосферному повітрі окрім кисню, азоту, вуглець(IV) оксиду та інертних газів містяться пари води та дрібнодисперсні частки: 30 % з них має розмір 1-2 мкм; близько 50 % – менше 0,5 мкм.

До складу дисперсних часток окрім пилу входять клітини та спори мікроорганізмів: коків, паличок, актиноміцетів, грибів, бацил. Вони мають розміри від 0,1 до 10 мкм. Для розрахунків приймають розмір мікроорганізму 0,5 мкм.

Кількість пилу і мікроорганізмів у повітрі залежить від пори року (влітку їх у 10 разів більше), вологості повітря, близькості підприємств. Вважають, що в 1 м<sup>3</sup> від 30 до 8000 мікроорганізмів, що становить приблизно тисячну долю від кількості пилу та кіптяви.

Засоби очистки повітря.

Найбільш ефективний метод стерилізації повітря – опромінення ультрафіолетовими променями, але найбільш технологічно та економічно прийнятним є очистка повітря за допомогою волокнистих та пористих матеріалів. Ступінь очистки сягає 99,999 %.

Якість фільтруючого матеріалу (затримуючу властивість фільтру)  $S$ , %, оцінюють за формулою

$$S = \frac{N_1 - N_2}{N_1} \cdot 100, \quad (1)$$

де  $N_1$  – кількість мікроорганізмів у повітрі, що подається на фільтрацію;

$N_2$  – кількість мікроорганізмів у повітрі після фільтрації.

Технологічна та апаратурна схема отримання стерильного стисненого повітря приведена на рисунку 1.

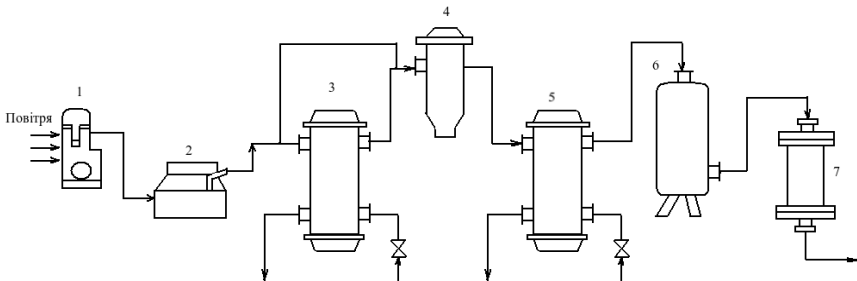


Рисунок 1 – Технологічна схема очищення й стерилізації повітря

1 – фільтр попереднього очищення повітря; 2 – турбокомпресор; 3 – теплообмінник-охолоджувач; 4 – вологовідділювач; 5 – теплообмінник-нагрівач; 6 – головний фільтр; 7 – індивідуальний фільтр.

Фільтри попереднього очищення встановлюються на усмоктувальній лінії перед компресором. Принцип дії фільтра полягає в інерційному осадженні великих часток розміром більше 5 мкм. Між уловлювальними елементами фільтруючих матеріалів передбачаються більші проміжки для максимального зниження опору потоку повітря при високій швидкості фільтрування 1,5-3,0 м/с. Щоб сухі частки після осадження не виносилися з фільтра, шари його промаслюють. Тому такі фільтри називають масляними або вісциновими. Фільтри попереднього очищення можуть бути періодичної й безперервної дії.

До фільтрів періодичної дії відносять касетні відновлювальні масляні фільтри й касетні фільтри сухого типу.

Касетні відновлювальні масляні фільтри прості по конструкції, надійні в експлуатації, уловлюють мікроорганізми й частки пилу розміром більше 5 мкм. Такі фільтри затримують на поверхні насадки 92-99 % повітряного пилу. Тривалість їхньої експлуатації без регенерації залежить від ступеня забруднення повітря й становить від 80 до 800 год.

Касетні фільтри сухого типу складаються з 10-15 перфорованих металевих і вінілплатових шарів. Ефективність очищення повітря становить 70-85 %. У якості фільтруючих матеріалів в касетних фільтрах застосовують пінополіуретан, скляне або хімічне волокно, мати з нетканих матеріалів. У порівнянні з масляними в касетних фільтрах сухого типу немає віднесення масла, запаху.

Фільтри безперервної дії можуть бути трьох типів: масляні самоочисні, рулонні (котушкові) і волокнисті.

Самоочисні масляні фільтри складаються з безперервної фільтруючої стрічки, що при своєму русі проходить через ванну з маслом. При цьому забруднені ділянки стрічки відмиваються від пилу й промаслюються. Завдяки цьому повітря, що всмоктується у компресор, проходить через освіжену промаслену фільтруючу поверхню. Ступінь очищення повітря 90-98 %.

Рулонні (котушкові) фільтри являють собою просту конструкцію, у якій чистий фільтруючий матеріал з однієї котушки з певною швидкістю безупинно перемотується на іншу котушку.

Фільтруючим матеріалом служать пружні мати зі скляного або хімічного волокна. Строк безперервної роботи одного рулону 1 рік.

Волокнисті фільтри являють собою об'ємні мати з волокон полімерів, що промиваються водою з форсунок. У результаті електростатичного притягання на волокнах уловлюються дрібні частки пилу.

Фільтри грубого очищення (головні) застосовуються на другому етапі очищення й стерилізації повітря. Основне їхнє призначення – уловлювання забруднень, що залишилися після проходження фільтрів попереднього

очищення, компресора й теплообмінників. Вони обслуговують декілька ферментаторів і називаються головними, тому, як правило, мають велику ємність.

Конструктивно головний фільтр являє собою вертикальну посудину з опорною решіткою біля днища (рисунок 2). На решітку укладається шар скловати, потім шар гранульованого активного вугілля висотою 0,8-1,0 см і ще шар вати. Більш сучасну конструкцію й більшу продуктивність має головний фільтр касетного типу.

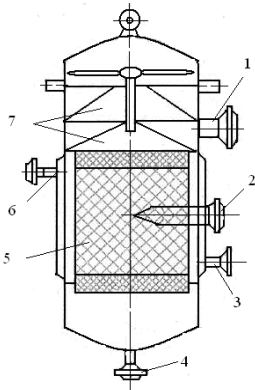


Рисунок 2 – Головний аерозольний фільтр

1, 2 – штуцери виходу й входу повітря; 3 – штуцер виходу пари із сорочки; 4 – патрубок для зливу конденсату; 5 – обичайка фільтруючого елемента; 6 – штуцер для входу пари в сорочку; 7 – ущільнювальні плити.

- склорізи з діаметром волокон 6 мкм, товщиною шару 600 мм, термостійкістю 600 °С.

На фільтрах тонкого очищення здійснюється третій і останній етап очищення й стерилізації повітря на шляху до ферментатору, тому їхня робота повинна бути особливо надійною.

Головні фільтри мають звичайно низький опір і високу пилоємність. На цих фільтрах віддаляється близько 98 % мікробів-контамінантів. Періодично (один раз на місяць) головні фільтри стерилізують гострою парою впродовж години при тиску 0,12-0,15 кПа, а потім просушують сухим повітрям. Фільтруючий матеріал міняють через 6-8 місяців.

У головних фільтрах для грубого очищення використовують наступні фільтруючі матеріали:

- грубе базальтоне волокно ВРП (вертикальний роздув повітрям) з діаметром волокон 16 мкм і 26 мкм, товщина шару 1000 мм; волокно має високу паростійкість, не втрачає своїх властивостей при нагріванні до 1100 °С, відрізняється механічною міцністю й високою пилоємністю;

- високооб'ємний нетканий фільтруючий матеріал, або тканина Каминської з діаметром волокон 16,9 мкм. Випускають у вигляді матів (шарів) товщиною 20-23 мм; особливістю цього матеріалу є те, що в прядильний розчин при його виготовленні вводять антисептик гексахлорофен, тому фільтри, заповнені такою тканиною, не піддають стерилізації;

волокна 6 мкм, товщиною шару 600 мм,

Конструктивно фільтри тонкого очищення багато в чому схожі на фільтри грубого очищення, тільки вони значно менше по розмірах і в них використовуються більш ефективні фільтруючі матеріали. Залежно від виду фільтруючого матеріалу застосовується касетна (фланцева) або патронна (гільзова) конструкція апарата (рисунок 3). У фільтрах касетної конструкції касети, у яких перебуває насадка з волокнистих матеріалів, стягаються болтами через отвори у фігурних фланцях.

У фільтрах патронної конструкції у якості матеріалу насадки застосовуються готові циліндричні фільтруючі елементи, які надіваються на порожній металевий перфорований вкладиш елемента фільтра. Елемент з'єднується зі штуцером, через який відводиться очищене повітря.

У касетних фільтрах тонкого очищення використовується готовий змінний фільтруючий елемент із базальтового супертонкого волокна. Найбільше поширення для тонкого очищення й стерилізації повітря знаходять конструкції, у яких використовуються швидко замінні готові стандартні фільтруючі патрони, у яких застосовують фільтруючі матеріали із фторопласта й металокераміки.

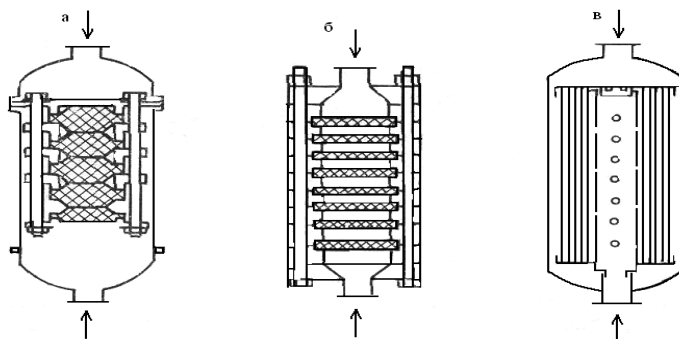


Рисунок 3 – Схеми аерозольних фільтрів, виготовлених з волокнистих матеріалів

а і б – фільтри касетної конструкції; в – фільтри патронної конструкції

Для стерилізації повітря рекомендують також мембранні фільтри з діаметром пор 0,45 мкм. Пористість мембран досягає 80 %. Видалення мікроорганізмів за допомогою мембран засновано на ситовому ефекті. Мембранам не потрібні високі перепади тиску, але для їхньої надійної роботи необхідно точне виконання умов стерилізації. Стерилізувати мембрани

можна тільки насиченою водяною парою, від перегрітої пари в мембранах з'являються тріщини й вони виходять із ладу.

На рисунку 4 представлена схема фільтра тонкого очищення ФТО-60, фільтруючим матеріалом у якому служить папір з базальтових супертонких волокон, гофрований базальтовий картон, фторопластові елементи й ін.

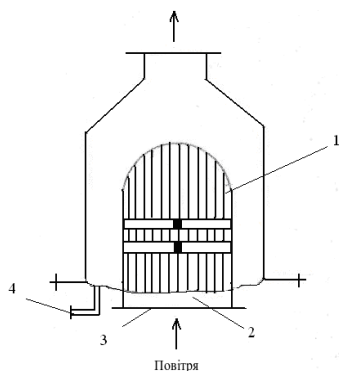


Рисунок 4 – Фільтр тонкого очищення ФТО-60

1 – фільтруючий елемент; 2 – кришка; 3 – фланець; 4 – патрубок для подачі пари на стерилізацію.

Контроль ефективності дії фільтрів, особливо індивідуальних, записується аналізатором запиленості очищеного повітря. Прилад, який має високу чутливість (2-3 тис. часток розміром 0,3 мкм в 1 м<sup>3</sup>), дозволяє проводити контроль мікробіологічного забруднення повітря. Для стерилізації як фільтрів, так і повітряних трубопроводів застосовують гостру пару. Щоб знизити тиск пари на фільтруючі елементи, застосовують подачу пари у фільтр із двох сторін – на вході й виході повітряного трубопроводу. Пара повинна надходити чистою і сухою з температурою 120 °С при стабільному тиску.

На біотехнологічних заводах затримуюча здатність фільтрів повинна бути більше 99,99 %. Стерилізацію фільтрів проводять гострою парою без витягування фільтруючих елементів з корпусу фільтра.

Фільтруючий матеріал в індивідуальних фільтрах міняють через 1-2 місяця.

#### *Контроль процесу очищення повітря.*

У системі очищення й стерилізації повітря для контролю й регулювання процесу встановлюються спеціальні прилади. Температура повітря контролюється на вході й виході холодильника 3, відносна вологість повітря й температура визначаються після нагрівача 5 (див. рисунок 4).

#### *Методи дослідження хімічного складу повітря виробничих приміщень.*

Проби повітря для хімічного аналізу відбираються в зоні дихання людини на робочих місцях. Способи відбору проб діляться на дві групи: динамічні і одномоментні. До динамічних способів відносяться аспіраційні методи, засновані на всмоктуванні аналізованого повітря через поглинальні середовища, які затримують визначувану речовину. Залежно від методу хімічного аналізу у якості поглинальних середовищ можуть використовуватися

тверді сорбенти – активоване вугілля і силікагель, полімерні сорбенти, різні фільтри, а також поглинальні розчини.

Відбір проб повітря проводять на тверді сорбенти, заздалегідь оброблені кислотами і прожарені при певній температурі. Потім поглинені сорбентом речовини десорбують термічним шляхом або екстрагують відповідним розчинником.

Тривалість відбору проб залежить від чутливості методу і концентрації шкідливої речовини в повітрі, але не більше 30 хвилин.

Речовини в газо- і пароподібному стані поглинаються з повітря в рідкі поглинальні середовища і на тверді сорбенти. Для визначення в повітрі високодисперсних аерозолів – димів, туманів, пилу – використовують різні фільтри. Найбільш високу затримуючу здатність мають фільтри типа АФА (аналітичні фільтри аерозольні).

Для протягання повітря через поглинальні розчини і фільтри застосовуються різні аспіраційні пристрої.

Одномоментні способи відбору використовуються у випадках високої концентрації речовини в повітрі, короткочасності технологічного процесу, високій чутливості методу і полягають в заповненні повітрям різних ємностей (бутлі, газові піпетки, газові мішки, камери та і.).

Для отримання достовірних результатів різних досліджень об'єм проби повітря  $V_0$ ,  $\text{дм}^3$  треба привести до нормальних умов (температури  $0\text{ }^\circ\text{C}$  і тиску  $760\text{ мм рт.ст.}$ )

$$V_0 = \frac{V_1 \cdot 273 \cdot B}{(273 + t) \cdot 760}, \quad (2)$$

де  $V_1$  – об'єм повітря, узятий для аналізу,  $\text{дм}^3$ ;

$B$  – барометричний тиск,  $\text{мм.рт.ст.}$ ;

$t$  – температура повітря у момент відбору проб повітря,  $^\circ\text{C}$ .

Проби повітря, відібрані аспіраційним способом в рідкі поглинальні середовища, можуть бути відразу проаналізовані. При застосуванні твердих сорбентів речовина, що підлягає визначенню, переводиться в розчин, в якому можливе проведення аналізу.

Аналогічним чином поступають з пробами повітря, відібраними в замкнуті ємності (бутлі, піпетки та ін.). Для переводу речовини в розчин застосовують наступні способи:

- у судину з пробєю вносять поглинальний розчин, ретельно перемішують до повного розчинення в нім визначуваної речовини;

- відібрану пробу повітря витісняють з судини за допомогою аспіратора через поглиначі з відповідним поглинальним розчином. Потім вміст поглиначів піддають аналізу.

Найбільш чутливими і сучасними методами аналізу є газова і газорідинна хроматографія, полярографія, мас-спектрометрія, інфрачервона спектрометрія. Разом з ними широке застосування знаходять колориметричні і нефелометричні методи дослідження. Колориметричні методи засновані на зміні ступеню інтенсивності забарвлення розчинів, характерного для визначуваної речовини. Нефелометричні – на зміні ступеню каламутності розчину в результаті відповідної реакції, при якій утворюється речовина, що знаходиться в зваженому стані. Вимірювання інтенсивності забарвлення, як і оцінку ступеня каламутності в пробах, проводять шляхом порівняння із стандартними розчинами, тобто розчинами, що містять відому кількість визначуваної речовини. У лабораторних умовах найбільш широке застосування отримав спосіб порівняння по ряду стандартів. Даний спосіб полягає в тому, що ряд пробірок безбарвного скла заповнюють різною кількістю стандартного розчину. Об'єм рідини в пробірках зрівнюють об'ємом проби (об'єм доводять до 5 або 10 мл). При порівнянні інтенсивностей забарвлення пробірки виймають з штатива і розглядають зверху через увесь шар рідини на білому фоні при бічному освітленні. Аналогічним способом проводять порівняння інтенсивності помутніння, тільки фон в даному випадку повинен бути чорним.

Концентрацію речовини в розчинах можна визначити також за допомогою електрофотоколориметру, що дозволяє значно прискорити проведення хімічних аналізів. Для цього готують серію стандартних розчинів з певним вмістом речовини у відомому об'ємі. Вимірюють оптичну щільність отриманих розчинів і будують калібрувальний графік. У якості контрольного розчину використовують поглинальний розчин, задалегідь змірявши його оптичну щільність по відношенню до дистильованої води. Потім проводять колориметрування проби, знаходять значення одиниць екстинкції, відповідне вмісту речовини в пробі, і розраховують концентрацію аналізованої речовини в повітрі  $X$ , мг, по формулі

$$X = \frac{a \cdot c \cdot 1000}{b \cdot V_0}, \quad (3)$$

де  $b$  – об'єм поглинального розчину, узятого для аналізу, см<sup>3</sup>;

$c$  – об'єм поглинального розчину у всій пробі, см<sup>3</sup>;

$V_0$  – об'єм досліджуваного повітря, приведений до нормальних умов, дм<sup>3</sup>.

*Методи контролю запиленості повітря на виробничих підприємствах вибирають залежно від поставлених цілей:*

- гравіметричний (ваговий);
- рахунковий;
- фотоелектричний;

- електричний і ін.

Для гігієнічної оцінки пилу встановлюють:

- кількість його в одиниці об'єму повітря ( $\text{мг}/\text{м}^3$ ) або число частинок пилу в одиниці об'єму повітря ( $y$   $1 \text{ см}^3$ );

- дисперсний склад;

- морфологію частинок;

- хімічний склад.

У санітарному законодавстві України провідним методом вимірювання концентрації пилу в повітрі виробничих приміщень визначений *ваговий (гравіметричний)* метод. Використовують аспіратори різних конструкцій, забезпечені алонжем для закріплення спеціальних аерозольних фільтрів, наприклад, АФА-ВП (з перхлорвінілової тканини) діаметром 10 і 20 см; АФА-ХА (з ацетилцелюлозного фільтруючого матеріалу) діаметром 10 і 20 см.

Перед відбором проби повітря фільтри витримують в умовах приміщення 40-60 хв, зважують на електроаналітичних вагах, поміщають в пакетики з кальки і касети.

