

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

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

«До захисту в ЕК»  
Директор інституту(декан факультету)  
Наталія Грегірчак  
(підпис) (прізвище та ініціали)

« \_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2022 р.

«До захисту допущено»  
Завідувач кафедри  
Віктор Стабніков  
(підпис) (прізвище та ініціали)

« \_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2022 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА  
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ МАГІСТРА

зі спеціальності 162 «Біотехнологія та біоінженерія»  
(код та назва спеціальності)

освітньо-професійної програми «Фармацевтична біотехнологія»

на тему: «Біотехнологія пептидаз медичного призначення»

Виконала: здобувач II курсу, групи 02

Кобилинський Олександр Анатолійович  
(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Керівник Старовойтова Світлана Олександрівна  
(прізвище, ім'я та по батькові повністю)

(підпис)

Консультанти

\_\_\_\_\_  
(прізвище та ініціали)

\_\_\_\_\_  
(підпис)

\_\_\_\_\_  
(прізвище та ініціали)

\_\_\_\_\_  
(підпис)

\_\_\_\_\_  
(прізвище та ініціали)

\_\_\_\_\_  
(підпис)

Рецензент

Софілканич А.П.  
(прізвище та ініціали)

\_\_\_\_\_  
(підпис)

Я як здобувач(ка) Національного університету харчових технологій розумію і підтримую політику університету з академічної доброчесності. Я не надавав(-ла) і не одержував(-ла) недозволеної допомоги під час підготовки цієї роботи. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

Здобувач \_\_\_\_\_

(підпис)

Київ – 2022 р.

# НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь магістр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»  
(код і назва)

Освітньо-професійна програма «Фармацевтична біотехнологія»  
(назва)

**ЗАТВЕРДЖУЮ**

**Завідувач кафедри**

біотехнології і мікробіології

Віктор Стабніков

“ 03 ” листопада 2021 року

## **З А В Д А Н Н Я**

### **НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА**

Кобилинського Олександра Анатолійовича

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Біотехнологія пептидаз медичного призначення

керівник роботи Старовойтова Світлана Олександрівна, доц.

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від «02» листопада 2021 року № 863-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 1 лютого 2022 року

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент *Bacillus thuringiensis* IMB B-7324, цільовий продукт фібринолітичний фермент; геометричний об'єм ферментера 100

м<sup>3</sup>

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити): характеристика фібринолітичного ферменту, обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента, техніко-економічне обґрунтування, обґрунтування вибору технологічної схеми, специфікація обладнання, опис технологічної схеми, контроль виробництва

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема виробництва – 2 аркуші формату А1

Апаратурна схема виробництва – 2 аркуші формату А1

## 6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 03 листопада 2022 року

## КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Характеристика фібринолітичного ферменту	03.11.21-08.11.21	
2	Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	08.11.21-21.11.21	
3	Техніко-економічне обґрунтування	21.11.21-29.11.21	
4	Обґрунтування вибору технологічної схеми	29.11.21-10.12.21	
5	Специфікація обладнання	10.12.21-20.12.21	
6	Опис технологічної схеми	21.12.21-30.12.21	
7	Контроль виробництва	02.01.22-08.01.22	
8	Стадії виділення субстанції для виробництва Фібринолізин	08.01.22-16.01.22	
9	Оформлення кваліфікаційної роботи	16.01.22-01.02.22	
10	Оформлення графічної частини роботи	16.01.22-01.02.22	

Здобувач \_\_\_\_\_  
(підпис)

Олександр КОБИЛИНСЬКИЙ  
(ім'я та прізвище)

Керівник роботи \_\_\_\_\_  
(підпис) (ім'я та прізвище)

Світлана СТАРОВОЙТОВА

## РЕФЕРАТ

Магістерська робота присвячена проектуванню ділянки виробничого біосинтезу одержання фібринолітичного ферменту під час культивування *Bacillus subtilis* WR350 та готового лікарського засобу Фібринолізин.