Тривалість відбору проби повітря залежить від ступеня його запиленості (як правило, не більше 30 хв), швидкість пропускання повітря 20  $\text{дм}^3/\text{хв}$ .

Після відбору проби повітря, фільтр знову витримується в вихідних умовах (температура, вологість), повторно зважується на тих же вагах, а отриманий результат і вміст пилу  $X$ ,  $\text{мг}/\text{м}^3$ , розраховується по формулі

$$X = \frac{(a - b) \cdot 1000}{V_0}, \quad (4)$$

де  $a$  – маса фільтру після протягання через нього повітря, мг;

$b$  – маса фільтру до простягання через нього повітря, мг;

$V_0$  – об'єм узятого для дослідження повітря, приведеного до нормальних умов,  $\text{дм}^3$ .

**Рахунковий метод** заснований на використанні предметного скла, вкритого клейкою речовиною (гліцерин, вазелін), яке поміщається горизонтально або вертикально в потік пилових частинок і через декілька хвилин (залежно від запиленості повітря) накривається покривним склом. Далі готовий препарат вивчається під мікроскопом з аналізом кількості пилинок, що осіли за певний період часу на скло відомої площі. Дисперсність пилу визначається мікроскопією просвітлених фільтрів АФА або препаратів, приготованих методом седиментації.

Фільтри АФА, використані для кількісного визначення пилу в повітрі, кладуть фільтруючою поверхнею на предметне скло, поміщають в скляну банку з підігрітим ацетоном і витримують декілька хвилин над парами

ацетону, внаслідок чого тканина фільтру швидко стає прозорою і тонким шаром фіксується на поверхні скла. Отриманий пиловий препарат розглядають через мікроскоп під великим збільшенням з використанням вставленого в окуляр мікроскопа окуляр-мікрметра, ціна ділення якого заздалегідь встановлюється за допомогою об'єктиву-мікрметра.

Переміщуючи препарат в різних напрямках, підраховують не менш ніж 100 частинок пилу. Отримані результати вносяться до таблиці, одночасно визначається відсоток часток з різним розміром.

Паралельно вивчається морфологія пилу, форма часток, характер країв та ін. Розрахунок кількості пилу у  $1 \text{ см}^3$  повітря,  $X$ , проводять за формулою

$$X = \frac{N \cdot S}{d \cdot h}, \quad (5)$$

де  $X$  – кількість часток пилу у  $1 \text{ см}^3$  повітря;

$N$  – сума часток пилу у полях зору;

$S$  – площа препарату у мікронах (якщо покривне скло розміром  $1 \times 1 \text{ см}$ , то площа дорівнює  $1 \text{ см}^2$ , що дорівнює  $100000000 \text{ мкм}^2$ );

$d$  – загальна площа, на якій були підраховані частки пилу;

$h$  – висота циліндру ( $5 \text{ см}$ ).

Наприклад, розміри сітки, встановленої в окуляр,  $17 \times 10 = 170 \text{ мкм}$ , площа сітки  $170 \times 170 = 28900 \text{ мкм}$ ; кількість підрахованих часток пилу дорівнює 250:  $d = 28900 \times 60 = 1734000 \text{ мкм}^2$  (вимірювання проводили у 60 полях зору)

$$X = \frac{250 \cdot 100000000}{1734000 \cdot 5} = 2883 \text{ пилинки/см}^3 \quad (6)$$

*Фотоелектричний* метод визначення запиленості базується на використанні фотоелектричних лічильників. З їх допомогою оцінюється кількість пилу в об'ємі повітря і ступінь його дисперсності.

Робота електролічильника заснована на принципі розсіювання світла окремими аерозольними частинками.

Завдяки кількісному зв'язку між розмірами частинок і інтенсивністю розсіяного світла проводиться аналіз за розмірами.

Прилад складається з аспіраційного пристрою, оптичного датчика, електричного блоку і дозволяє визначити концентрацію аерозольних частинок (від 1 до 300 000) в  $1 \text{ дм}^3$  повітря, а також їх дисперсійний склад розміром від 0,4 до 10 мкм.

*Електричний* метод заснований на створенні електростатичного поля, що діє на частинки пилу досліджуваного повітря. Маючи переважно

негативний заряд, під дією поля вони осідають на спеціальних пластинках-електродах, які через певний період часу очищаються з визначенням кількості пилу через зважування.

*Методи визначення біологічного забруднення повітря.*

У виробничому приміщенні 70-80 % мікрозабруднень припадає на людину, 15-20 % – на устаткування, 5-10 % – на навколишнє середовище.

Основним джерелом забруднень є людина. Це пояснюється структурою шкіри і динамікою її зміни. Зовнішній покрив шкіри людини складається з безлічі лусок розміром від декількох до декількох десятків мікрометрів. Вони постійно відділяються з поверхні шкіри таким чином, що кожні декілька днів зовнішній покрив повністю оновлюється. У нерухомому стані людина виділяє в хвилину близько 200 тис. частинок розміром 0,5 мкм і більше. При інтенсивному русі людина виділяє близько 10 млн. частинок за хвилину. В середньому людина виділяє близько 3,5 кг за рік або 10 г за добу. Інтенсивність виділень різко зростає при розмові.

Частинки, що відокремилися від людини, підхоплюються потоком повітря, розповсюджуються по всьому об'єму приміщення, осідають на устаткуванні, матеріалах, продукції і т.п.

Частинки можуть бути носіями мікроорганізмів; за статистикою на 1000 зважених частинок припадає один мікроорганізм. Це співвідношення носить приблизний характер, але воно дуже важливе, оскільки підрахунок частинок в повітрі проводиться швидко і легко, а аналіз мікробної забрудненості вимагає часу і витрат. Графік залежності між числом частинок в повітрі і мікробною забрудненістю приведений на рис. 5 (дані NASA).

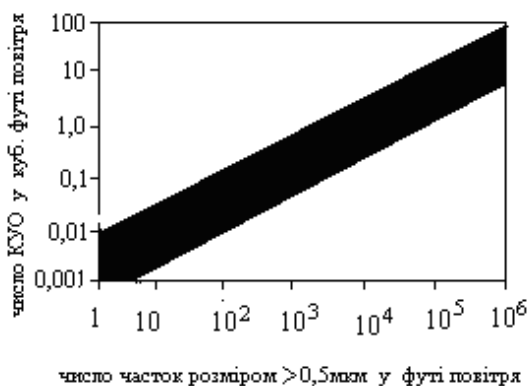


Рисунок 5 – Зв'язок мікробної забрудненості повітря і числа аерозольних частинок

Для контролю біологічного забруднення повітря використовуються прилади, засновані на інерційному, седиментаційному методах і методі фільтрації.

*Інерційний метод* заснований на осадженні частинок мікробного аерозолю з повітряного потоку на поверхню живильного агару з подальшою інкубацією (пророщуванням) мікроорганізмів, що осіли, в термостаті. Через певний час мікроскопічні частинки аерозолю дають на поверхні агару видимі оком колонії мікроорганізмів, число яких неважко підрахувати.

Конструкції приладів-пробовідбірників засновані на тому, що частинка аерозолю при набіганні на перешкоду (поверхня агару або рідини) не відхиляється від нього разом з повітрям, а за інерцією продовжує прямолінійний рух до зіткнення з перешкодою. Прилади, що використовують принцип інерційного осадження на тверді поверхні, називаються *імпакторами*. Вони бувають щілисті, ґратчасті, ротаційні. Імпактори дозволяють визначити число аерозольних частинок, що містять мікроорганізми, в пробі повітря певного об'єму. Аерозольні частинки характеризуються числом КУО. У *імпінжерах* осадження аерозольних частинок, що містять мікроорганізми, відбувається в рідині (фізіологічний розчин – 0,9 % NaCl у дистильованій воді). У рідині частинки дезагрегуються, у результаті виходить мікробна суспензія. Подальше розсівання на чашці Петрі і інкубація в термостаті також дає зростання колоній, проте колонія тут формується з однієї мікробної клітки, а не з агрегованих клітин, як в імпакторах. Таким чином, імпінжер дає уявлення про кількість мікробних клітин в пробі повітря. Недоліком є значна загибель клітин при контакті з фізіологічним розчином.

*Метод седиментації* полягає у визначенні мікробних частинок, що осідають на поверхні чашки Петрі з агаром. Метод не дає кількісної характеристики забруднення повітря, оскільки осідають лише частинки крупного розміру. Побічно цей метод характеризує забруднення поверхні.

*Приклад розрахунку.*

На чашці Петрі діаметром 9 см виросло 40 колоній (час вирощування 48 годин при 37 °С). Для підрахунку загальної кількості бактерій у 1 м<sup>3</sup> повітря кількість колоній, що виросли, множують на один з множників таблиці 3.

Таблиця 3 – Розрахунок числа бактерій в 1 м<sup>3</sup> повітря при експозиції 10 хвилин

Діаметр чашки, см	Площа чашки, см <sup>2</sup>	Множник
8	50	100

9	63	80
10	78	60
11	95	50
12	113	45

Таким чином, кількість мікроорганізмів у 1 м<sup>3</sup> повітря дорівнює  $40 \times 80 = 3200$ .

*Метод фільтрації.* Є два типи фільтрів: абсолютний, отвори в якому мають калібрований розмір, і об'ємний, що являє собою тонковолокнисту структуру з випадковим розподілом волокон (наприклад, желатин). Оцінка мікробної забрудненості проводиться шляхом мікроскопування або методом відбитків на живильне середовище. Недолік – загибель клітин при осадженні на поверхню фільтру. Останнім часом набув поширення метод *імунофлуоресценції*, що дозволяє за 1-4 години отримати інформацію не тільки про наявність патогенних мікроорганізмів в пробі, але і про їх видову приналежність. Метод зв'язаний з використанням реакції антиген-антитіло, в якій антитіла мічені флуоресцентними барвниками.

#### Контрольні запитання

1. Використання стерильного повітря в біотехнології.
2. Методи стерилізації повітря.
3. Основні джерела забруднення повітря.
4. Характеристика мікробних забруднень.
5. Технологічна схема отримання стерильного повітря.
6. Чисті приміщення. Ступінь чистоти.
7. Методи контролю забруднень.

Рекомендована література: [1] с. 40-45.

## 2 ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 2

Тема: Технологія та устаткування для проведення процесів біосинтезу.

Мета: Ознайомлення з технологічними особливостями процесу ферментації, а також з устаткуванням для її проведення.

### Основні теоретичні відомості

#### *2.1 Технологічні особливості процесу ферментації.*

Під ферментацією розуміють процеси вирощування мікроорганізмів для різних цілей. Способи культивування мікроорганізмів відрізняються великою розмаїтістю. Це пояснюється розходженням властивостей мікроорганізмів-продуцентів, які враховуються в першу чергу при створенні технології їхнього вирощування.

По технологічному оформленню розрізняють наступні мікробіологічні процеси:

- аеробне й анаеробне культивування;
- поверхневе й глибинне культивування;
- періодичне й безперервне культивування.

Найбільше поширення в промисловості одержав процес глибинного культивування аеробних мікроорганізмів у рідкому живильному середовищі, на якому необхідно зупинитися докладніше.

Вирощування різних аеробних мікроорганізмів у глибинних умовах має ряд загальних особливостей.

Процес культивування протікає у складних багатофазних системах: газ - рідина - тверде тіло (клітини). У якості твердої фази може бути й нерозчинне у воді джерело вуглецю (наприклад, n-парафіни).

Життєдіяльність мікроорганізмів пов'язана з виділенням теплоти, тому в процесі культивування необхідно протягом тривалого часу підтримувати постійну температуру в повному об'ємі культуральної рідини.

Оскільки процес вирощування мікроорганізмів має потребу у великій кількості кисню, а він має низьку розчинність у культуральній рідині, необхідно забезпечувати безперервну подачу й відвід з апаратів великих об'ємів повітря.

У процесі ферментації, як правило, утворюється стабільна піна, що є небажаним, і її необхідно руйнувати.

У багатьох випадках протягом усього процесу ферментації неприпустиме попадання сторонньої мікрофлори в апарат, тобто необхідно тривалий час підтримувати стерильність процесу.

Зазначені загальні особливості мікробіологічних процесів, а також деякі інші, специфічні для конкретних культур мікроорганізмів, ураховуються при розробці конструкцій спеціальних апаратів для ферментації - ферментаторів.

## *2.2 Конструкції ферментаторів*

Конструкція ферментатора повинна забезпечувати оптимальні умови для росту й життєдіяльності мікроорганізмів, які залежать від тепло- і масообміну.

Ферментатори являють собою закриті циліндричні посудини, постачені спеціальними пристроями: для подачі й диспергування повітря; для гомогенізації середовища; для піногасіння; для нагрівання й охолодження; запірною арматурою й контрольно-вимірними приладами.

Вибір конструкції ферментатора диктується як видом мікроорганізму-продуцента, так і кінцевим продуктом біосинтезу. За своїм призначенням ферментатори можуть бути лабораторними, напіввиробничими й промисловими. Принципово конструкції їх не різняться, але залежно від призначення ферментатори можуть мати різну місткість – від 0,001 м<sup>3</sup> до декількох сотень кубічних метрів. Основний матеріал для виготовлення ферментаторів - легвана сталь. Лабораторні апарати можуть бути виготовлені зі скла.

### *Установки для поверхневого культивування мікроорганізмів.*

При виробництві ферментів і органічних кислот дотепер широко застосовується культивування мікроорганізмів на поверхні рідких або сипучих середовищ. Культивування мікроорганізмів на сипучих середовищах (твердофазна ферментація) при виробництві ферментів здійснюється в кюветах, а також у різних механізованих установках. Схема однієї із сучасних установок для культивування в шарі сипучої сировини висотою 300-500 мм зображена на рисунку 6.

Апарат являє собою вертикальну посудину циліндричної форми з конічним днищем, постачену сорочкою й зміювиками для охолодження культури; усередині розділений на кілька секцій горизонтальними перфорованими пластинами.

Субстрат перемішується за допомогою лопатевих мішалок, встановлених у кожній секції на вертикальному валу. Засіяне живильне середовище завантажують через верхній люк, а готову культуру вивантажують через нижній люк. Культура подається з верхніх секцій на нижні шляхом періодичного перекидання перфорованих пластин на 90° навколо горизонтальної осі. У кожному секцію під перфоровані пластини надходить стерильне повітря.

Перемішування сипучого субстрату в даному апараті дозволяє вести процес культивування в шарі субстрату 300-500 мм, (при вирощуванні в кюветках 20-30 мм). Це істотно підвищує питому продуктивність.

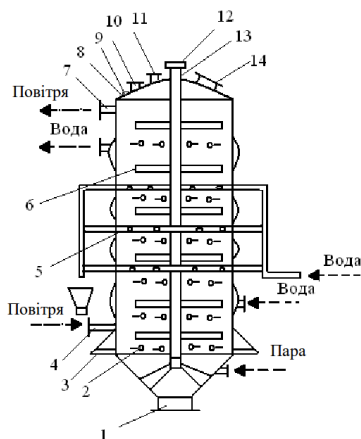


Рисунок 6 – Схема апарата для поверхневого вирощування мікроорганізмів:

1 - люк для вивантаження; 2 - валик секції; 3 - опора; 4 - колектор стерильного повітря; 5 - змійовик; 6 - лопата мішалки; 7 - колектор відпрацьованого повітря; 8 - кришка; 9 - бобишка манометра; 10 - штуцер; 11 - атмосферне повітря; 12 - шестірня привода вала; 13 - вал; 14 - люк для завантаження.

*Установки для глибокого культивування.*

Конструктивні розходження ферментаторів визначаються в основному способом підведення енергії й аерації середовища. По цьому принципу ферментатори можна розділити на три групи:

- ферментатори з підведенням енергії до газової фази;
- ферментатори з підведенням енергії до рідкої фази;
- ферментатори з комбінованим підведенням енергії.

Апарати для глибокого культивування мікроорганізмів з уведенням енергії аеруючим газом застосовуються дуже давно. Загальною рисою всіх апаратів цієї групи є відсутність елементів, що рухаються; культуральна рідина перемішується за рахунок енергії стисненого повітря, яке подають в апарат через барботер або інший пристрій. До ферментаторів з уведенням енергії газовою фазою відносять: барботинні, барботинно-ерліфтні, колонні й деякі інші.

Барботинні апарати являють собою посудину, у нижній частині якої встановлений газорозподільний пристрій - барботер, призначений для подачі повітря для аерації. При необхідності апарат оснащують теплообмінним пристроєм у вигляді охолодної сорочки для охолодження. Барботер може бути виконаний у вигляді тонкостінної трубки або системи трубок, у стінках яких є отвори діаметром 0,3-2 мм. Найпоширеніші типи барботерів зображені на рисунку 7.

Основний недолік барботинних апаратів – низька швидкість сорбції кисню [1-2 кг/(м<sup>3</sup>·год)]. Цей недолік частково усувається при використанні

апаратів колонного типу з великою висотою стовпа рідини. У них вище рушійна сила процесу масопередачі, збільшена інтенсивність мікро- і макроперемішування середовища пухирцями повітря, що приводить до зростання швидкості сорбції кисню.

Масообмінні характеристики барботинних апаратів істотно залежать від конструкції газорозподільного пристрою й властивостей ферментаційної рідини. З метою інтенсифікації масообмінних процесів барботинні ферментатори оснащують додатковими елементами: циркуляційними контурами, контактними пристроями та ін.

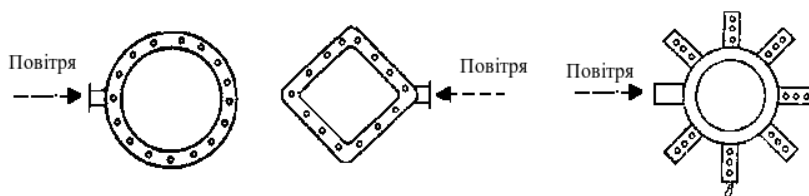


Рисунок 7 - Типи барботерів  
а - кільцевий; б - квадратний; в - променевий

#### *Барботинні апарати з контактними пристроями.*

Контактні пристрої являють собою нерухливі елементи різної форми (перегородки, тарілки та ін.). Вони призначені для збільшення поверхні контакту газової й рідкої фаз, отже, для підвищення швидкості масопередачі в системі газ - рідина й рідина - газ. Інтенсифікація процесу масопередачі в апаратах з контактними пристроями досягається за рахунок додаткового диспергування газових пухирців, формування раціональної структури потоків газорідинної емульсії, збільшення тривалості перебування пухирців газу в рідині й ін.

#### *Апарати з дифузором (ерліфтним аератором).*

Найбільш широко поширені з апаратів цієї конструкції дріжджерастильні апарати конструкції Лефрансуа (рис. 8).