Технологічний процес реалізується за допомогою допоміжних робіт (санітарна підготовка виробництва, підготовка аераційного повітря, приготування та стерилізація компонентів поживного середовища на кожному етапі) та основних робіт (вирощування посівного матеріалу в колбі на качалці, інокуляторі об'ємом 10 л. та виробничий біосинтез в ферментері об'ємом 100 л. та коефіцієнті заповнення ферментера  $K_{зф} = 0,6$  його геометричний об'єм 89,2 л.), що наведені в технологічній та апаратурній схемах. Також технологічний процес включає в себе центрифугування, осадження, гель-фільтрацію та розлив з подальшим сушінням та упакуванням готового продукту.

Кваліфікаційна робота оформлена та викладена на 112 стор. друкованого тексту, містить дев'ять таблиць, складається зі вступу, дванадцяти розділів, списку використаної літератури (54 джерела) та графічної частини (4 креслення формату А1).

**Ключові слова:** *фібринолітичні ферменти, Bacillus subtilis* WR350, *поживне середовище, біосинтез.*

## ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	4
ВСТУП	6
ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД	7
1.1. Загальна характеристика пептидаз медичного призначення	7
1.2. Сучасний поділ та класифікація ферментів	9
1.3. Потреба та завдання у тромболітичних ферментах	10
1.4. Наукові напрацювання вчених та методи вирішення завдань	12
Розділ 2. Характеристика кінцевого продукту	17
2.1. Аналіз фармакологічних властивостей Фібринолізіна та галузей використання	20
2.2. Обсяг ринку та очікувані темпи його розвитку	23
Розділ 3. Характеристика біологічного агента	26
3.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування	26
3.2. Морфолого-культуральні ознаки та фізико-біологічні ознаки біологічного агента	30
3.3. Таксономічний статус біологічного агента	35
Розділ 4. Техніко-економічне обґрунтування	37
4.1. Розрахунок потреби у фібринолітичному ферменті для випуску Фібринолізину	37
4.2. Розрахунок річної потужності виробництва	37
4.3. Розрахунок кількості виробничих циклів	38
4.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу	41
Розділ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми	43
5.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера	43
5.2. Обґрунтування вибору ферментера	44
5.3. Обґрунтування вибору підготовки приміщення	45
5.4. Обґрунтування вибору стадії підготовки повітря	52
5.5. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища	53

5.6. Обґрунтування стадій виділення субстанції для виробництва Фібринолізин	54
5.7. Обґрунтування стадії виділення субстанції для виробництва Фібринолізин	59
5.8. Обґрунтування вибору товарної форми випуску Фібринолізину	61
Розділ 6. Специфікація обладнання	63
РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	69
РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВ	82
9. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА ГОТОВОГО ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБ	94
9.1. Обґрунтування вибору підготовки первинної упаковки	94
9.2. Обґрунтування вибору діючих та допоміжних речовин	95
9.3. Обґрунтування вибору обладнання для мембранної фільтрації розчину фібринолізину	95
9.4. Обґрунтування вибору обладнання для сублимації фібринолізину	96
9.5. Обґрунтування вибору обладнання для наповнення ампул	96
9.6. Обґрунтування вибору обладнання запаяювання ампул	97
9.7. Пакування і маркування готової продукції	98
Розділ 10. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАНН	101
Розділ 11. Опис технологічної схеми отримання готового препарату	104
Розділ 12. Контроль виробництва	109
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ	113

## ВСТУП

На сьогодні в усьому світі фармацевтична і біомедична сфери являються об'єктами для науковців, оскільки необхідно вирішувати наслідки тривалого неправильного та незбалансованого харчування людини, а також її генетичні та набуті хвороби, кількість яких помітно зросла в останні десятиліття. Особливо важливим для людини є стан гомеостазу – механізму збереження рідкого стану крові. В тілі людини безупинно забезпечуються всі органи та тканини кровопостачанням, але при порушенні динамічної рівноваги відбувається посилене утворення тромбів припиняється потік крові до органів та спричиняється життєво небезпечний стан. Відповідно полягає потреба у негайному застосуванні фібринолітиків [1, 2]. Таким чином напрямком дослідження дії фібринолітичних ферментів є актуальним питанням сучасності. Так одним з таких джерел отримання фібринолітичних пептидаз може бути *Bacillus subtilis*.

Фібринолітичні пептидази відносяться до складу гідролітичних ферментів, що здатні розщеплювати нерозчинний фібрин. Вони здатні гідролізувати як природні субстрати (фібрин, фібриноген, гемоглобін), так і синтетичні. Також проявляється їх висока стабільність в широкому діапазоні значень рН (5-12) та температури (10-75 °C), що дає можливість для застосування їх в фармакології, медицині для запобігання розвитку і лікування серцево-судинних захворювань [3].

Від так це ще активніше мотивує дослідників до більш детального аналізу даного питання.

Обговорюючи медицину було б варто відмітити використання фібринолізину при лікуванні серцево-судинних захворювань антитромботичними засобами. Так фібринолізин (отриманий з плазми крові людини) входив до складу препарату – Фібринолізин, який має здатність розщеплювати нитки фібрину (діє як протеолітичний фермент) [4].

Так актуальною є робота присвячена синтезу фібринолітичного ферменту з біологічного агенту, який може замінити діючу речовину, отриману з плазми крові людини, при виробництві Фібринолізину.

**Новизною** даної роботи є використання оптимізованого середовища та умов культивування для продуцента *Bacillus subtilis* WR350, здатного синтезувати 5865 ОД/мл фібринолітичного ферменту, який може бути використаний як альтернативна діюча речовина лікарського засобу замість фібринолізину, отриманого з плазми крові людини.

## Розділ 1. Літературний огляд

### 1.1. Загальна характеристика пептидаз медичного призначення

Поглиблене вивчення ферментів дозволило відкрити окрему самостійну науку ензимологію, яка в наш час досить прогресивно розвивається та розкриває функції ферментів не тільки в організмі людини і тварин, але і в окремій живій клітині.

Можливо основною або і головною функцією ферментів є їх здатність різко підвищувати (в десятки та сотні мільярдів разів) швидкість хімічних реакцій, тобто виконання ферментами ролі каталізаторів величезного числа хімічних реакцій, здійснюваних щомиті у всіх живих системах. Більш того, ферменти являються регуляторами швидкості хімічних реакцій, суворо контролюючи всі процеси синтезу і розпаду індивідуальних хімічних компонентів клітини та і всього організму в цілому. Завдяки цій роботі ферментів живі системи можуть забезпечувати постійність внутрішнього середовища (гомеостаз).

Ферменти безперервно виконують важливі захисні функції, проводячи знешкодження як екзогенних (надходять із зовнішнього середовища), так і ендогенних (що утворюються в самому організмі) токсичних речовин.

Також ферменти активно використовуються в легкій, харчовій, мікробіологічній та фармацевтичній промисловостях, а також у генноінженерних дослідженнях та біотехнології.

Торкаючись медичних проблем вчення про ферменти, слід насамперед підкреслити, що один з перспективних напрямків дослідження ферментів - медична ензимологія - з'явилося логічним розвитком загального біологічного

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		КОБИЛИНСЬКИЙ			Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		СТАРОВОЙТОВА.					10
Реценз.					Літературний огляд Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Затверд.		СТАБНИКОВ					

вчення про ферменти. До теперішнього часу отримані переконливі докази, що сучасна біологія і медицина говорять мовою ензимології і що можливості застосування ферментів у медицині теоретично безмежні [1].