Ферментатор має внутрішній циліндр – дифузор, що забезпечує циркуляцію рідини. Повітря по повітропроводу подається через щілини кільцевого аератора, а живильне середовище в кювету, розташовану над аератором. Плівка рідини, переливаючись через край кювети, зустрічається з потоком повітря, що виходить із щілини аератора. У результаті утворюється пінна емульсія, щільність якої менше щільності рідини, і вона піднімається нагору по дифузори. Угорі частина повітря відділяється від емульсії пінної й виводиться з апарата. Рідина разом з піною, що залишилася, рухається униз по кільцевому просторі між корпусом апарата й дифузором. Відвід теплоти здійснюється охолодженням зовнішньої стінки. Перевагою конструкції є те,

що у ферментаторі немає механічного перемішування й механічного піногасіння. До недоліків можна віднести досить високі витрати повітря.

Апарати даної групи широко експлуатуються в дріжджовому виробництві, а також у виробництві амінокислот і антибіотиків.

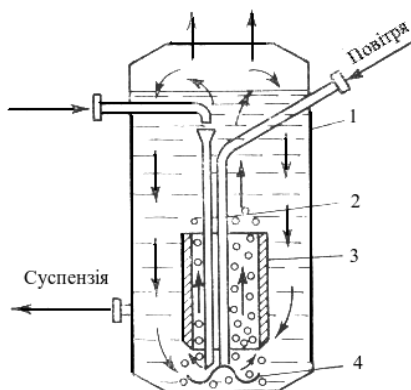


Рисунок 8 - Ферментатор системи Лефрансу

1 - корпус апарата; 2 - повітропровід; 3 - дифузор; 4 - кювети.

*Трубчастий ферментатор (гідроневматичний)* складається з реактора кожухотрубного типу й сепаратора, з'єднаних між собою циркуляційними трубами (рисунок 9).

У нижній частині реактора є повітряна камера, куди подається стиснене повітря. З повітряної камери повітря надходить у трубки-барботери діаметром 4 мм і рухається з великою швидкістю нагору по трубах діаметром 56 мм разом з рідиною, що захоплюється їм. У верхній камері реактора частина повітря відділяється від рідини й виводиться з реактора, а рідина опускається униз по тим трубам, у які повітря знизу не надходить.

Піна з верхньої частини реактора надходить у сепаратор, де гаситься відцентровим піногасником. Рідина, що утворилася в результаті гасіння піни, проходячи через циркуляційні труби, вертається до низу реактора, де знову захоплюється повітрям і піднімається нагору. У результаті у ферментаторі створюються два контури циркуляції - зовнішній і внутрішній.

У міжтрубний простір реактора подається вода для охолодження.

Перевагою конструкції є відсутність застійних зон, однорідна турбулентність у всіх трубах, герметичність.

### *Ферментатор з форсунковим розподілом повітря*

Основна конструктивна особливість апаратів - це форсунки для подачі стисненого повітря. Форсунки кріпляться в днище апарата, а над форсункою встановлюється дифузор (рисунок 10). Повітря, виходячи з форсунки з певною швидкістю, диспергується в культуральній рідині. Більш легка повітряно-рідинна емульсія піднімається нагору по дифузорі, де частина повітря відділяється від рідини, яка, маючи більшу щільність, опускається униз по просторі між стінками корпуса й дифузором. За рахунок руху струменя повітря біля отворів форсунок створюється розрідження, що забезпечує підсмоктування свіжих порцій культурального середовища.

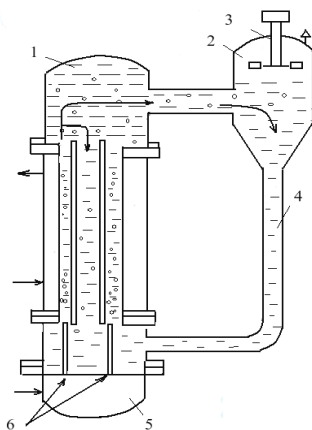


Рисунок 9 – Гідропневматичний ферментатор  
1 - реактор кожухотрубний;  
2 - сепаратор; 3 - механічний піногасник; 4 - циркуляційна труба; 5 - повітряна камера.

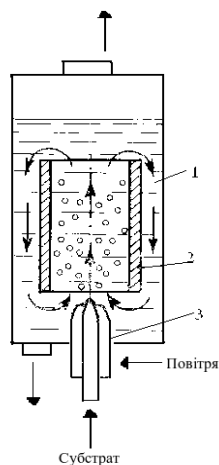


Рисунок 10 – Ферментатор з форсунковим розподілом повітря  
1 - корпус апарата; 2 - дифузор;  
3 - форсунка.

Різновидом таких апаратів є ферментатори з конічним днищем, що мають одне або кілька отворів для установки сопла або форсунки. Ці ферментатори одержали назву сопло-конусних. Стиснене повітря подається через сопло й диспергується в культуральній рідині. Біосинтез протікає в таких апаратах в основному в пінному шарі. Сопло-конусні ферментатори входять у комплект лабораторних установок для культивування мікроорганізмів.

*Ферментатор колонного типу* являє собою циліндричну колону, розділену горизонтальними перегородками на секції (рисунок 11). Кожна секція може мати самостійну систему охолодження, контролю. Основне розходження між ферментаторами такого типу полягає в конструкції перегородок, які називають тарілками. Тарілки можуть бути плоскими або сегментними, ситчастими, ковпачковими, з радіальними щілинами та ін.

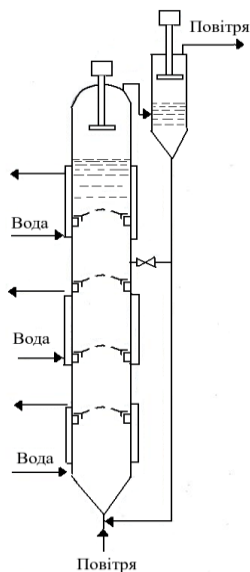


Рисунок 11 - Колонний ферментатор

Повітря, що подається в низ колони, збирається під кожною тарілкою й барботує через шар рідини на тарілці. Культуральна рідина перетікає униз по кільцевій щілині між бортом тарілки й корпусом апарата. У такий спосіб створюється протиток руху повітря й рідини.

На кожній тарілці досягається відновлення поверхні контакту фаз.

Колонні апарати широко застосовуються для процесів безперервного культивування.

*Ферментатор з добавками гранулята* являє собою циліндричну посудину, яка заповнена гранулятом - твердими частками певного розміру (рисунок 12). Повітря під тиском подається знизу через круговий барботер.

Живильне середовище і циркулююча культуральна рідина також подаються до низу апарата. Повітря, виходячи з барботера, захоплює за собою рідину й частки гранулята.

Пухирці повітря, зіштовхуючись із твердими частками гранулята, руйнуються, у результаті чого в цих мікрообластях спостерігається падіння швидкості плинину рідини, а мікроорганізми, що втримуються в них, постійно

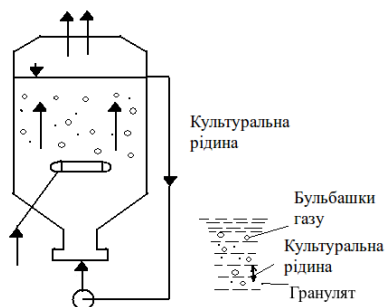


Рисунок 12 - Ферментатор з добавками гранулята

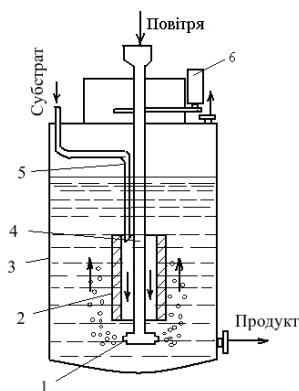


Рисунок 13 - Ферментатор із самоусмоктувальною системою аерації

1 - порожні лопати аератора; 2 - дифузор; 3 - корпус апарата; 4 - повітряпровід; 5 - труба подачі субстрату; 6 - привод мішалки.

вступають у контакт зі свіжим живильним розчином. Гранулят повинен бути хімічно інертним, мати певну щільність, ударостійкість та ін. У ферментаторах із гранулятом накопичується більше біомаси, чим у ферментаторах без добавок.

#### *Ферментатори з підведенням енергії до рідкої фази*

Ферментатором цього типу є апарат із самоусмоктувальною турбіною.

У корпусі апарата встановлений циліндричний дифузор, а під ним з невеликим зазором мішалка у вигляді закритої турбіни з радіально розташованими порожніми лопатами (рисунок 13). Турбіна (рисунок 14) насаджена на порожній трубчастий вал, верхній кінець якого сполучається з повітряним простором над ферментатором. Завдяки обертанню усередині лопат мішалки створюється розрідження, і повітря засмоктується через порожній вал з верхньої частини апарата або зовні.

Самоусмоктування достатньої кількості повітря досягається при глибині рідини не більше 1,5-2 м.

Самоусмоктувальний аератор одночасно перемішує рідину.

Рідина разом з піною

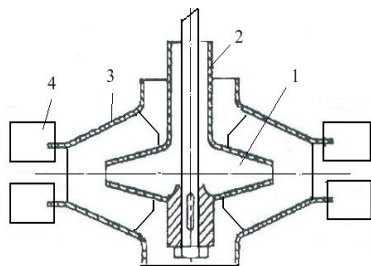


Рисунок 14 - Самоусмоктувальна мішалка

- 1 - повітряна порожнина;  
2 - патрубок для підводу повітря;  
3 - турбіна; 4 - лопатки.

*Струминний ферментатор* також можна віднести до апаратів з підведенням енергії до рідкої фази, тому що енергія витрачається на роботу насоса, що подає рідину у верх апарата.

Ферментатор являє собою колону, у корпусі якої розташовані одна над одною секції, з'єднані зливальними трубами (рисунок 15). Культуральна рідина циркуляційними насосами подається у верхню секцію колони й по зливальних трубах стікає в нижче розташовану секцію. При русі струменя рідини створюється розрідження, за рахунок чого захоплюється повітря, що надходить через газувідну трубу. Повітря разом зі стікаючою рідиною надходить у нижню секцію. Завдяки цьому досягається висока турбулентність, тонка дисперсія газу, тривале перебування газу в середовищі. Ферментатори такої конструкції можуть бути досить великого об'єму.

#### *Апарати з комбінованим підведенням енергії*

У ферментаторах цього типу енергія підводиться до рідкої фази за допомогою пристрою, що перемішує, і до газової фази шляхом примусової подачі повітря. Такі апарати мають гарні характеристики масообміну, і в них можна порівняно легко варіювати режим перемішування й масообміну. Вони найбільше широко застосовуються у виробництві продуктів мікробного метаболізму (амінокислот, ферментів, антибіотиків), рідко - у виробництві кормових дріжджів.

На рисунку 16 зображений такий ферментатор об'ємом 100 м<sup>3</sup>.

відкидається до периферії й піднімається нагору між стінками дифузора й апарата й переливається через верхній край дифузора. Теплота відводиться охолоджувальною водою, що пропускається через установлені в апараті змієвики. Якщо в промислових апаратах висота рідини в апараті більше 2 м, то повітря подається примусово вентилятором або компресором.

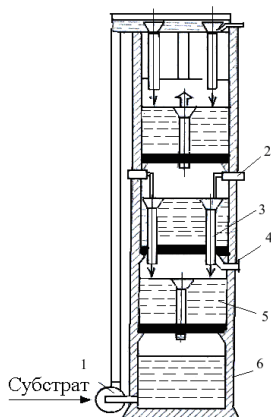


Рисунок 15 - Струминний ферментатор

1 - циркуляційний насос; 2 - газоувідна труба; 3 - зливальна труба; 4 - патрубок скидання повітря; 5 - секція; 6 - корпус колони.

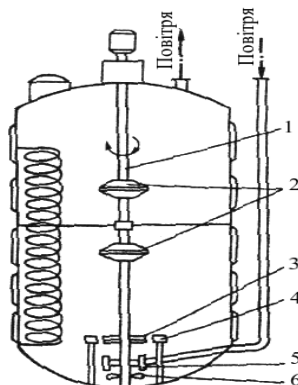


Рисунок 16 - Схема ферментатора з комбінованим підведенням енергії

1 - вал; 2,3,6 - мішалки; 4 - статор; 5 - барботер.

Це циліндрична посудина з розділеною на секції охолоджувальною сорочкою й зміювиками для відводу теплоти, що утвориться при рості мікроорганізмів. На кришці апарата встановлений електродвигун потужністю 120/180 кВт із редуктором. На валу встановлені чотири мішалки різних типів. Унизу, у самого днища ферментатора, розташована мішалка пропелерного типу, трохи вище - закрыта турбінна мішалка із криволінійними лопатами й статором, а потім - дві закрыті турбінні мішалки із прямими лопатами. Повітря подається в апарат примусово через трубчастий барботер знизу.

Ферментаційна рідина в такому апараті переміщується за допомогою мішалки й пухирців поступаючого через барботер повітря, що рухаються нагору.

Мішалки забезпечують також додаткове диспергування повітря, сприяючи збільшенню поверхні контакту фаз і коефіцієнта масопередачі. Змінюючи частоту обертання мішалки (у даному апараті 2 або 3 с<sup>-1</sup>) і витрати подаваного повітря, можна в досить широких межах варіювати швидкість масопередачі.

#### Контрольні запитання

1. Технологічні особливості процесу ферментації
2. Установки для поверхневого культивування мікроорганізмів.
3. Барботинні апарати з контактними пристроями
4. Апарати з дифузором (ерліфтним аератором)
5. Трубчастий ферментатор (гідропневматичний).
6. Ферментатор з форсунковим розподілом повітря
7. Ферментатор колонного типу.
8. Ферментатор з добавками гранулята.
9. Ферментатори з підведенням енергії до рідкої фази
10. Апарати з комбінованим підведенням енергії

Рекомендована література: [1] с. 45-54.

### 3 ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 3

Тема: Методи виділення, очищення і концентрування продуктів біосинтезу.

Мета: Ознайомитися з методами виділення, очищення і концентрування продуктів біотехнології, обладнанням і контролем якості готового продукту.

#### Основні теоретичні відомості

Після закінчення процесу ферментації культуральна рідина містить мікроорганізми або продукти їх метаболізму, залишки живильного середовища, піногасники, тощо. Кількість продукту у культуральній рідині, як правило, становить від 1 до 30 г/дм<sup>3</sup>.

Продукти мікробіологічного синтезу випускаються у трьох основних препаративних формах:

- концентрати – зневоднена культуральна рідина, яка містить біомасу (кормові концентрати, вітаміни, антибіотики та ін.);
- зневоднена мікробна біомаса (дріжджі, бактеріальні добавки та ін.);
- технічні або очищені препарати ферментів, антибіотиків та ін.

Практично завжди спершу треба відділити біомасу від культуральної рідини. Це пов'язано з переробкою великих об'ємів суспензій, що важко фільтруються. Для цього використовують *сепарацію, фільтрацію і флотацію*.

Для прискорення фільтрації іноді додають флокулянти, або спеціальні фільтрувальні порошки, які утворюють на поверхні фільтруючого матеріалу ґрунтовий фільтруючий шар.

*Виділення продуктів* із культуральної рідини проводять наступними методами:

- дистиляція (отримання етанолу, ацетону, бутанолу);
- випаровування з наступним сушінням (кормові концентрати, кормові антибіотики);
- ліофільна сушка (закваски, вакцини, бактерійні препарати);
- осадження у вигляді солі (лимонна, молочна кислоти), або за допомогою органічних розчинників (ферменти, білки, антибіотики);
- екстракція (антибіотики, вітаміни);
- сорбційні методи (ферменти, антибіотики, амінокислоти);
- мембранні методи (ферменти, білки)

Якщо цільовий продукт знаходиться всередині клітин, проводять їх дезінтеграцію фізичним або ферментативним методами.

Фізичне руйнування клітин здійснюють: за допомогою ультразвуку; за допомогою лопатей, що обертаються, або вібраторів; продавленням кріз вузькі отвори під тиском; за допомогою гомогенізаторів.

Більш обережне руйнування клітинних оболонок можливе при використанні літичних ферментів. Потім клітинні оболонки відділяють центрифугуванням.

#### *Засоби сушки продуктів біосинтезу.*

Умови сушки, а отже і сушильне обладнання обирають залежно від того, чи треба зберегти життєздатність мікроорганізмів, тому що під час зневоднення у клітині відбуваються незворотні зміни, що можуть призвести до втрати життєздатності мікробних клітин.

У даний час для сушки продуктів біосинтезу застосовують сублимаційні сушарки, вихрові, розпилювальні, з киплячим шаром, та ін.

*Сублимаційне (ліофільне) сушіння* найбільш придатне для ферментів, антибіотиків та інших термолабільних продуктів біосинтезу, у цьому разі вони менше інактивуються і добре зберігається життєздатність клітин.

Проведення сублимаційної сушки під вакуумом (остаточний тиск 0,1-10 кПа) дозволяє значно знизити температуру процесу і тим зберегти клітинні структури в життєздатному стані. Сублимаційна сушка складається з кількох послідовних етапів: підготовки біомаси, замороження, сублимаційної сушки.

#### *Підготовка біомаси.*

Сублимаційний сушці піддають концентрат суспензії мікроорганізмів, який отримують з культуральної рідини одним з механічних засобі зневоднення (фільтрацією, центрифугуванням і т.п.). В отриману суспензію додають захисне середовище, яке захищає клітини від загибелі при заморожуванні і подальшому сушінні. У якості захисного середовища використовують колоїдні і гідрофільні речовини (білки, амінокислоти, вуглеводні та ін.), які уповільнюють внутрішньоклітинне утворення льоду, зменшують концентрування електролітів і захищають клітини від глибокого незворотного зневоднення.

#### *Заморожування.*

Це найбільш відповідальний етап в технології сублимаційної сушки, тому що заморожування біомаси призводить до фізичних, біофізичних і біохімічних змін в клітинах. Внаслідок кристалоутворення при заморожуванні може статися пошкодження і руйнування клітинних мембран та інших структур клітин. Щоб запобігти цьому підбирають оптимальні умови кристалізації води: заморожування проводять швидко при температурі від мінус 20 до мінус 30 °С і інтенсивній циркуляції охолодженого повітря. В цьому разі великі кристали льоду не утворюються.

#### *Засоби заморожування:*

- контактне на охолоджуваних полицях;
- конвективне охолодженням газом;
- комбіноване (контакт і вентиляція);

- кондуктивне зануренням у охолоджену вану.

Вибір засобу залежить від властивостей мікроорганізмів, які піддають сушінню.

*Сушка.*

Сублімаційну сушку здійснюють періодичним засобом у сублімаційних камерах (субліматорах), що являють собою герметичні металеві горизонтальні циліндричні апарати.

На рисунку 17 зображена схема сублімаційної установки періодичної дії. Продукт, що висушується, розміщують на полках субліматора. Усередині полиць циркулює за допомогою насоса теплоносія, що охолоджує полки при заморожуванні продукту або нагріває їх у період сушіння. Вакуум-насос створює необхідний вакуум і відкачує парогазову суміш із субліматора. Конденсація пари води відбувається в льодоконденсаторі 5, куди подається холодоагент від холодильної установки 7.