Від так поглиблено вивчаючи ферменти було досліджено пептидази, які активно розщеплюють тканинні та харчові білки до амінокислот шляхом гідролізу пептидних зв'язків [2]. Проте у виживанні живих організмів пептидази відіграють як і особливе значення, так і мають властивості пошкоджувати живі системи, тому і повинні знаходитись під контролем та прогресивно вивчатись. Найбільш важливим процесом є взаємодія ензимів з протеїнами, що пригнічують їх активність - "протеїновий інгібітор пептидази". Сам процес інгібування пептидаз протеїнами пов'язаний з каталітичним механізмом дії пептидаз, чи включанням не зв'язаних з ним блокувань активного центру та його оточення. Відповідно структурні елементи протеїнових інгібіторів, що відповідають за зв'язування з пептидазами, в основному включають N- або C- кінцеві послідовності, незахищені поліпептидні петлі (ланцюги), які діють незалежно або в комбінації з іншими елементами. В світі на даний час пептидази та їх інгібітори є найбільш активно досліджуваними протеїновими комплексами [3].

При самій біотехнології пептидаз слід враховувати на їх вплив як хімічний (джерела вуглецю, азоту та мінерального живлення, іонний склад середовища) так і фізичний (рН, температура, аерація, об'єм середовища тощо) фактор культивування. Для створення найбільш оптимального середовища для підвищеного синтезу фібринолітичних ензимів економічно вигідно використовувати найбільш легко доступні джерела азоту, вуглецю, та мінеральних сполук. Також при синтезі пептидаз слід враховувати концентрацію інокулуму, аерацію, температуру, рН та час культивування. Не менш важливим процесом є також очищення фібринолітичних ензимів, яке проводиться шляхом застосування осадження, як приклад сульфат амонію. Проте більш повне очищення можна отримати за допомогою методів

розділення, таких як гельфільтрація та іонообмінна хроматографія на різноманітних полімерних носіях (сефадекс, КМі DEAE-целюлоза, тощо) [2].

## 1.2. Сучасний поділ та класифікація ферментів

На сучасному етапі досліджень ферментів, залежно від типу хімічної реакції, було поділено на 6 класів, а саме:

- 1-й клас — оксидоредуктази - каталізують окисно-відновні реакції;
- 2-й клас — трансферази - каталізують реакції перенесення окремих атомів та груп від одних субстратів до інших;
- 3-й клас — гідролази - каталізують реакції гідролітичного розщеплення субстратів;
- 4-й клас — ліази - каталізують процеси відщеплення певних груп негідролітичним шляхом з утворенням подвійного зв'язку або приєднання будь-яких груп за місцем подвійного зв'язку;
- 5-й клас — ізомерази - прискорюють процеси ізомеризації органічних сполук;
- 6-й клас — лігази (синтетази) - каталізують реакції синтезу різних речовин, використовуючи енергію АТФ та інших макроергічних сполук.

Дані класи ферментів діляться ще на підкласи, а вони в свою чергу на підпідкласи. Підклас уточнює дію ферменту, вказуючи на природу субстрату. Ще більше конкретизує дію ферменту підпідклас, що вказує на природу субстрату чи акцептора, який бере участь у реакції [4].

Так як охопити розгляд всіх ферментів ми не в змозі, то в даному випадку розглянемо більш детальніше фібринолітичні пептидази, що відносяться до підкласів серинових та металопептидаз класу гідролаз, та їх роль в житті людини. Отож за нормальних фізіологічних умов у людини проходить рівновага між двома протилежними між собою процесами – згортанням крові та фібринолізом. Однак сучасний стиль життя та харчування впливають на організм людей не з кращого боку [5]. Згідно статистики в Україні щороку близько 420 тисяч людей помирають від

серцево-судинних хвороб [6]. Тому для нашої сучасності актуальним є вивчення та впровадження в медицині фібринолітичних ензимів. До них належать пептидази, що здатні розщеплювати фібрин, фібриноген та гемоглобін. Адже при значному згортанні крові можуть виникнути такі хвороби, як інфаркт міокарда, тромбоз судин головного мозку, легеневих артерій та ін. В основу кров'яних згустків входить фібрин, що утворюється завдяки протеолітичному ензиму тромбіну та в свою чергу призводить до тромбозів. А пептидаза плазмін – руйнує фібрин та відновлює кровообіг, що однозначно може врятувати життя багатьом [5].