Процес сушіння методом сублімації льоду у вакуумі складається із двох періодів. У першому, коли видаляється вільна вода, сушіння протікає з постійною швидкістю, а в другому при видаленні зв'язаної води (10-15 %, що залишилися) швидкість сушіння падає. Перший період сушіння проводять при досить низьких температурах від мінус 8 до мінус 12 °С, а в другому періоді температуру поступово підвищують до температури навколишнього середовища.

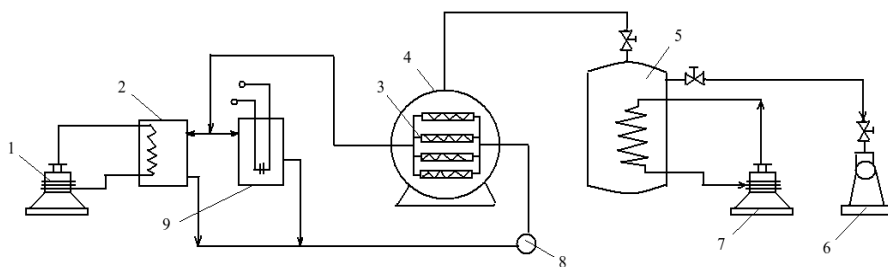


Рисунок 17 – Сублімаційна установка періодичної дії

1,7 – холодильні установки; 2 – бак для охолодження теплоносія; 3 – плити; 4 – субліматор; 5 – льодоконденсатор; 6 – вакуум-насос; 8 – насос; 9 – бак для нагрівання теплоносія.

У деяких випадках для видалення останніх 2 % води продукт витримують при 60-70 °С, що вкрай негативно позначається на його якості.

Після сублимаційного сушіння продукт направляється на фасування й упакування, способи яких вибирають залежно від призначення й товарної форми біопрепарату.

Останнім часом все більше поширення одержують сублимаційні сушарки безперервної дії.

Процес сублимаційного сушіння є досить енергоємним і дорогим, але він незамінний у виробництві ряду біопрепаратів, особливо для медичних і ветеринарних цілей.

*Конвективні засоби сушки* застосовують для зневоднення біомаси на виробництві дріжджів, молочнокислих бактерій, біопрепаратів. Конвективна сушка у нерухомому шарі іде повільно. У таких умовах відбувається інактивація клітин.

*Розпилювальна сушка* внаслідок швидкості процесу значно менше впливає на життєздатність клітин.

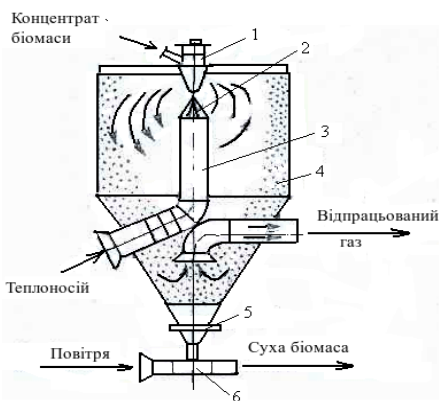


Рисунок 18 – Сушарка з відцентровим розпиленням

1 – відцентровий розпилювальний механізм; 2 – спрямовуючий апарат; 3 – газопровід для теплоносія; 4 – сушильна камера; 5 – затвор для збору продукту; 6 – труба пневмотранспорту.

На рисунку 18 наведена схема розпилювальної сушарки.

Розчин або суспензія розпилюються спеціальним пристроєм (1) у сушильній камері (4) і змішуються з теплоносієм. Процес протікає з великою швидкістю і процеси, які при інших видах сушки негативно впливають на якість термолабільних продуктів, виявляються значно менше. Термін сушки складає 15-30 секунд, максимальна температура часток у зоні сушки не перевищує 40-60 °С.

До недоліків розпилювальних сушарок слід віднести великі габаритні розміри, складність механізмів в розпилюванні і значну вартість.

### Контрольні запитання

1. Класифікація продуктів біосинтезу, які отримують після сушки.
2. Класифікація сушарок.
3. Причини втрати життєздатності клітин під час сушки.
4. Засоби сушки біопрепаратів для збереження життєздатності клітин.
5. Етапи сублімаційної сушки.
6. Переваги та недоліки сублімаційної сушки.
7. Конвективні методи сушки.
8. Принцип роботи розпилювальної сушарки.
9. Переваги і недоліки розпилювальної сушарки.

Рекомендована література: [1], с. 62-85; [3], с. 28-51.

#### 4 ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 4

Тема: Виробництво ферментів.

Мета: Вивчення засобів отримання і очистки ферментів, а також методів і іммобілізації ферментів

##### Основні теоретичні відомості

Виробництво ферментів має деяку специфіку в порівнянні з іншими мікробіологічними процесами. По-перше, потрібно ретельне дотримання стерильності, оскільки продукт, що утворився, - фермент, на відміну від кислот, спиртів, вітамінів і антибіотиків, не пригнічує мікрофлору. По-друге, біосинтез ряду ферментів пригнічується катаболічною репресією. Нарешті, для продуктів представляють небезпеку протеази. Ці особливості враховують при селекції штамів продуцентів, а також при складанні поживних середовищ і реалізації процесу ферментації.

##### *Основні методи забезпечення асептичних умов.*

Методи, вживані для унеможливлення попадання в культуру сторонньої мікрофлори, ґрунтовані або на затримці, або на знищенні мікроорганізмів. До методів, ґрунтованих на першому принципі, можна віднести стерилізуючу фільтрацію повітря і рідин (розчинів поживних середовищ), а також герметизацію технологічного устаткування і комунікацій. До методів, ґрунтованих на знищенні мікроорганізмів, відноситься термічна, хімічна і радіаційна стерилізація. У біотехнології ферментів найбільш поширена термічна стерилізація. Вона застосовується для стерилізації устаткування і комунікацій, поживних середовищ і технологічних розчинів, для створення теплових бар'єрів, що перешкоджають проникненню мікроорганізмів в апарат під час відбору проб, внесення посівного матеріалу і добавок. В якості стерилізуючого агента при термічній стерилізації зазвичай використовують насичену водяну пару різного тиску і температури. Хімічну стерилізацію застосовують зазвичай для тих елементів устаткування, які не витримують нагрівання до температури 110-130 °С, необхідної для стерилізації (датчики, фільтри для повітря і рідини). Агентами хімічної стерилізації служать формальдегід, етиленоксид,  $\beta$ -пропіонова кислота та ін.

Фільтуючу стерилізацію використовують в основному для повного затримання мікроорганізмів із застосуванням фільтрів глибинного типу.

Промислове виробництво ферментів мікробіологічного синтезу здійснюють твердофазним і глибинним способами.

Твердофазне (поверхневе) культивування здійснює в кюветах на твердих або напівтвердих середовищах. Наприклад, у виробництві грибною амілази суміш пшеничних висівок і крохмалю розподіляють тонким шаром в кюветах, зволожують мінеральним розчином, що містить невелику кількість хлоридної кислоти. Кювети стерилізують під тиском 0,15 МПа впродовж години.

У охоложене до 35 °С поживне середовище засівають суспензією спор *Aspergillus oryzae*. Через 72-80 годин інкубації в камері при температурі 30 °С розвивається маса утворюючого міцелія, який висушують і подрібнюють для отримання сирової амілази або екстрагують для отримання очищеної амілази.

Отримання очищених ферментів здійснюють використанням методів виділення і очищення біологічно активних речовин (див. [1], с. 62).

Метод афінної хроматографії полягає в тому, що між одним або обмеженим числом білків-ферментів у суміші і полімерним сорбентом утворюється досить стабільний зв'язок, внаслідок чого ці білки з розчину переходять на нерозчинний сорбент. Чим менше білків зв'язує сорбент, тим вище його селективність.

Висока селективність біоспецифічних сорбентів забезпечується тим, що у якості лігандів використовуються речовини, що специфічно взаємодіють з активним центром ферменту, що виділяється.

В цьому відношенні придатніші прості синтетичні аналоги субстратів або коферментів. Для створення афінних сорбентів промислового застосування вони дуже перспективні через дешевизну та доступність.

Другим компонентом біоспецифічного сорбенту являється полімерна матриця, до якої приєднується ліганд. Матрицею може бути будь-який полімер; який має крупнопористу структуру гелю, що дозволяє великим молекулам ферментів проникати всередину структури і взаємодіяти з розташованими там центрами зв'язування; гідрофільність структури, що забезпечує хорошу взаємодію її з водою і відсутність неспецифічного зв'язування білків по гідрофобних центрах; відсутність в структурі заряджених груп, утворення неспецифічних електростатичних зв'язків, що виключає; здатність полімеру легко активуватися певними хімічними агентами; достатня хімічна, механічна і мікробіологічна стійкість, що забезпечує стабільність під час роботи сорбенту.

Вказаним вимогам якнайповніше відповідають агарози, синтетичні полімери – поліакрилати, полістироли, а також багатопористе скло і силікагелі.

Зазвичай хроматографічний процес складається з етапів сорбції, видалення несорбованих білків і елюації сорбованих ферментів, що послідовно змінюються. Умови сорбції підбираються так, щоб фермент, що

виділяється, сорбувався якнайповніше, а супутні білки по можливості не затримувалися. Це залежить від рН, іонної сили і природи буферних розчинів, температури. Після відмивання сорбенту від несорбованих білків різко змінюється один, або декілька з вказаних параметрів, внаслідок чого і руйнується комплекс ферменту з сорбентом, і фермент вивільняється.

Афінна хроматографія характеризується високим виходом і ступенем очищення ферменту, що виділяється.

Майже усі схеми очищення ферментів включають стадію хроматографування на целюлозних іонообмінниках. Для технологічного застосування особливо привабливі гранульована целюлоза, гідродинамічні властивості якої дозволяють проводити хроматографічні процеси з великою швидкістю.

Суміш білків має бути підготовлена теж ретельно. Для цього проводиться діаліз і ультрафільтрація.

Фракціонований розчин білків наноситься на іоніт, де розподіляється на дві фракції. Білки, заряд яких не дозволяє їм в обраних умовах утворити стабільний зв'язок з сорбентом, залишаються в рідині, що рухається, і видаляються з колонки при її промиванні стартовим буфером.

Після повного видалення з колонки несорбованих білків починається елюація сорбованих ферментів.

Після вимивання з колонки функціонально активних білків елюація припиняється.

Для очистки ферментів застосовують *електрофорез*, основою якого полягає розділення кислих і основних молекул білків за їх зарядами у електричному полі електрофоретичного апарату.

У методі електрофорезу в потоці рідка фаза рухається перпендикулярно напрямку електричного поля, що дозволяє здійснювати безперервну взаємодію. При електрофорезі на папері або в гелі на рух молекул речовин впливають процеси адсорбції і десорбції, а також опір дифузії в пористий носій або гель.

Сушка є кінцевою стадією виробництва ферментів мікробіологічного синтезу, іноді її застосовують як проміжний процес при отриманні високоочищених препаратів.

Для сушки біологічних об'єктів застосовують різноманітні методи і установки. Вони розрізняються по агрегатному стану вологи і висушуваного матеріалу (сушка з рідкого стану або з твердого), а також за способом підведення теплоти (контактна, конвективна і радіаційна).

Вибір методу сушки залежить від виду початкового матеріалу (концентрований розчин, паста, суспензія), його вологості, термолабільності і так далі. Найбільші труднощі виникають зазвичай при висушуванні живих мікроорганізмів у виробництві ферментів.

При контактній сушці матеріал нагрівається в результаті безпосереднього зіткнення з гарячими поверхнями (плитами, вальцями і тому подібне). На цьому принципі працюють шафові і вальцеві сушарки. Проте вони мало придатні для сушки ферментів і мають ряд недоліків.

В процесі конвективної сушки теплота підводиться до висушуваного матеріалу за допомогою газоподібного висушуючого агента - теплоносія, який служить і для відведення вологи, що випаровується. Цей метод найширше застосовують у біотехнології, і він лежить в основі роботи розпилювальних, аерофонтанних сушарок і сушарок з киплячим шаром.

При радіаційній сушці теплота передається від нагрітого джерела до висушуваного матеріалу за допомогою інфрачервоного випромінювання. Цей метод застосовується при сублімаційній сушці концентрованих розчинів і суспензій.

#### *Імобілізація і стабілізація ферментів.*

Імобілізація ферментів - це підвищення стабільності ферментів. Як відомо, в клітинах ферменти знаходяться зазвичай не в розчиненій формі, а прикріплені до певних структур і локалізовані в органелах. Це пов'язано з тим, що ферменти не дуже стабільні з'єднання: при дії ряду фізичних і хімічних чинників можуть інактивуватися. Це має місце і при отриманні ферментів мікробіологічним шляхом. Після досягнення у ферментаторі максимальної активності ферментів, необхідно якнайшвидше організувати їх виділення. Причиною зниження активності можуть бути протеази, які виділяються в середовище при автолізі клітин продуцента, або мікроорганізми, що утилізують фермент.

При використанні ферментних препаратів для каталізу різних реакцій вільні ферменти досить чутливі до температури середовища, рН, наявності різних речовин. Дія цих чинників може денатурувати білок. Крім того, вільні ферменти можуть бути використані лише один раз, і їх ціна досить висока.

Досягнення молекулярної біології сприяли детальному вивченню будови багатьох ферментів. Був розкритий амінокислотний склад ряду ферментних білків, їх просторова конфігурація, виявлені активні центри, значення різних функціональних груп в прояві каталітичної активності ферменту. Це дозволило створити теоретичну базу для виробництва ферментів пролонгованої дії або, як їх називають, іммобілізованих, фіксованих, або зв'язаних ферментних препаратів. Суть іммобілізації ферментів - прикріплення їх в активній формі до нерозчинної основи, включення в гель або в напівпроникну мембранну систему.

Методи іммобілізації ферментів можна розділити на дві групи: включення в гель мікрокапсули; зв'язування з носієм адсорбційним або ковалентним зв'язком. Найчастіше використовувані методи іммобілізації

ферментів показані на рисунку 19. Схеми б) і е) відносяться до першої групи, інші - до другої.

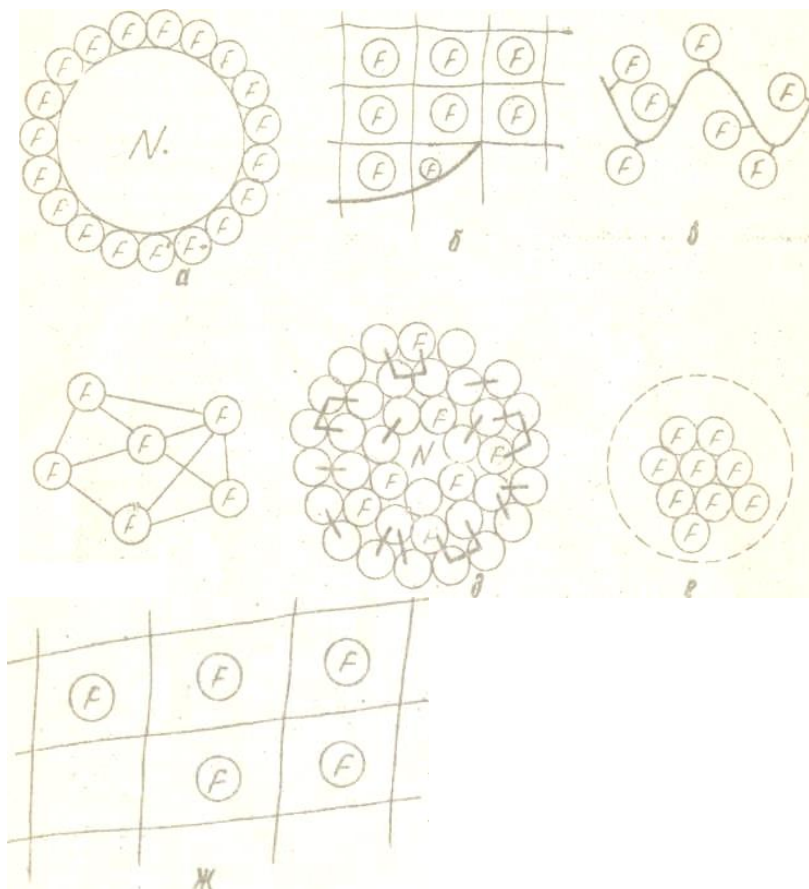


Рисунок 19 – Методи іммобілізації ферментів

Допускається прикріплення ферменту тільки за допомогою функціональних груп, що не входять в активний центр і не беруть участь в утворенні фермент-субстратного комплексу. Носій ферменту, або матриця, може мати вигляд зернистого матеріалу, волокнистої структури, пластинчатої поверхні, плівок або тканин, порожнистих волокон, трубочок, капсул і так

далі. Має значення розмір часток носія, важливо, щоб він мав велику поверхню, тому рекомендується використовувати невеликі частки діаметром 0,1-0,2 мм. Носій ферменту може бути як природною речовиною, так і синтетичним полімером. Для іммобілізації широко застосовують целюлозу і її похідні - кислу карбоксиметилцелюлозу і ацетилетилцелюлозу та ін. У воді целюлоза набрякає і її гідроксильні групи приєднують ділянки молекули ферменту.

Процес іммобілізації ферменту можна продемонструвати на прикладі зв'язування глюкоамілази з носієм ацетилетилцелюлози. Носій спочатку витримують протягом доби в очищеній воді для набрякання. Потім при перемішуванні до набряклої ацетилетилцелюлози додають спочатку натрій-ацетатний буфер (рН 5,53), потім - розчин очищеного ферменту. Після перемішування вносять агент, що зшиває, - глутаровий альдегід. Останній утворює амідний зв'язок між аміногрупою носія і карбоксильною групою ферментного білку. Через декілька годин отриманий препарат промивають послідовно натрій-ацетатним буфером і розчином натрію хлориду для видалення сорбованого на носії білку. Іммобілізований таким чином фермент зберігають під шаром води або буфера при 3-5 °С.

Ферменти можна прикріплювати до поверхні носія шляхом сорбції до іонітів; до катіонітів (що містить активні кислотні групи) або до аніонітів (що містить переважно основні групи).

В якості сорбентів - носіїв ферментів часто використовують гель алюміній(III) гідроксиду або фосфату кальцію, діатоміт, модифікований крохмаль, бентоніт, кізельгур та ін. Сорбцію ферментів здійснюють або в колонках шляхом пропускання розчину ферменту з певною швидкістю через шар іоніту, або в реакторах, в яких сорбент певний час перемішують з розчином ферменту. Отриманий продукт потім використовують як іммобілізований ферментний препарат. Адсорбція ферменту на носії не забезпечує тривалої стабілізації. Тривалішу стабілізацію забезпечує іонообмінне зв'язування ферменту, наприклад, на модифікованій іонообмінній целюлозі.

Широке поширення знаходять різні методи включення ферменту в гель. В процесі полімеризації гелю молекули ферменту зв'язуються на невеликих відстанях, і тоді фермент виявляється включеним усередині осередків гелю. Розміри пір гелю мають бути менше розміру молекул ферменту, але вони не повинні перешкоджати доступу субстрату до ферменту. Для іммобілізації ферменту і цілих клітин мікроорганізму широко використовують поліакриламідний гель, альгінат кальцію, крохмаль та ін.

Нині розроблені методи іммобілізації великої кількості ферментів. Деякі з них приведені нижче.

Адсорбція або іонний обмін	– Кatalаза Рибонуклеаза Пепсин Тріпсин Аспарагіназа
Включення в гель	– Лактатдегідрогеназа Глюкооксидаза Пероксидаза Гексокіназа Рибонуклеаза Холінестераза $\alpha$ -Амілаза Тріпсин Альдолаза
Поперечне "зшивання" з носієм	– Лактатдегідрогеназа Глюкооксидаза Пероксидаза Рибонуклеаза Дезоксирибонуклеаза Тріпсин Аденозинтрифосфатаза Альдодаза
Прикріплення до носія ковалентним зв'язком (азидний метод)	– Рибонуклеаза холінестераза Дезоксирибонуклеаза Інвертаза Тріпсин Аспарагіназа Аденозинтрифосфатаза
Ізотіоціанатний метод	– $\alpha$ -Амілаза Тріпсин

Як видно з цих прикладів, один і той же фермент можна іммобілізувати декількома методами. Так, лактатдегідрогеназу можна включити в гель, прикріпивши до носія поперечним зшиванням; аспарагіназу - прикріпити до носія сорбційним шляхом або хімічним, (ковалентним) зв'язком і так далі.

Нині налагоджений промисловий метод фізичної іммобілізації ферментів - включення ферменту в мікрокапсули і волокна. У обох методах фермент залишається у своєму звичайному водному оточенні, що забезпечує збереження його активності і специфічності. При мікрокапсулюванні крапельки водного розчину ферменту диспергують (розпилюють) в

органічному розчиннику, і на межі розділу фаз виникає оболонка (мембрана) за рахунок міжфазної полімеризації або зниження розчинності відповідного полімеру, який був спочатку присутній в одній з фаз. Як і у разі гелів, мембрана мікрокапсули проникна для низькомолекулярних субстратів, але непроникна для ферменту. Розміри капсул складають десятки або сотні мікрон, і вони легко відділяються від розчину фільтруванням.

Дуже поширений метод іммобілізації - включення ферменту у волокна. Спочатку отримують емульсії водного розчину ферменту(або суспензію сухого ферменту) в органічному розчиннику, що містить полімер, здатний утворювати волокна. Найчастіше використовують триацетатцеллюлозу, а також нітроцеллюлозу, стилцеллюлозу та і. Потім цю емульсію продавлюють крізь тонкі отвори в інший розчинник, що викликає коагуляцію полімеру. Виходять волокна, що містять мікрокрапельки (порядку 1 мікрона) водного розчину ферменту.

Іммобілізація завжди пов'язана з втратою частини активності ферменту, тому що при зв'язуванні молекули ферменту з носієм може бути порушений вільний доступ субстрату до активного центру. Крім того, при іммобілізації у ферменту може змінитися конформація молекули з втратою активності або статися часткова денатурація молекули.

Незважаючи на втрату від 10 до 90 % активності ферментів при іммобілізації, а також на деяке зменшення швидкості реакції в результаті утруднення дифузії субстрату, іммобілізовані ферменти мають великі технологічні переваги в порівнянні з незв'язаними. Дуже важливо те, що іммобілізовані ферменти можна відокремити від продуктів реакції і використати багаторазово, і що фермент не забруднює продукт. При іммобілізації можливо міняти і цілеспрямовано модифікувати властивості ферменту. І нарешті, іммобілізовані ферменти зазвичай стабільніші до дії температури і рН середовища.

#### Контрольні запитання

1. Твердофазний спосіб отримання ферментів.
2. Глибинний спосіб отримання ферментів.
3. Отримання очищених ферментів.
4. Іммобілізовані ферменти.

Рекомендована література: [1], с. 98-107.

## 5 ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 5

Тема: Виробництво антибіотиків.

Мета: Ознайомлення з технологією виготовлення антибіотиків і методами їх аналізу.

### Загальні теоретичні відомості

Стадії промислового виробництва антибіотиків ретельно розібрані у [1]. Також описано отримання бензилпеніциліну. Кожна серія лікарського препарату перед реалізацією проходить всі лабораторні випробування. Аналіз починають з органолептичної перевірки. Контролюють колір, запах, смак, однорідність та ін. Потім перевіряють масу або об'єм лікарської форми та розважки сублимаційного порошку на дози. Ліофілізовані препарати розглядаються як порошки для ін'єкційних або внутрішньовенних введень.

#### *1 Аналіз пеніциліну*

Пеніцилін (феноксиметилпеніцилін) – це білий кристалічний порошок кислуватогіркокого смаку, негігроскопічний. Стійкий у слабокислому середовищі. Руйнується при кип'ятінні у розчинах лугів, під дією окиснювачів та пеніцилінади. Мало розчинний у воді, розчиняється у етиловому і метиловому спиртах, ацетоні, хлороформі, бутилацетаті і гліцерині.

#### *Визначення справжності*

1. Декілька кристалів препарату поміщують на предметне скло або фарфорову чашку, додають одну краплю розчину, що включає 1 мл 1 н розчину гідроксиламін гідрохлориду і 0,3 мл 1 н розчину натрій гідроксиду. Через 2-3 хвилини до суміші додають одну краплю 1N розчину оцтової кислоти (ретельно перемішують), потім додають одну краплю розчину міді нітрату; випадає осад зеленого кольору.

2. 0,1 г (точна наважка) препарату розчиняють у 4 мл 5% розчину натрій гідрокарбонату, розводять водою до 500 мл і визначають оптичну густину (D) при довжині хвиль 268 нм і 274 нм у кюветі з товщиною слою 1 см. Контрольний розчин: 4 мл 5% розчину натрій гідрокарбонату, розведений водою до 500 мл.

Відношення  $D_{268}$  до  $D_{274}$  повинно бути 1,21–1,24.

*Визначення рН водного розчину феноксиметилпеніциліну (кислотність).*

Готують 0,5 % водну суспензію препарату. Вимірювання рН проводять потенціометрично. При цьому рН повинно бути 2,4–4,0. Втрати ваги при висушуванні. 2 г препарату (точна наважка) сушать у вакуум-сушарці при

60 °C і остатньому тиску 5 мм рт.ст. впродовж 3 годин. Втрата ваги не повинна перевищувати 1,5 %.

### *2 Аналіз стрептоміцину сульфату*

Стрептоміцину сульфат є сіллю органічної основи, що виробляється мікроорганізмами (*Streptomyces globisporus streptomycini*) і володіє антимікробною дією. Один мікрограм хімічно чистого стрептоміцину основи відповідає 1 одиниці дії (OD) специфічної активності.

Стрептоміцину сульфат – це порошок білого або майже білого кольору гіркого смаку без запаху. Гігроскопічний. Стійкий у слабкислому середовищі і при нагріванні у розчинах кислот і легко розчиняється у воді, практично не розчиняється у етиловому і метиловому спиртах, хлороформі і ефері.

#### *Визначення справжності.*

1. До 5 мл 0,5 % розчину препарату додають 0,5 мл 0,5 н розчину натрію гідроксиду і нагрівають на киплячій водяній лазні 4 хвилини. Охолоджують і додають 4 мл 1 % розчину залізоамонійних галунів у 0,1N розчині сульфатної кислоти: з'являється фіолетове забарвлення.

2. До 5 мл 0,5 % розчину препарату додають 1 мл розчину натрій гідроксиду і 1 мл 0,5 % розчину  $\alpha$ -нафтолу у 40 % спирті. Суміш охолоджують до 15 °C і додають 3 краплі 5 % розчину натрій гіпоброміду: з'являється фіолетово-червоне забарвлення.

3. До 2 мл 0,5 % розчину препарату додають 0,5 мл розведеної хлоридної кислоти і 0,5 мл розчину барій хлориду: з'являється білий осад, який не розчиняється у розведених кислотах.

#### *Визначення прозорості і кольоровості розчину.*

28 % розчин препарату у воді очищеній має бути прозорим і безкольоровим впродовж 24 години при 5-10 °C. Припустимий світложовтий колір.

#### *Визначення рН.*

28 % розчин стрептоміцин сульфату повинен мати рН 4,5-7,0.

#### *Кількісне визначення.*

Проводять методом дифузії, у агар з тест мікробом *Bacillus mycoides*-537. Метод базується на порівнянні пригнічення росту тест-мікроба препарату, що випробується із стандартним зразком.

#### *Контрольні запитання.*

1. Двофазність синтезу антибіотиків.
2. Живильні середовища для отримання антибіотиків.
3. Контроль при виробництві антибіотиків.
4. Методи виділення і очищення антибіотиків.
5. Методи сушки антибіотиків.

Рекомендована література: [1], с. 121-129.

## 6 ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 6

Тема: Промислове виробництво бактерійних препаратів.

Мета: Ознайомитися з технологічним процесом отримання бактерійних препаратів, підготовкою живильних середовищ для культивування, методами аналізу препаратів.

### Основні теоретичні відомості

Препарати з живих бактерій досить широко розповсюджені. Їх призначають при порушеннях складу нормальної мікрофлори макроорганізму (дисбактеріозах), які виникають, зокрема, внаслідок вживання антибіотиків і інших хіміотерапевтичних засобів. Найбільш розповсюджений кишковий дисбактеріоз як сигнал порушення механізмів імунологічного гомеостазу організму.

Технологія отримання складається із роботи зі штамом-продуцентом, який спочатку відновлюють із стану анабіозу; потім здійснюють накопичення біомаси, яку потім розливають у ампули чи заморожують без фасування.

Для вирощування мікроорганізмів велике значення має склад живильних середовищ, рН, аерація (для вирощування аеробних бактерій).

Оскільки бактерійні препарати містять живі бактерії, велике значення має контроль, який здійснюють на кожному етапі виробництва.

#### *Виробництво біфідумбактерину*

Процес виготовлення біфідумбактерину включає наступні стадії:

1. Отримання маточної виробничої культури.
2. Вирощування культури (біомаси) та внесення у неї середовища висушування.
3. Розлив мікробної суспензії у флакони (ампули) та ліофільна сушка препарату.

Для отримання маточної культури штам *Bifidobacter bifidum* розмножують до необхідної кількості на живильному середовищі Блаурокка. Для отримання *середовища Блаурокка* печінку великої рогатої худоби подрібнюють і екстрагують водою при кип'ятінні, фільтрують. До екстракту додають 20 % їдкий натр, агар-агар, пептон Мартена, хлорид натрію, лактозу, L-цистин. Вирощену на середовищі Блаурокка маточну культуру переносять у балон із середовищем *KD-5* для вирощування біомаси. Для його приготування спочатку готують 6 % розчин казеїну, додають 20 % розчин натрій гідроксиду до рН 8,2, подрібнену підшлункову залозу корів (1 частину на 10 частин розчину), потім хлороформ.

Гідроліз триває 7 діб при 45 °С. Гідролізат фільтрують; до профільтованого гідролізату додають розчин аутолізату дріжджів у співвідношенні 1:6. Аутолізат отримують після витримки дріжджів 48 годин при 56-60 °С та стерилізації автоклавуванням при 120 °С та 0,11 МПа.

Вирощування біомаси ведуть при 38 °С і рН 6, яку підтримують додаванням 10% розчину амоніаку, впродовж 24-48 годин. Потім додають цукро-желатинове середовище висушування, розливають у флакони (ампули), заморожують при мінус 60-65 °С впродовж 48 годин. Висушують в сублиматорі спочатку при 25 °С, а через 30 годин при 35 °С ще 6 годин.

*Контроль виробництва* починається з контролю чистоти культури. Після інкубації посівів на живильний агар з глюкозою не повинно бути росту. І далі після кожного пересіву роблять контроль на вміст сторонніх мікроорганізмів.

Після другої стадії теж контролюють стерильність та визначають кількість живих мікробів у 1 мл.

Контроль готового препарату включає:

- зовнішній вигляд, розчинність;
- відсутність сторонньої мікрофлори;
- безпечність;
- кількість живих біфідобактерій у одній дозі препарату;
- активність кислотоутворення;
- залишкова вологість;
- наявність вакууму і герметичність ампул.

*Визначення кількості живих біфідобактерій у одній дозі препарату.*

З кожної серії відбирають для випробування 3 зразка.

Вміст ампули з біфідобактерином розводять 0,9 % розчином хлориду натрію з розрахунку 1 мл на одну дозу. Отримані вихідні розведення препарату із ампул переносять по 1 мл у пробірки, які містять по 9 мл модифікованого середовища Блаурокка. Перемішують. По 1 мл попередньо розведеного препарату переносять у 9 мл середовища Блаурокка наступного розведення і та ін. до розведення  $10^{-10}$ . Пробірки з посівами зразків препарату в середовищі Блаурокка термостатують 4 доби при 38 °С. Після термостатування відзначають розведення, де є зростання колоній біфідобактерій. Кількість живих біфідобактерій в одній дозі препарату визначають за формулою

$$X = a \cdot 10^{n-1}, \quad (7)$$

де X – кількість живих осіб у дозі препарату;

a – кількість колоній у останній пробірці, де виявлено зростання;

n – порядковий номер пробірки у ряду десятикратних розведень, у якій є зростання.

Препарат придатний, якщо зростання біфідобактерій відзначається не менш, ніж у 8-й пробірці, що дорівнює вмісту  $10^7$  живих осіб у дозі.

#### *Визначення активності кислотоутворення*

До біомаси у чотирьох ампулах додають по 2 мл середовища Блаурокка (по 1 мл на 1 дозу). Із розведених препаратів переносять по 2,5 мл у пробірки з 25 мл печінкового середовища і термостатують 72 години при 38 °С; після чого з кожної пробірки відбирають 2 проби по 10 мл і титрують 0,1 М розчином натрій гідроксиду до рН 8,5 (контролюють потенціометрично). Кислотність у градусах Тернера  $T^\circ$  визначають за формулою

$$T^\circ = a \cdot K \cdot 10, \quad (8)$$

де  $a$  – кількість 0,1 М розчину NaOH на титрування, мл;

$K$  – поправка до титру.

Середню величину активності кисло утворення розраховують по показникам для двох зразків (повинна бути не нижче 90 °T).

#### *Виробництво колібактерину*

Для отримання маточної культури флакони з ліофілізованим виробничим штамом *E.coli* M-17 відкривають у асептичних умовах і вносять у них по 5 мл м'ясопептонного бульйону. Отриману суміш пересівають у 4 пробірки з м'ясопептонним бульйоном. Пробірки термостатують 3-4 години при 37 °С. Потім бульйонну культуру пересівають на дріжджовий агар у матраці (з одної пробірки засівають два матраці). Посіви інкубують 16-18 годин при 37 °С. Кожний посів контролюють на відсутність сторонньої мікрофлори.

*М'ясопептонний бульйон* для першої генерації готують таким чином. Спочатку готують м'ясну воду, для чого м'ясний фарш заливають водою, настоюють 18 годин при 12-16 °С. а потім нагрівають до кипіння і кип'ятять 30 хвилин. Отстоюють 1,5 години і фільтрують. Цю м'ясну воду стерилізують автоклавуванням при 120 °С і 0,11 МПа 30 хвилин. Контролюють вміст амінного азоту. Потім подрібнені свинячі шлунки гідролізують підкисленою водою при 40-50 °С 24 години. Відбирають пробу на вміст амінного азоту і пептону. Гідроліз закінчено, якщо вміст амінного азоту  $(150 \pm 25)$  мг%, а пептону  $(5 \pm 1)$ %. Отриманий пептон Мартена стерилізують у автоклаві при 120 °С і 0,11 МПа 20 хвилин, потім змішують з м'ясною водою (4:10) і натрій хлоридом (до 0,5 %), розбавляють водою очищеною, доводять рН до 7,3 20 % розчином гідроксиду натрію, нагрівають до кипіння, кип'ятять 30 хвилин, відстоюють 4 години і фільтрують м'ясопептонний бульйон.

Дріжджовий агар готують із дріжджового аутолізу (див. попередній розділ), натрію гідроксиду, води і агару кип'ятінням впродовж 15 хвилин (рН має бути 8) з наступним відстоюванням при 60 °С одну годину.

Накопичення біомаси здійснюють у нержавільних реакторах при 37 °С, перемішуванні і аерації 6-7 годин (рН 7,2-8,0). Останні стадії процесу аналогічні отриманню біфідумбактерій.

#### *Виробництво біфіколу.*

Біфікол отримують змішуванням маточних культур *B.bifidum*, яку вирощували на середовищі КД-5 і *E.coli* М-17, вирощеної на дріжджовому агарі. Концентрація культури *E.coli* М-17 порівняно з культурою *B.bifidum* (по оптичній мутності) складає 90%.

Приклад розрахунку.

Оптична мутність культури *B.bifidum* – 50 од/мл.

Об'єм рідини у ємності – 600 мл.

В ній міститься  $600 \text{ мл} \cdot 50 \text{ од.} = 30000$  одиниць.

Оптична мутність культури *E.coli* – 700 од/мл.

В одному матраці міститься  $700 \cdot 25 \text{ мл} = 17500$  од.

Необхідний об'єм культури *E.coli*  $30000 \text{ од.} \cdot 0,9 = 27000$  од.

Таким чином у ємність, яка містить 600 мл середовища КД-5 і 30000 од. культури *B.bifidum* необхідно додати 27000 од. культури *E.coli* М-17.

Вирощування змішаної культури проводять у бутлях з середовищем КД-5, куди поміщують обидві культури, при 37 °С впродовж 18-24 годин.

Потім у змішану культуру додають 10 % від її об'єму сахарозо-желатинового середовища і 18 % знежиреного молока (попередньо стерилізованого).

#### *Методи контролю*

1. При огляді мазків, забарвлених по Граму повинні бути грам позитивні поліморфні палички з роздвоєнням на одному або двох кінцях у вигляді скупчень або поодиноких клітин – *B.bifidum* та грамнегативні короткі із закругленими кінцівками палички *E.coli* М-17.

2. При контролі стерильності на скошеному солевому агарі після інкубації посівів у термостаті при 37 °С впродовж 8 діб не повинно бути зростання сторонньої мікрофлори.

3. В одній дозі препарату (1 мл) повинно бути не менш  $10^7$  живих біфідобактерій і не менш  $10^7$  *E.coli* М-17.

Розливають біфікол по 5 мл (5 доз) у флакони шприцевим способом. Флакони поміщують у касети. Касети з препаратом заморожують до мінус 60 °С і витримують 48 годин.

Потім касети перезавантажують у охолоджену камеру сублімаційної установки і включають вакуум (26,6 Па) і сушать 30 годин при 25 °С, потім поступово піднімають температуру до 35 °С і сушать ще 5-7 годин.

Контейнери перекривають резиновими пробками, потім алюмінієвими ковпачками і завальцовують.