### **1.3. Потреба та завдання у тромболітичних ферментах**

На даний час найдоступнішими для тромболітичної терапії є препарати, що включають тканинний активатор плазміноген, стрептокіназу та урокіназу. Проте ці агенти, на превеликий жаль, мають ряд деяких обмежень, такі як їх висока вартість та небажані побічні ефекти, які включають надмірну кровотечу та рецидив у місці залишкового тромбозу. Тому застосування мікробних фібринолітичних ферментів все більше привертає велику увагу для використання в медичних процедурах. Однозначно мікробні фібринолітичні ферменти допоможуть здешевити виробництво препаратів та дадуть змогу розвиватися не тільки в направленні ліків серцево-судинних захворювань, а й як функціональні харчові добавки та препарати для профілактики [7].

Розчинення тромбу досягається шляхом підвищення фібринолітичної активності крові. Прямим активатором плазміногену є протеолітичні ензими, що вивільняються з лізосом під час ушкодження клітин. А кінази вже безпосередньо каталізують перетворення плазміногену на плазмін. Лізокінази являються продуктами тканинного або мікробного походження (стрептокіназа, стафілокіназа тощо), діючи опосередковано через наявний у крові проактиватор плазміногену, внаслідок чого останній активується та взаємодіє з плазміном.

Однак, екзогенні ензими, будучи чужорідними для організму білками, швидко руйнуються або інгібуються в крові людини та володіють вираженою токсичністю. Усунення негативних аспектів їх дії досягають створенням так званих іммобілізованих ензимів – комплексів із декстраном, водорозчинним носієм, який захищає ензими від руйнування в організмі. Сучасні препарати, що поставлені на виробництво мають також дуже багато побічних та негативних наслідків для людини, коротку дію та неможливість повторного або систематичного використання. В даному випадку це є сильним поштовхом для дослідження та впровадження в біотехнологію нових фібринолітичних ферментів щоб покращити та змінити ситуацію, що склалася.

Провівши аналіз сучасної літератури щодо біотехнології пептидаз медичного призначення, було виявлено виділення їх з різних джерел – з тварин (дощові черв'яки та змії), людини, грибів (*Fusarium oxysporum*, *Armillaria mellea*, *Mucor sp.*) та бактерій з ґрунту, з прісної та морської води, з рослин (*Serratia*, *Streptococcus pyogenes*, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus natto*, *Actinomycetes*, *B. amyloliquefaciens*, *Vibrio vulnificus*) [8, 9, 10].

Відповідно при проведенні досліджень вченими було знайдено, що у представників роду *Bacillus* позаклітинна пептидаза синтезуються в цитоплазмі як препроензим та в процесі перетворюється в зрілий ензим вже ззовні клітини завдяки автопроцесінгу, що обумовлений обмеженим протеолізом. Крім того, поглиблене вивчення активації різних ензимів та їх преензимних форм пояснює, що пептидази мають чітку роль в посттранслокаційній активації різних секреторних ферментів [11].

Також фібринолітичні пептидази представників роду *Bacillus* мають характерну специфічність як до природних, так і до синтетичних субстратів. А для вивчення субстратної специфічності гідролітичних ферментів застосовують хромогенні субстрати. Їх перевагами є доступність, висока чутливість методів при їх використанні, а також можливість застосувати недороге обладнання – спектрофотометри і фотоколориметри, що

використовуються для контролю процесу ферментативного гідролізу. Так використання високо селективних пептидних хромогенних субстратів створює умови для ефективного вивчення окремих пептидаз в суміші з іншими ферментами. Також субстратний аналіз є потужним знаряддям для вивчення тонкої будови активних центрів ензимів [12].

#### **1.4. Наукові напрацювання вчених та методи вирішення завдань**

Вчені: Н. А. Нідялкова, О. В. Мацелюх та Л. Д. Варбанець особливу увагу приділили синтезу пептидази *Bacillus thuringiensis* IMB B-7324 з фібринолітичною активністю [13]. Даний мутантний варіант з складним протеолітичним комплексом був отриманий шляхом хімічного мутагенезу [14]. При цьому змінюючи тривалість культивування та умови, з'являлася можливість одержання пептидазних ензимів різної специфічності. Відповідно завдяки підбраному в ході досліджень оптимізованому середовищі було виділено фібринолітичну пептидазу *Bacillus thuringiensis* IMB B-7324 шляхом фракціонування сульфатом амонію, гель-фільтраційної та іонообмінної хроматографії на TSK-гелях – Тоуорpearl HW-55 і DEAE 650(M), та отримано очищений ензимний препарат активністю 87,9 од/мг білка, що в порівнянні з супернатантом культуральної рідини був вище в 19,9 разів та виходом за активністю 31 % [3].

Також в процесі дослідів *B. thuringiensis* було виявлено ефективний гідроліз ряду білкових субстратів еластазою – фібриноген, фібрин, казеїн, еластин, колаген, гемоглобін та желатин. А увесь широкий спектр субстратів, що піддалися гідролізації вказаною вище еластазою, відбувається завдяки її каталітичному центру та великим спектром амінокислот, що відповідають її первинній специфічності. По кінетичним параметрам ( $0,83\text{mM}(K_m)$  і  $20,1\text{ ммоль}\cdot\text{мл}^{-1}\cdot\text{хв}^{-1} (V_{\max})$ ) ензим не поступався панкреатичній еластазі, що робить його перспективним для практичного застосування [15, 16].

Варто згадати і опрацювання нового послідовного скринінгу щодо посиленого виробництва фібринолітичного ферменту *Bacillus sp. IND12* з

використанням методології твердого бродіння [17]. Де джерелами зразків для виробництва фібринолітичного ферменту слугували ґрунт із сільськогосподарського поля, риба та рис та була виявлена активність ферменту  $867,4 \pm 4,9$  та  $912,6 \pm 3,8$  U / г відповідно.

Також було отримано один з потужних фібринолітичних ферментів, що продукується *Bacillus cereus* IND1. Він був виділений з індійської їжі, рису. Твердотільне бродіння проводилося з використанням агрозалишків для виробництва фібринолітичного ферменту. Серед субстратів пшеничні висівки підтримували більшу продукцію ферментів і використовувались для оптимізованого виробництва ферментів за статистичним підходом. Центральна композитна конструкція призвела до отримання 3699 од / мл ферменту в присутності 0,3% екстракту яловичини та 0,05% Дигідрофосфату натрію при 100% 72 год бродіння [18, 19].

Також фібринолітичні ферменти було знайдено в різних продуктах харчування, таких як японський натто, тофуїо, корейський соєвий соус чеонгукцян, їстівний медовий гриб [20], китайський душ [21], індонезійський темпе [22], тайванська ферментована червона квасоля [23], Японська шиокара [24] та азіатська ферментована паста з креветок [25]. Ці фібринолітичні ферменти мають три антитромботичні дії, які включали перетворення плазміногену в плазмін, активацію t-РА і, нарешті, деградацію фібрину за рахунок фібринолітичної активності плазміну у поєднанні з наттокіназою [26].

Однак маючи на меті розроблення дешевого та простого середовища з ефективним і економічно доцільним виробництвом та впровадження оптимізації параметрів ферментації для його виробництва, було досліджено фібринолітичний фермент виділений з *Bacillus subtilis* WR350, мутанта, отриманого з *B. subtilis* HQS-34 за допомогою УФ-мутагенезу. Бюджетне середовище було розроблене шляхом використання ряду експериментів.

Так як висока ціна на соєвий пептон та екстракт дріжджів, які в даний час використовуються для виробництва фібринолітичних ферментів, сильно

обмежує його промислове застосування як вихідної сировини. Відповідно для заміни соєвого пептону використали, як альтернативу дешевому джерелу азоту, кукурудзяний порошок. А найвищу фібринолітичну активність 5865 од / мл було досягнуто за допомогою оптимізованого середовища у 100 літровому ферментері зі швидкістю аерації 1,0 об. / хв і швидкістю перемішування 200 об / хв за 42 години [27].