*Контроль готового препарату.*

1. Розчинність, прозорість і кольоровість. Препарат повинен після додавання 0,9 % розчину хлориду натрію 1 мл на одну дозу за 5 хвилин утворювати непрозору гомогенну білувато-сіру суспензію з жовтуватим відтінком.

2. Масова частка вологи не повинна бути більше 3,5 %.

3. Специфічна безпечність. Препарат має бути безпечним для білих мишей при пероральному введенні 1 дози.

4. Специфічна активність. В одній дозі препарату має бути не менше  $10^7$  живих *B.bifidum* і не менше  $10^7$  *E.coli* M-17.

5. Бактеріальна контамінація. Препарат не повинен містити сторонніх мікроорганізмів.

Контрольні запитання

1. Перелік препаратів для бактеріотерапії.
2. Основні стадії отримання бактерійних препаратів.
3. Методи контролю бактерійних препаратів.
4. Технологія отримання колібактеріну.
5. Технологія отримання біфідумбактерину.
6. Технологія отримання біфіколу.

Рекомендована література: [1], с. 111-121.

## 7 ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 7

Тема: Технологія отримання біопрепаратів з клітин тварин і людини

Мета: Ознайомитися з промисловими методами проведення біосинтезу та апаратурою для вирощування клітин тварин.

### Основні теоретичні відомості

Масове вирощування клітин тварин у культурі застосовується в першу чергу для виробництва противірусних препаратів.

На початку клітки одержують від тварин механічною або ферментативною дезагрегацією. Потім їх поміщають у підходяще середовище (склад середовища залежить від типу клітин), де вони розвиваються в первинні культури з «нормальним» (диплоїдним) або «ненормальним» (трансформованим або похідним з пухлини) каріотипом.

Розрізняють первинні культури клітин і клітинні лінії.

Первинна культура – це культура, що походить від клітин тканин або органів, узятих безпосередньо з організму. Культура вважається первинною доти, поки вона не субкультивується, після чого стає клітинною лінією.

Постійна клітинна лінія – це клітки, здатні субкультивуватися поза організмом протягом необмеженого числа пасажів.

Первинні культури звичайно одержують трипсинізацією тканин курей, курячих ембріонів або тканин (найчастіше нирок), узятих від інших видів здорових тварин. Вік використовуваних ембріонів може значно різнитися й впливати на вихід і життєздатність клітин.

#### *Вирощування одношарових первинних культур.*

Культури клітин вирощують зазвичай в спеціальному культуральному скляному або пластиковому посуді, призначеному для зростання клітин в моношарі. На початку спостерігається період спокою, протягом якого клітки прикріплюються до субстрату, адаптуються до умов існування і готуються до ділення. Потім починається фаза розмноження клітин (фаза логарифмічного зростання). Розмножуючись, клітки розміщуються в один шар на поверхні субстрату і при повному покритті його контактують між собою і припиняють ділення (стаціонарна фаза). Клітки моношару можуть зберігати життєздатність до 20 днів і більш (залежно від виду клітин і складу живильного середовища). Потім настає старіння і загибель клітин. Швидкість розмноження клітин в культурі залежить від виду початкової тканини, віку тварини, якості і рН середовища, кількості клітин, температури культивування, а також від ступеня пошкодження у момент виділення з тканини.

Одношарові культури можна отримати тільки при посіві певної кількості клітин на одиницю поверхні судини. Недостатня і надмірна кількість клітин гальмує зростання культури. Для культур клітин з різних тканин оптимальна посівна концентрація клітин знаходиться в межах  $2 \cdot 5 \cdot 10^5$ /мл.

*Основні системи промислового культивування клітин тварин.*

Системи масового культивування клітин тварин раніше технологічно застосовувалися лише у виробництві вакцин (в першу чергу протиящурних) і інтерферону. Істотні зміни технології масового культивування клітин тепер обумовлені широким впровадженням постійних ліній клітин (зокрема з клонованою ДНК) в біотехнологічних процесах. Тип клітин-продуцентів і вимоги, що пред'являються до кінцевого продукту, є головними чинниками при виборі промислової технології.

З інженерної точки зору культури, в яких клітки оточені рідким середовищем, вважають глибинними. Принципи техніки глибинного культивування зазвичай застосовні до типів клітин тварин, які ростуть на поверхні твердого субстрату і в суспензії.

Розрізняють статичні і динамічні системи глибинного культивування. Перші характеризуються відсутністю переміщення культуральних судин і їх вмісту в процесі культивування (пробірки, флакони, матраци, багатоярусні піддони, статичні суспензії). Під другим мають на увазі рух культуральних судин (пробірки, що обертаються, бутлі, «колони» з скляними трубками, багатопластинчасті культиватори) або живильного середовища в процесі вирощування (багатопластинчасті культиватори, культиватори з різними наповнювачами: буси, мембрани, диски, мікроносії і перемішуванні суспензії). Системи статичного глибинного культивування застосовують при невеликих об'ємах культуральних судин.

При промислового культивуванні клітин тварин розрізняють багатоселементні процеси і процеси в одиничному устаткуванні. Перша назва відноситься до систем, збільшення продуктивності яких досягається шляхом простого збільшення числа культуральних судин. Розширення масштабів виробництва за рахунок культивування в одиничному устаткуванні досягається збільшенням розмірів культуральних судин (культиваторів) без помітного приросту їх кількості. При цьому геометрична подібність культуральних судин, як правило, змінюється.

Розширення масштабу виробництва шляхом збільшення кількості однотипних культуральних судин є практичним методом багатократного повторення, тоді як масштабування, що супроводжується зміною розмірів установок, вважається технологічним методом. Якнайкращою системою для масштабування і оптимізації умов культивування є суспензійна культура.

Клітки, зростання яких залежить від прикріплення до поверхні щільного субстрату, можна вирощувати в трьох типах одиничного устаткування, відтворюючого в своїй основі загальноприйняте багатоелементне устаткування: 1 – система статичних плоскостінних судин, що еволюціонує в установки, що містять безліч пластин, розташованих паралельно (рисунок 20). Ці платини можуть бути статичними або рухомими; 2 – система бутлів, що обертаються, яка перетворилася в ряд культиваторів, що містять масу трубок і що функціонують аналогічно початковій системі одиничного устаткування (бутлі, що обертаються); 3 – система, основана на вирощуванні клітин в культиваторах на пластиковій плівках. Крім того, відомо ще дві додаткові системи. Одна з них припускає вирощування клітин на зовнішній або внутрішній поверхні синтетичних мікрокапілярів – порожнистих волокон (зовнішній діаметр 300 мкм), укладених у вигляді паралельних орієнтованих шарів (рисунок 21). Інша є культиватором, заповненим елементами (скляні намиста, кільця, губки, та ін.) насадок, розмір і форма яких широко варіюється.

Розрізняють замкнуті (циклічні) і відкриті системи культивування. У замкнутих системах концентрація живильних речовин у міру культивування знижується, і накопичуються продукти метаболізму. Відкриті характеризуються безперервним або періодичним оновленням середовища.

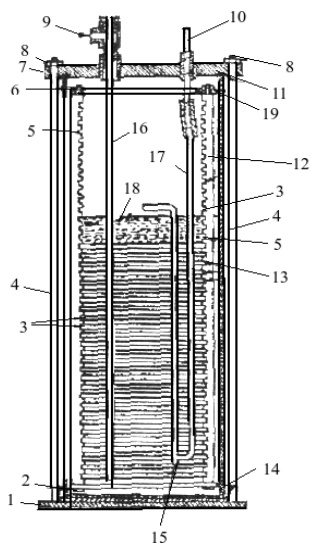


Рисунок 20 – Схема багатопластинчастого культиватора

1 – основа; 2 – дно; 3 – жолобки; 4 – стягуючий стрижень; 5 – опорна стійка; 6 – гайка опорної стійки; 7 – кришка; 8 – гайка; 9 – отвір для відведення

газової суміші; 10 – отвір для подачі газової суміші; 11 – кільцева прокладка; 12 – циліндрова судина; 13 – скляні пластини; 14 – амортизатор; 15 – повітряний насос; 16 – трубка для подачі зразків; 17 – трубка для подачі повітря; 18 – культуральне середовище; 19 – кришка опорної стійки.

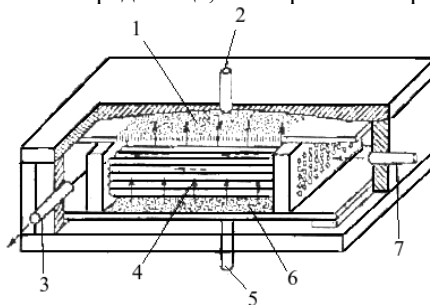


Рисунок 21 – Проточний реактор з подушкою з пористих трубочок

1 – верхній мікропористий фільтр; 2 – відтік повітря; 3 – відтік повітря і вуглекислого газу; 4 – подушка з трубочок; 5 – приток свіжого середовища; 6 – нижній мікропористий фільтр; 7 – приток повітря.

#### *Культивування клітин на щільних поверхнях.*

Для зростання більшості культур клітин необхідна тверда поверхня, де клітки прикріплюються і розмножуються. Такі клітки прийнято називати поверхнево- або субстрат-залежними. До них відносять первинні культури клітин, лінії диплоїдних клітин і більшість постійних клітинних ліній.

Для підтримки зростання клітин у якості щільного субстрату використовують різні речовини, зокрема скло, сталь, титан, різні пластики (полістирол, меланекс, полікарбонати), вуглеводні полімери (целофан, сефадекс) та ін. Багато з них перед застосуванням покривають сироваткою, білком або полімерами.

Зростання поверхнево-залежних клітин в будь-яких культуральних системах відбувається тільки після їх прикріплення до твердого субстрата. Процес прикріплення багатоступінчатий і включає: адсорбцію чинників прикріплення на культуральній поверхні, контакт з нею клітин, прикріплення і розпластування клітин на культуральній поверхні. Прикріплення клітин пов'язане з двовалентними катіонами і глікопротеїнами, адсорбованими на культуральній поверхні, яка повинна бути гідрофільною. Якщо білок і двовалентні катіони відсутні, клітки прикріплюються до культуральної поверхні неміцно, тільки за рахунок неспецифічної адсорбції.

Найбільш оптимальним методом культивування клітин на твердих поверхнях, є культивування з використанням мікроносіїв. Гранули

мікроносія роблять з природного полімеру глюкози – декстрану або якого-небудь синтетичного полімеру. Діаметр їх – від 50 мкм до декількох сотень мікрометрів.

Мікроносії суспендують в живильному середовищі. Потім додають клітки, які прикріплюються до мікроносія, розмножуються і покривають всю поверхню гранул. Оскільки клітки ростуть на поверхні гранул, зважених в товщі рідкого живильного середовища, система на мікроносіях, по суті, є суспензійною культурою.

Цей метод найповніше відповідає вимогам великомасштабного культивування поверхнево-залежних клітин, забезпечує рівномірні умови, культивування, контроль основних параметрів середовища, візуальне спостереження за зростанням клітин і високу продуктивність.

Основні вимоги, що пред'являються до мікроносіїв: поверхня їх повинна нести помірно позитивний заряд; у різних партіях мікроносія не повинно бути коливань в щільності заряду; густина речовини з якого виготовлені мікрогранули, повинна бути в межах 1,02-1,04 кг/дм<sup>3</sup> (в цьому випадку вони легко підтримуються в суспензії при невеликій швидкості перемішування).

При великомасштабному виробництві важливим моментом є швидкість перемішування. Перемішування повинне бути достатньо енергійним, щоб кульки носія не злипалися, і в той же час, щоб не було обдирання клітин з носія. Зазвичай використовують велику мішалку з швидкістю не більше 0,83 с<sup>-1</sup>.

Для того, щоб зняти клітки, що вирости, з мікрогранул з метою подальшого пасивування або використання, застосовують протеолітичні ферменти (трипсин, проназу, колагеназу), механічні способи або поєднують обидва методи. Іноді використовують знижену температуру, гіпотонічні розчини або тимчасове збільшення швидкості перемішування суспензії. Останній метод заснований на тому, що клітки, які знаходяться у стадії митоза, слабо пов'язані з субстратом і при збільшенні швидкості перемішування легко відділяються від мікроносія.

Клітки, що вирости на мікроносіях добре зберігаються на мікрогранулах в замороженому стані при температурі рідкого азоту. Після відтавання вони залишаються прикріпленими, що полегшує адаптацію до нормальним умов при розмноженні.

Вибір культуральних судин залежить від масштабу культивування:

- для лабораторних цілей використовують бутлі з магнітними мішалками, що обертаються, і лабораторні культиватори;
- для великомасштабного виробництва використовуються культиватори місткістю до декількох сотень дм<sup>3</sup>.

*Культивування клітин в суспензії.*

У суспензійній культурі здатні розмножуватися тільки постійні клітинні лінії, і те, як правило, після адаптації до умов культивування. Більшість з них відноситься до «ненормального» типу клітин.

Суспензійні культури готують з одношарових у фазі логарифмічного зростання. Клітки обережно відокремлюють від скла за допомогою розчинів, що диспергують, або механічним способом.

З метою запобігання агрегації клітин і прикріплення їх до скла на верхній межі рідини, що приводить до загибелі культури, в середовище додають кристалічний трипсин в концентрації 10-50 мкг/л.

Після адаптації клітинної лінії до зростання в суспензії і дотриманні стандартних умов вирощування клітки розмножуються практично з постійною швидкістю.

#### Контрольні запитання

1. Первинні культури клітин і їх отримання.
2. Постійні клітинні лінії і їх отримання.
3. Вимоги до факторів зовнішнього середовища.
4. Методи дезагрегації тканин.
5. Основні системи промислового культивування клітин тварин.
6. Культивування тканин в суспензії.

Рекомендована література: [1], с. 131-145.

## 8 ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 8

Тема: Промислове виробництво людського лейкоцитарного інтерферону.

Мета: Ознайомитися з класифікацією інтерферонів, сировиною для їх виробництв, засобом отримання, методами контролю.

### Основні теоретичні відомості

Людський лейкоцитарний інтерферон є видоспецифічним г्लюкопротеїдом, синтезованим донорськими лейкоцитами у відповідь на вплив інтерферогену.

Специфічність препарату визначається наступними ознаками:

- противірусною активністю; у розведенні, що відповідає титру активності, препарат повинен захищати культуру людських клітин від цитопатичної дії індикаторного вірусу, взятого в дозі 100 ТЦД<sub>50</sub>;

- стійкою активністю до дії нуклеаз, РНК-ази й ДНК-ази;

- чутливістю активності до дії трипсину – при концентрації ферменту 300 мкг/мл протягом 1 години при 37°C препарат повністю інактивується;

- чутливістю активності до дії специфічної антисироватки - антиінтерферонова сироватка в розведенні, що відповідає титру, повинна знижувати захисну дію інтерферону, взятого в кількості 10 од. у реакції нейтралізації.

Препарат повинен бути вірусологічно стерильним, нетоксичним і нешкідливим.

У розведенні, що відповідає титру активності, препарат повинен захищати культуру людських клітин від цитопатичної дії індикаторного вірусу.

Сухий препарат – пористий порошок сірувато-коричневого кольору, легкорозчинний у воді. Залишкова вологість не повинна перевищувати 2 %.

Розчин препарату повинен мати різні відтінки червоного кольору й жовтуватий відтінок.

### *Технологія одержання спеціальних видів сировини й напівфабрикату.*

Кров заготовлюють на станціях переливання крові відповідно до інструкцій у стерильні багатокамерні мішки або флакони, заповнені розчином, що консервує.

Пластикові мішки центрифугують 4 хв. при 4 °С і з них вичавлюють послідовно – плазму, а потім 40 мл верхнього шару з поверхні клітинної фракції (еритромаса) або 40 мл верхнього шару клітинної фракції, які

використовують надалі як джерело лейкоцитів (лейкомаса) для біосинтезу препарату.

Зразок крові, плазми, еритромаси або лейкомаси від кожного донора повинен контролюватися на відсутність інфікування сифілісом, гепатитом, СНІД відповідно до діючих інструкцій. При негативних результатах контролю еритромаса й лейкомаса можуть використовуватися для виробництва інтерферону не пізніше, ніж через добу після забору крові від донора. Зберігання їх допускається при температурі не вище 4 °С.

Плазма або сироватка донорської крові входять до складу культуральної суміші на стадіях біосинтезу інтерферону.

#### ***Характеристика й контроль виробничих штампів вірусів.***

У виробництві інтерферону в якості інтерфероногену використовується штамп "Н" вірусу хвороби Ньюкасла. Вірус легко репродукується в курячих ембріонах і в культурі курячих фіброblastів, виявляючи цитопатичну дію. Вірус безпечний для людини, однак може викликати запальні явища при випадковому влученні масивної дози в око.

Індикаторним вірусом служить штамп "Індіана" вірусу везикулярного стоматиту. Вірус добре репродукується в курячих ембріонах, а також у культурах курячих і людських фіброblastів, виявляючи цитопатичну дію.

Вірус хвороби Ньюкасла культивують в 10-денних курячих ембріонах. Ембріони переглядають через овоскоп, вмерлі відбраковують, а в життєздатних олівцем обводять межі повітряної порожнини.

При вихідному титрі вірусу  $10^8$ - $10^9$  ТЦД<sub>50</sub>/мл доза, що заражає, становить 0,2 мл розведення  $10^{-4}$ . Ця доза вводиться в ембріон шприцом через повітряну порожнину з дотриманням умов стерильності. Місце проколу в шкарлупі заливається парафіном і ембріони інкубуються 2 доби при 37 °С.

Після інкубації ембріони охолоджують при 4 °С протягом 3-4 годин, потім у строго стерильних умовах розкривають із боку повітряної порожнини й візуально оцінюють їхню життєздатність. Полеглі – відбраковують, а з інших пастеровською піпеткою (за допомогою вакууму або груші) відбирають алантоїсну рідину, що і служить надалі джерелом вірусу.

Алантоїсну рідину, що містить вірус, контролюють на бактеріологічну стерильність. Визначають інфекційний титр у культурі курячих фіброblastів і титр гемаглютининів.

Контроль на стерильність здійснюють висівом 1 мл алантоїсної рідини з кожного флакона на живильні середовища - цукровий бульйон і середовище Сабуро. Посіви інкубують протягом 7 діб на цукровому бульйоні при 37 °С, а на середовищі Сабуро – при кімнатній температурі.

Інфекційний титр визначають у культурі фіброblastів. В тридобову культуру із моношаром клітин, що сформувався, вводяться різні розведення від  $10^{-7}$  до  $10^{-10}$  алантоїсної рідини. Культури інкубують 3 доби при 37 °С і

потім переглядають під мікроскопом. Максимальні розведення, що виявляють у культурі цитопатичну дію, приймаються за ТЦД вірусу (титр цитопатичної дії).

У виробництві допускається використання тільки бактеріологічно стерильного вірусу з інфекційним титром  $10^8$ - $10^9$  1 мл ТЦД<sub>50</sub>.

Одержання первинно-трипсинізованих культур шкірно-м'язової тканини курячих і людських ембріонів здійснюють стандартними методами, що базуються на дезінтеграції тканини ембріона трипсином.

*Стадії процесу одержання лейкоцитарного інтерферону.*

Стадія 1. Виділення лейкоцитів.

Біосинтез інтерферону проводять із використанням лейкоцитів, звільнених від домішки еритроцитів. Якщо домішка еритроцитів перевищує 100 клітин на 1 лейкоцит, для їхнього відділення застосовують фракціонування з наступним гемолізом лейкоцит-утримуючої фракції. Фракціонування проводять у стерильних скляних колбах грушоподібної форми з верхнім і нижнім відводами, що герметично закриваються, ємністю 5 л, куди заливають 2 л стабілізуючого розчину, який містить: апірогенну дистильовану воду – 1 л, глюкозу фармацевтичну – 20 г, аскорбінову кислоту – 0,25 г, хлористий кальцій – 5 г, цитрат натрію тризаміщений – 15 г.

У відстійник зі стабілізуючим розчином вводять рівний об'єм клітинної фракції. Суспензію ретельно перемішують і додають розчин еритроцитів у кількості 1/10 від сумарного об'єму суспензії (400 мл).

Для осаджування використовують декстран фармацевтичний, полівініловий спирт фармацевтичний, розчини яких стерилізують автоклавуванням або фільтрацією й зберігають при температурі 4 °С. Під дією осаджувачів відбувається агрегація еритроцитів, що прискорює їхнє осадження із суспензії. У результаті відбувається розшарування суспензії на 2 фракції – темнозбарвлену нижню фракцію еритроцитів і світлу верхню фракцію лейкоцитів. Через нижній відвід відстійника фракцію еритроцитів зливають. Потім зливають і фракцію лейкоцитів. Клітки відокремлюють центрифугуванням. Надосадову рідину відкидають, а осад клітин ресуспендують у живильному середовищі, що містить 0,5 % етилендіамінотетраоцтової кислоти (ЕДТА).

*Гемоліз залишкових еритроцитів.*

У клітинну суспензію заливають 10 об'ємів гемолітику, (0,83 % розчин хлористого амонію в апірогенній дистильованій воді), витримують протягом 10 хвилин при 4 °С, а потім клітки відокремлюють центрифугуванням. Осад клітин ресуспендують у живильному середовищі 199 або мінімальному "Ігла", що містить 3 од./мл гепарину, 5 % донорської плазми або сироватки, 0,1 трилону Б і 5 од./мл мономіцину.

Відбирають 0,5 мл ретельно перемішаної суспензії й поєднують її з 0,5 мл розчину еозинату. Витримують суміш 30 с при кімнатній температурі й розводять фізичним розчином в 100 разів. Розчин уводять у рахункову камеру Горяєва й рахують кількість забарвлених і незабарвлених клітин під мікроскопом зі збільшенням  $100\times$  у всій камері.

Кількість нежиттєздатних (забарвлених клітин) не повинна перевищувати 3 % від загального числа клітин у суспензії.

Стадія II. Стимуляція інтерферогенезу – праймінг.

На цій стадії переслідують дві мети: активізувати метаболізм лейкоцита (для цього в культуральне середовище вводять нативну плазму й інсулін) і стимулювати інтерферогенез дією інтерферону. Праймінг забезпечує підвищення виходу активності не менш чим в 4 рази.

Лейкоцити, звільнені від домішки еритроцитів, суспендують з розрахунку 10-20 млн. клітин в 1 мл середовища № 1, у яке доданий інсулін і нативний інтерферон. Суспензію переливають у плоскодонні колби ємністю 5 л, заповнюючи тільки половину об'єму. У колбу поміщають стрижень із м'якого заліза з некорозійним покриттям, що попередньо стерилізують автоклавуванням або пропалюванням у полум'ї пальника.

Колби із клітинною суспензією перебивають стерильною алюмінієвою фольгою й інкубують не менш 2-х годин на водяній лазні при 37 °С (при необхідності – до 12 годин).

Стадія III. Індукція інтерферону.

Для індукції використовують бактеріологічно стерильний вірус хвороби Ньюкасла з інфекційним титром не нижче  $10^8$  мл ТЦД<sub>50</sub> у культурі курячих фібробластів. Вірус попередньо підігрівають до 37,5 °С.

Культуральні колби розкривають під полум'ям пальника й алантоїсну рідину, що містить вірус, переливають у суспензію з розрахунку  $10^{-100}$  ТЦД<sub>50</sub> на 1 лейкоцит (при вмісті лейкоцитів 25 млрд. додають 250 млн. вірусу з інтерферогенним титром  $10^9$  ТЦД<sub>50</sub>). Колбу перебивають алюмінієвою фольгою з дотриманням умов стерильності й інкубують протягом 1 години при 37,5 °С.

Стадія IV. Відділення індукованих лейкоцитів.

Суспензію індукованих лейкоцитів центрифугують 15 хв. при 4 °С, або сепарують в умовах стерильності. Надосадову рідину відбирають в окрему ємність для знезаражування, а осад клітин суспендують у живильному середовищі, яке містить: середовище 199 або мінімальне середовище "Ігла", 3 од./мг гепарину, 5% плазми або сироватки донорської крові, мономіцин 50 од./мл, рН 7,2-7,4 (середовище № 2).

Стадія V. Біосинтез.

Стаціонарне культивування індукованих лейкоцитів проводять у матрацах, куди зі строгим дотриманням стерильності заливають розраховану

кількість середовища № 2 і вводять необхідну кількість лейкоцитів. Перекривають матраци стерильними пробками, суспензію клітин ретельно перемішують і встановлюють матраци у відповідне положення (норма "ребро") на стелажі термального приміщення з температурою 37 °С. Культивування продовжують 18-20 годин. Допускається ролерне культивування лейкоцитів.

Після завершення синтезу культуральне середовище, що містить інтерферон, центрифугують або сепарують з дотриманням умов стерильності для відділення відпрацьованих клітин.

Надосадову рідину збирають у стерильні сулії ємністю 5-10 л. Потім, для інактивації вірусу інтерфероногену в кожній сулії доводять величину рН до 2,5 додаванням 20 %-го розчину соляної кислоти. З кожної сулії відбирають зразок (10 мл) для проведення контролів, сулію закривають стерильною гумовою пробкою й запечатують.

В ампули й флакони ємністю 5-10 мл препарат розливають по 2 мл. У флакони ємністю 500 мл – по 50 мл.

Ліофілізацію проводять у вакуум-сушильних апаратах будь-якої системи. Препарат зберігають у сухому, захищеному від світла місці при температурі від 4 до 10 °С, строк придатності препарату 1,5 року з моменту виготовлення.

#### *Визначення інфекційної активності вірусу.*

При виділенні і вирощуванні вірусів виникає необхідність їх кількісного визначення. Титрування їх здійснюють різними методами: по цитопатичному ефекту; по утворенню бляшок та флуоресцюючих фокусів; імуноферментним методом та ін.

*Титрування вірусів по цитопатичному ефекту* базується на властивості інфекційних часток вірусу викликати цитоморфологічні зміни. Титр його визначають у тканинних цитопатичних дозах – ТЦД<sub>50</sub>. 1 ТЦД<sub>50</sub> – доза вірусу, яка викликає цитопатичний ефект у 50 % заражених культур клітин.

Цитопатичний ефект – це морфологічні зміни, які фіксуються за допомогою мікроскопу у зараженій культурі в порівнянні з контрольною (закруглення клітин, симпластоутворення, фрагментація клітин).

Титрують вірус зазвичай у пробірках з вирощеною у них культурою клітин. Для цього використовують серійні десятикратні розведення матеріалу, який містить вірус. У пробірки розливають по 0,9 мл підтримуючого середовища для розведень. Потім у першу пробірку вносять 0,1 мл матеріалу, який містить вірус. Іншою стерильною піпеткою вміст першої пробірки перемішують і переносять 0,1 мл у другу. Цю процедуру повторюють, послідовно переносячи по 0,1 мл матеріалу, який містить вірус, у наступну пробірку. Таким чином отруують десятикратні послідовні

розведення вірусу: у першій пробірці – 1 : 10( $10^{-1}$ ), у другій – 1 : 100( $10^{-2}$ ), у третій 1 : 1000( $10^{-3}$ ) та ін.

З пробірок з вирощеною культурою клітин, які призначені для зараження, під мікроскопом відбирають лише ті, у яких моношар не має дегенеративних змін. Клітинний моношар промивають 3 рази збалансованим сольовим розчином. Одним розведенням вірусу заражають культуру у чотирьох пробірках внесенням у кожну з них по 0,1 мл вірусного матеріалу. Інкують при 37 °С. Для контролю використовують чотири пробірки з незараженою клітинною культурою. Час обчислення результатів титрування залежить від часу проявлення цитопатичної дії вірусу і становить зазвичай 3-10 діб.

Титр інфекційності розраховують кількома засобами.

За методом Ріда і Менча отримані результати виражають у вигляді кумулятивних даних, що дозволяє штучно збільшити цифрові дані і натомість зменшити похибку розрахунку дози вірусу, яка дає 50 %-ний ефект.

У таблиці 4 наведено приклад запису результатів титрування інфекційності вірусу за цитопатичним ефектом у культурі клітин, розрахунку кумулятивних даних і відсотку пробірочних культур з наявністю цитопатичного ефекту (доза зараження 0,1 мл).

Таблиця 4 – Результати титрування вірусу за ЦПЕ у культурі клітин

Розведення матеріалу, що містить вірус	Фактичні дані		Кумулятивні дані		Відсоток пробірок з наявністю ЦПЕ
	Кількість пробірок		Кількість пробірок		
	з ЦПЕ	без ЦПЕ	з ЦПЕ	без ЦПЕ	
$10^{-1}$	4	0	11	0	100
$10^{-2}$	4	0	7	0	100
$10^{-3}$	2	2	3	2	60
$10^{-4}$	1	3	1	5	16,7
$10^{-5}$	0	4	0	9	0

Кумулятивні дані отримані, виходячи з того, що ЦПЕ у пробіркових культурах клітин, викликаний малими дозами вірусу, мав би місце і при зараженні великими дозами, і навпаки.

З таблиці видно, що розведення вірусу, яке спричинює ЦПЕ у 50% культур клітин, знаходиться між розведеннями  $10^{-3}$  і  $10^{-4}$ . Логарифм цього розведення ( $\lg \text{ТЦД}_{50}$ ) обчислюють за формулою

$$\lg \text{ТЦД}_{50} = \lg B + [(b - 50)/(b - a)] \cdot \lg d \quad (9)$$

де  $\lg B$  –  $\lg$  розведення вірусу, яке спричинює ЦПЕ у більш, ніж 50% заражених культур клітин;

$b$  – відсоток, що відповідає розведенню  $B$ ;

$a$  – відсоток, що відповідає розведенню, яке спричинює ЦПЕ менш, ніж у 50% культур;

$d$  – коефіцієнт розведення.

Отримуємо

$$\lg \text{ТЦД}_{50} = \lg 10^{-3} + [(60 - 50)/(60 - 16,7)] \cdot \lg 10^{-4} = -3,23$$

Таким чином, титр вірусу

$$T = 10^{-3,23} \cdot \text{ТЦД}_{50}/0,1 \text{ мл}$$

$$T = 10^{-4,23} \text{ТЦД}_{50}$$

*Розрахунок за методом Кербера у модифікації Ашмаріна* дещо спрощує обчислення, забезпечує досить високу точність. Логарифм цього розведення ( $\lg \text{ТЦД}_{50}$ ) обчислюють за формулою

$$\lg \text{ТЦД}_{50} = \lg D - \delta(\Sigma L_i - 0,5), \quad (10)$$

де  $\lg D$  –  $\lg$  найменшого розведення вірусу із випробуваних;

$\delta$  –  $\lg$  кратності випробуваних розведень;

$L_i$  – відношення кількості пробіркових культур з наявністю ЦПЕ до загальної кількості пробіркових культур, які заражені даним розведенням вірусу;

$\Sigma L_i$  – сума значень  $L_i$  для усіх випробуваних розведень;

0,5 – постійний коефіцієнт.

У нашому прикладі (див. табл. 5) найменше  $10^{-1}$ , тому  $\lg D = -1$ . Кратність розведень дорівнює 10, тому  $\delta = \lg 10 = 1$ .  $\Sigma L_i = 1 + 1 + 0,5 + 0,25 = 2,75$ .

Отримуємо

$$\lg \text{ТЦД}_{50} = -1 - 1(2,75 - 0,5) = -3,25$$

Таким чином, титр інфекційної активності

$$T = 10^{-3,25} \text{ТЦД}_{50}/0,1 \text{ мл}$$

$$\text{у 1 мл } T = 10^{-4,25} \text{ТЦД}_{50}$$

*Визначення інфекційної активності вірусів методом бляшок* – є найбільш об'єктивним і точним. Воно базується на властивості вірусів утворювати негативні колонії (бляшки) у моношарі клітин під щільним живильним середовищем (агар, агароза та ін.). Бляшка – це місцеве пошкодження моношару клітин внаслідок розмноження однієї інфекційної вірусної частки. Вірусні частки під щільним живильним середовищем не дифундують у нього, а інфікують клітини, які знаходяться поряд із зруйнованими.

Таблиця 5 – Результати титрування вірусу за ЦПЕ у культурі клітин

Розведення матеріалу, що містить вірус	Кількість пробіркових культур з наявністю ЦПЕ	Відношення кількості пробіркових культур з наявністю ЦПЕ до кількості усіх культур, які заражені вірусом у даному розведенні
$10^{-1}$	4	1,00
$10^{-2}$	4	1,00
$10^{-3}$	2	0,50
$10^{-4}$	1	0,25
$10^{-5}$	0	0,00

У результаті у моношарі клітин утворюються бляшки - ділянки із зруйнованих, відокремлених від скла клітин. При забарвленні моношару вони залишаються безбарвними. Результати титрування цим методом виражають у бляшкоутворюючих одиницях (БУО). Один БУО дорівнює дозі вірусу, яка спроможна викликати утворення однієї бляшки.

*Титрування вірусів за фокусами флуоресценції* полягає в тому, що інфіковану культуру клітин інкубують з антивірусними антитілами, які помічені флуоресцеїном. Антиген виявляють за специфічним світінням при огляданні заражених культур у люмінесцентному мікроскопі.

Титр вірусу розраховують за формулою, яку використовують для розрахунку за методом бляшок. При цьому його виражають у ФУО/мл (фокусоутворюючі одиниці).

### Контрольні запитання

1. Умови вирощування клітин тварин. Вимоги до факторів зовнішнього середовища.
2. Живильні середовища для культивування клітин тварин. Їх класифікація.
3. Інтерферони, їх класифікація, джерела отримання, застосування.
4. Технологія виробництва інтерферону.
5. Контроль якості людського лейкоцитарного інтерферону.

Рекомендована література: [1], с. 141-147 ; [4], с. 124-131.

## 9 ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 9

Тема: Промислове виробництво біопрепаратів на базі культури тканини і клітин рослин.

Мета: Приготувати на основі клітин рослинного походження препарат і провести його стандартизацію.

### Основні теоретичні відомості

Перші спроби вирощування в штучних умовах шматочків рослинних тканин були здійснені Rechinger(1893), який укорінював в сирому піску фрагменти рослинних органів розміром не більше 20 мм з ізольованих бруньок ряду видів рослин.

Велике значення для вирішення проблеми використання культури тканин вищих рослин для промислових цілей у фармації має питання здатності диференційованих клітин відтворити в умовах штучної культури біохімічні процеси, що призводять до синтезу органічних речовин вторинного походження. Інакше кажучи, виникає проблема існування або відсутності тотипотентності клітин. У першому випадку усі клітини являються потенційно і генетично однаковими, здатними до автономного існування і можливостями здійснювати усі складні біохімічні процеси, властиві цілій рослині. При цьому клітини в культурі тканин лікарських рослин очевидно здатні синтезувати алкалоїди, глікогіди, і інші біологічно активні речовини.

Творці клітинної теорії організмів Schleiden (1838) і Schwann (1839) перші висловили думку про потенційну однотипність клітин, що складають рослинний і тваринний організм, тобто ними було сформульовано поняття про тотипотентність клітин.

Дані сучасних дослідників дозволяють говорити про те, що є тотипотентність клітин в сенсі їх здатності до біосинтезу вторинних речовин, у тому числі алкалоїдів, тобто калусні тканини, отримані від будь-якого органу рослини, здатні їх накопичувати, але міра збагачення тканин і поживного середовища цими з'єднаннями різна. Походження культури тканини впливає як на якісний склад речовини, що виробляються нею, наприклад, алкалоїдів, так і на їх кількість. Тому не кожен орган рослини є зручним для отримання від нього промислової культури алкалоїдних рослин.

Культура тканин лікарських рослин - порівняно молода галузь науки. Уперше культуру тканин лікарського виду барвінку рожевого (*Vincetoxicum*) отримав Уайт (1945) від корончатого галла. Була виявлена здатність до біосинтезу тропанових алкалоїдів із ізольованих коренів дурману (Donald,

1957), беладони (Moreno, 1969). У кінці п'ятдесятих років був запропонований метод масового вирощування клітин і тканин рослин зануреним способом для отримання великих кількостей матеріалу в особливих пристроях – ферментаторах.

Основним фізичним чинником для вирощування і підтримки культур клітин рослин є постійна температура. Для невеликого числа калусних культур цілком придатний стандартний, мікробіологічний термостат, працюючий в режимі  $25 \pm 2$  °C. Для великих колекцій калусних культур потрібна термостатована кімната з температурою 25 °C. Для культивування найбільш гнучкою і зручною є система полиць з трубчастими люмінесцентними лампами над ними. Така система придатна для вирощування культур у будь-якому світловому режимі.

Культури з вимогами до темряви вирощують в тій же кімнаті, але в темній шафі.

Для перемішування і аерації суспензійних культур найдешевшою системою є гойдалки з круговим обертанням, що мають відкриту платформу, які можна пристосувати для колб різного діаметру.

Такі гойдалки поміщають до термостатованої кімнати з необхідним світловим режимом. Кращий контроль за умовами вирощування досягається в закритих термостатах з круговим обертанням.

Такі гойдалки забезпечені лампами денного світла, вмонтованими в кришку, і ручками управління, що дозволяють встановлювати різну тривалість світлового дня. Калусні культури зазвичай вирощують в чашках Петрі, в скляних пробірках, скляних конічних колбах або пластмасових баночках з кришкою, що загвинчується. Суспензійні культури зазвичай вирощують в скляних конічних колбах або ферментаторах періодичної або безперервної дії.

Компоненти середовища для вирощування калусних і суспензійних культур рослин можна розділити на шість груп, що зазвичай відбиває порядок приготування і зберігання концентрованих початкових розчинів. Це наступні групи:

- основні неорганічні поживні речовини(макроелементи);
- мікроелементи;
- джерело заліза;
- органічні добавки (вітаміни);
- джерела вуглецю;
- органічні добавки (регулятори зростання рослин).

Склади деяких поживних середовищ приведені в таблицях 6 і 7.

Таблиця 6 – Середовище Мурасиге-Скуга

Компоненти	Молярність в середовищі	Концентрація початкового розчину, мг/л
Основні неорганічні поживні речовини		
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	$2,06 \cdot 10^{-2}$	33000
$\text{KNO}_3$	$1,88 \cdot 10^{-2}$	38000
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$3,00 \cdot 10^{-2}$	8800
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$1,50 \cdot 10^{-2}$	7400
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	$1,25 \cdot 10^{-2}$	3400
Джерела мікроелементів		
KI	$5,00 \cdot 10^{-6}$	166
$\text{H}_3\text{BO}_3$	$1,00 \cdot 10^{-4}$	1240
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	$9,99 \cdot 10^{-5}$	4460
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$2,99 \cdot 10^{-5}$	1720
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$1,00 \cdot 10^{-6}$	50
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	$1,00 \cdot 10^{-7}$	5
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$1,00 \cdot 10^{-7}$	5
Джерело заліза		
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$1,00 \cdot 10^{-4}$	5560
$\text{Na}_2 \text{ ЭДТА} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$1,00 \cdot 10^{-4}$	7460
Органічні речовини		
Мезоінозит	$4,90 \cdot 10^{-4}$	20000
Нікотинова кислота	$4,66 \cdot 10^{-6}$	100
Піридоксин – HCl	$2,40 \cdot 10^{-4}$	100
Тіамін – HCl	$3,00 \cdot 10^{-7}$	100
Гліцин	$3,00 \cdot 10^{-8}$	400
Джерела вуглецю		
Сахароза	$8,80 \cdot 10^{-2}$	додавати у вигляді порошку (30 г/л)

Таблиця 7 – Модифіковане середовище Шенка-Хильдебранта (рН 6,7)

Компоненти	Молярність в середовищі	Концентрація початкового розчину, мг/л
Основні неорганічні поживні речовини		
$\text{KNO}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$2,5 \cdot 10^{-2}$	101000
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$1,5 \cdot 10^{-3}$	24640
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	$2,5 \cdot 10^{-3}$	14680
Мікроелементи		

Продовження таблиці 7

Компоненти	Молярність в середовищі	Концентрація початкового розчину, мг/л
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	$5,9 \cdot 10^{-5}$	1320
$H_3BO_3$	$1,3 \cdot 10^{-4}$	500
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	$3,5 \cdot 10^{-6}$	100
KI	$6,0 \cdot 10^{-6}$	100
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	$8,0 \cdot 10^{-7}$	20
$Na_2MoO_4$	$4,1 \cdot 10^{-7}$	10
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	$4,2 \cdot 10^{-7}$	10
Джерело заліза		
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	$5,4 \cdot 10^{-5}$	1500
$Na_2$ ЕДТА	$5,4 \cdot 10^{-5}$	2000
Органічні речовини		
Тіамін – HCl	$1,5 \cdot 10^{-5}$	500
Нікотинова кислота	$4,1 \cdot 10^{-5}$	500
Піридоксин – HCl	$2,4 \cdot 10^{-6}$	50
Мезоинозит	$5,6 \cdot 10^{-3}$	–
Джерела вуглецю		
Сахароза	$8,8 \cdot 10^{-2}$	–

Середовища Мурасиге-Скуга і Шенна-Хильдебрандта відносяться до найбільш вживаних в роботі з культурами клітин рослин і виявилися ефективними для зростання різних одно- і дводольних рослин. Їх вважають середовищами з високим вмістом солей.

Для приготування агаровмісних середовищ додають агар до кінцевої концентрації 6-10 г/л. При роботі з культурами клітин рослин важливо використовувати агар хорошої якості, придатний для бактеріологічних робіт.

Необхідно відмітити, що розчини неорганічних речовин можуть зберігатися впродовж 1 місяця при плюс 4 °С, тоді як вітаміни слід розлити порціями по 10 мл і зберігати в замороженому стані при мінус 20 °С. Початкові розчини регуляторів зростання рекомендується готувати невеликими об'ємами перед вживанням.

Мінімальний час, необхідний для стерилізації середовища способом автоклавування, залежить від об'єму середовища в колбі. Наприклад, для об'ємів 250-500 мл автоклавування проводять 25 хв. при 120 °С. Деякі регулятори зростання рослин термолабільні, тому їх не можна автоклаувати. В цьому випадку готують середовище, як описано вище, але без додавання цих речовин. Після того, як колба охолоне (для агаризованих середовищ

досить 40 °С), додають розчин термолабільного компонента, доведений до необхідного рН, заздалегідь профільтрувавши його через мембранний фільтр з діаметром пір 0,45 мкм. Для приготування напівтвердих середовищ агар в готове середовище вносять перед автоклавуванням.

Агаризоване або рідке готове середовище не рекомендується зберігати довго. Проте, якщо це необхідно, то його зберігають при 4 °С.

Твердофазний спосіб культивування здійснюють на твердих або напівтвердих середовищах. У усіх випадках для отримання культури клітин рослин процедура розпочинається з узяття в асептичних умовах шматочка тканини від молоді здорової рослини, найчастіше - листя, ствол (рис.22). Тканину поміщають в середовище, що містить відповідні поживні речовини і чинники зростання із забезпеченням світла, вологості, температури.

Як видно з приведених даних, для рослинних клітин важливе значення мають солі азоту, калію, магнію, фосфору і ряд мікроелементів. З органічних речовин, окрім вуглеводів, важливі окремі амінокислоти, вітаміни і фітогормони.

Зростання відбувається у вигляді каллусу, який необхідно перенести на свіже поживне середовище. При культивуванні на агаризованому середовищі шматочок калусу повинен мати масу близько 60-100 мг; такі шматочки тканини переносять на 30-40 мл свіжого середовища. Калусна тканина, що виросла на поверхні твердого поживного середовища, має аморфну структуру. При тривалій пересадці калусні тканини, що мають первинну білу, жовтувату, зелену або червону пігментацію, можуть втрачати забарвлення, а структура тканини стає більш рихлою. Хімічний склад калусної тканини зазвичай відрізняється від складу відповідного органу рослин (табл. 8).

Таблиця 8 – Хімічний склад (%) біомаси культури тканини і кореня женьшеню

Состав	Біомаса культури тканини	Корінь
Азот загальний	4,82	2,73
Білковий	1,18	1,68
Ліпіди	1,61	2,34
Редукуючі речовини	2,28	-
Сахароза	1,08	-
Крохмаль	5,40	3,07
Геміцелюлоза	4,46	6,03
Пектинові речовини	9,84	10,27
Панаксозиди (А + Y)	3,31	3,12

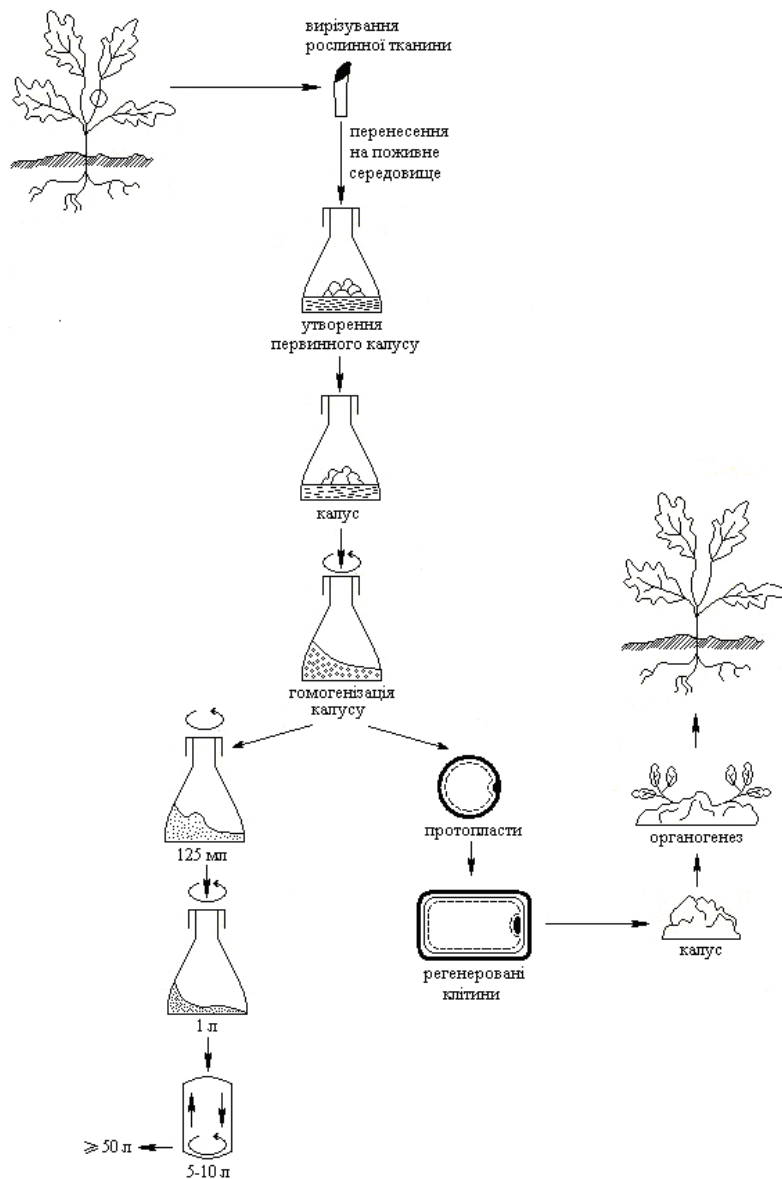


Рисунок 22 – Етапи отримання культури клітин рослин і регенерації цілої рослини з окремої клітини і протопласту

Калусні клітини після ряду ділень переходять на звичайний для цієї рослини цикл розвитку, тобто починається їх диференціювання. Цей процес регулюють гормони.

Культивування клітин рослин на твердих середовищах здійснюють також у різних механізованих установках.

Клітини женьшеню можна культивувати і глибинним способом в рідкому середовищі (суспензійне культивування).

Для цього необхідно отримати лінії клітин, що утворюють невеликі агрегати (по 5-10 клітин). Для глибинного культивування більше придатні рихлі калусні тканини. Трансплантат бажано обробляти пектиназою. Рекомендується використовувати середовища, що містять 2,4-дихлорфеноксиоцтову кислоту і не містять іонів  $\text{Ca}^{2+}$ . В таких середовищах агрегати клітин не утворюються. Перед пересіванням первинну культуру фільтрують через два шари марлі або через сита (нейлонові, металеві), щоб відокремити великі агрегати калусні тканини і залишки трансплантата. На утворення клітинних агрегатів також впливає інтенсивність перемішування середовища, оскільки клітини надзвичайно чутливі і швидко лізуються. Більшість клітин гинуть.

Глибинне культивування можна здійснювати в колбах на гойдалці при частоті обертання  $1,6-2 \text{ c}^{-1}$ .

Для культивування рослинних клітин використовують також спеціальні металеві або скляні ферментатори різної конструкції (з мішалками або барботинного типу). Режим ферментації періодичний або безперервний, головним чином хемостатний.

Аерацію культуральної біомаси здійснюють стерильним повітрям через барботер. В ході культивування клітин рослин регулюють температуру ( $25-37$ ) °C, рН і окислювально-відновний потенціал.

Процес культивування ведуть до тих пір, поки йде інтенсивний синтез цільового продукту і доки в середовищі не будуть вичерпані поживні речовини. При визначенні кінця культивування необхідно враховувати дані мікроскопічного контролю стану культури, відсутність сторонньої мікрофлори, концентрацію основних поживних речовин біомаси, цільового продукту, рН.

Необхідно відмітити, що рослинні клітини ростуть і розмножуються значно повільніше, ніж клітини мікроорганізмів. Час їх подвоєння 1-3 доби. Процес культивування рослинних клітин займає 2-3 тижні, що підвищує вимоги до забезпечення асептичних умов.

Нині методом культивування рослинних клітин отримують речовини вторинного метаболізму. Практичний інтерес представляють алкалоїди, терпеноїди, поліфеноли, ефірні олії, пігменти, антиканцерогени та ін.

Деякі вторинні метаболіти, що отримуються при культивуванні рослинних клітин, перераховані в таблиці 9.

Таблиця 9 – Продукти вторинного метаболізму, що отримуються при культивуванні рослинних клітин

Продукт	Застосування
Вінбластин або Вінкристин	Лікування лейкемії
Дигітин	Лікування серцево-судинних захворювань
Хініни	Лікування малярії
Кофеїн	Аналептик

Як у будь-якому біотехнологічному процесі, при отриманні метаболітів клітин культивуванням важливе значення має активність продуцента.

Останні досягнення клітинної інженерії показали, що у ряді випадків метаболіти, активно продукуючі рослинні клітини, можна отримати методом злиття протопластів двох вихідних рослинних клітин. При цьому гібридні клітини продукують не лише метаболіти вихідних рослин, але і абсолютно нові. Гібридизацію рослинних протопластів успішно здійснюють методом електростимуляції, злиття клітин або прямою мікроін'єкцією ДНК однієї клітини в іншу.

#### Контрольні запитання

1. Середовище для культивування клітин і тканин лікарських рослин.
2. Приготування середовищ.
3. Способи культивування.
6. Оцінка якості зростання суспензійних культур.
7. Отримання вторинних метаболітів.
8. Методи виділення і очищення БАР з рідкої або твердої поживних середовищ.

Рекомендована література: [1], с. 131-163 , [2], с. 206-220 , [3], с. 81-100.

## 10 ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 10

Тема: Система GMP у виробництві продуктів біосинтезу та контроль їх якості

Мета: Ознайомитися з системою забезпечення якості біологічних лікарських препаратів.

### Основні теоретичні відомості

Лікарські речовини підлягають обов'язковій сертифікації та стандартизації, що гарантує їх якість.

Система забезпечення якості базується на трьох необхідних компонентах:

- надійній системі реєстрації та ліцензування;
- незалежних випробуваннях готової продукції;
- гарантії якості лікарських засобів шляхом забезпечення під час виробництва правил GMP і незалежним контролем підприємств-виробників.

Для GMP по виробництву біологічних лікарських препаратів для людини розповсюджується на:

- мікробні культури за виключенням тих, що отримують методом ДНК-технології;
- мікробні і клітинні культури включно ДНК рекомбінантні і гібридомні;
- витяжки з біологічних тканин;
- репродукції живих організмів у ембріонах та тваринах.

При цьому отримують: вакцини, імунні сироватки, антигени, гормони та інші продукти ферментації.

Виробництво біологічних лікарських препаратів має свої особливості, які витікають із природи продуктів і характеру процесів. По-перше, виробництво біологічних лікарських засобів пов'язано з культивуванням клітин або екстракцією БАР із тканин і органів живих організмів, яким притаманна мінливість.

По-друге, речовини, які використовуються у процесах культивування, самі є живильним середовищем для росту контамінуючих мікроорганізмів.

По-третє, контроль біологічних препаратів здійснюється з використанням біологічних аналогічних методик, більш варіабельних, ніж фізико-хімічні.

В GMP наводяться вимоги до персоналу приміщень і устаткування, приміщень для тварин та догляду за ними, документації, виробництву

вихідних матеріалів, партіям посівного матеріалу і системі банків клітин, принципам роботи і контролю якості.

#### *Виробництво. Вихідні матеріали.*

1. Джерела, походження і придатність вихідних матеріалів мають бути чітко визначені. Якщо необхідні випробування потребують багато часу, може бути дозволена обробка вихідних матеріалів до отримання результатів випробувань. У таких випадках випуск кінцевої продукції обумовлений задовільними результатами випробувань.

2. Якщо необхідна стерилізація вихідних матеріалів, вона по можливості має бути термічною. Якщо необхідно, можуть бути використані інші методи для інактивації біологічних матеріалів.

#### *Партії посівного матеріалу і система банків клітин.*

1. Для запобігання небажаної зміни властивостей, що може відбуватися при багаторазовому повторному субкультивуванні, виробництво біологічних лікарських препаратів, які отримують за допомогою мікробних культур, клітинних культур або розмноженням у ембріонах і тваринах, повинно базуватися на системі головних і робочих партій посівного матеріалу та/або банків клітин.

2. Партії посівного матеріалу і банки клітин повинні адекватно характеризуватися на вміст забруднення. Партії посівного матеріалу і банки клітин повинні бути створені, зберігатися і використовуватися таким чином, щоб звести до мінімуму ризик забруднення або змінення.

3. Створення партій посівного матеріалу і банків клітин повинно здійснюватися в контрольованому середовищі для захисту партій посівного матеріалу і банків клітин та, якщо необхідно, персоналу. Під час створення партій посівного матеріалу і банку клітин ніякий інший живий чи інфікований матеріал не повинен оброблятися у той же зоні або тими ж людьми.

4. Контейнери для зберігання повинні бути герметично запаєні, чітко етикетировані і зберігатися при визначеній температурі.

5. Доступ до партій посівного матеріалу і банку клітин повинен контролюватися.

#### *Контроль якості.*

1. Важливу роль у забезпеченні сталої якості біопрепаратів відіграє контроль на різних етапах виробництва, критичних для якості.

2. Необхідний безперервний моніторинг деяких процесів виробництва (наприклад, ферментації).

3. Виробники повинні забезпечити, щоб виробничий процес виготовлення імунологічних продуктів пройшов валідацію, і забезпечити сталість якості від партії до партії.

Внутрішньоцеховий контроль якості включає роботи, пов'язані з відбором проб, нормативною документацією і випробуваннями. Основна задача відділу контролю якості (ВКЯ) – не допустити поставки неякісної продукції.

Контрольні запитання.

1. Вхідний контроль сировини і матеріалів, які надходять на підприємство.
2. Основні завдання відділа контролю якості (ВКЯ) підприємства, яке випускає готові лікарські засоби.
3. Система стандартизації лікарських засобів в Україні.

Рекомендована література: [3], с. 101-111.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Конспект лекцій з дисципліни: «Промислова біотехнологія» (для здобувачів вищої освіти спеціальності 226 «Фармація, промислова фармація») (Електронне видання) / Уклад.: Л.Ф. Горбас, В.П. Шапкін, Н.І. Пономаренко. – Київ: вид-во СНУ ім. В. Даля, 2024. – 175 с.
2. В.И. Чуешов и др. Промышленная технология лекарств, Т. 2 – Харьков.: Основа, изд. УкрФА, 1999 – 704 с.
3. Чуешов В.И. Промышленная биотехнология. Учебное пособие для студентов вузов. – Х.: Изд-во НФАУ: Золотые страницы, 2004. – 112 с.
4. В.А. Сергеев, Ю.А. Собко. Культуры клеток в ветеринарии и биотехнологии. – К: Урожай, 1990 – 152 с.