Сам кукурудзяний порошок являється побічним продуктом виробництва кукурудзяного крохмалю і є джерелом забезпечення важливих поживних речовин (наприклад, амінокислоти, білки, вітаміни, мінерали та мікроелементи) для росту мікробів [28]. І також для визначення, чи економічно ефективно виробництво фібринолітичного ферменту залежить від використання конкретного кукурудзяного порошку, було досліджено вплив різних типів даного субстрату, які були придбані у різних виробників у Китаї, на виробництво фібринолітичних ферментів. Відповідно результати показали, що використання кукурудзяного порошку різного походження призводило до подібної фібринолітичної активності та біомаси, що могло бути пов'язано із подібністю типів та концентрацій основних поживних речовин, присутніх у цих субстратах.

Для отримання фібринолітичного ферменту з *Bacillus subtilis* WR350 з застосуванням глибинного методу культивування було отримано ряд переваг перед іншими методами, а саме: більшу питому площу контакту; метод являється більш простішим ніж інші; більш ефективний та продуктивний; дає змогу забезпечити належні асептичні умови; є можливість для встановлення барботера, що дає змогу забезпечити належний рівень аерації.

Даний аеробний мікроорганізм потребує підготовки належного стерильного аераційного повітря для культивування бактерій, яке проводилося у пару етапів. Відповідно потрібне повітря для вирощування посівного матеріалу та виробничого культивування пропускають через фільтри грубої очистки (головні фільтри), так цим забезпечується відокремлення з повітря часток великих розмірів. Послідуючим етапом

повітря пропускають через індивідуальні фільтри (фільтри високої ефективності), де остаточно відділяються часточки малих розмірів, які все-таки пройшли через попередні встановлені фільтри. Також основними вимогами до фільтрувальних волокон є висока пилоємність і здатність до ефективного функціонування за малих перепадів тиску до та після фільтрів.

При виробничому процесі для унеможливлення від контамінування культуральної рідини однозначно проводиться підготовка миючих засобів з метою очищення обладнання від залишків попереднього культивування та бруду, який утворюється в процесі роботи.

Також варто врахувати, що окремі компоненти поживних середовищ по-різному реагують на термічний вплив. Відомо, що оліго- і полісахариди при певних умовах піддаються частковому гідролізу. Ступінь гідролізу залежить від джерела вуглеводу, температури і тривалості термічного впливу, рН середовища. Нагрівання їх при температурах вище 100 °C і тривала витримка призводять до карамелізації – конденсації з відщепленням 2-х і більше молекул H<sub>2</sub>O з утворенням забарвлених продуктів. Саме тому такі компоненти, як сахароза та кукурудзяний порошок, стерилізуються разом, але і окремо від солей.

Не менш важливим є також контроль виробництва, який включає в себе мікробіологічний контроль, визначення концентрації біомаси та активності фібринолітичних ферментів, визначення джерел вуглецю та азоту.

**Висновки.** Актуальною є потреба в вивченні та впровадженні нових біотехнологій пептидаз, їх здешевлення при виробництві, отримання якісного та кількісного ензиму для змоги у використанні не тільки в якості ліків, а і як добавки в харчуванні для профілактики та попередження хвороб. Постійний пошук синтезу пептидаз з фібринолітичною активністю з природніх джерел зумовлено знаходженням легкого та економічного культивування з змогою впровадження у виробництві, менші побічні наслідки для людини при застосуванні, збільшення часу та швидкості дії, легкості виведення з організму.

Як правило, на вироблення ферментів у біопроеесі суттєво впливають такі компоненти середовища, як джерела азоту та вуглецю, та фізичні фактори, такі як посівний матеріал, рН, температура та час інкубації. Вартість середніх компонентів є одним з найважливіших факторів у промисловій перспективі, оскільки приблизно одна третина вартості виробництва ферменту тісно пов'язується із зростанням середньої вартості. Так, використання недорогих субстратів, що доступні на місцях, може значно знизити собівартість продукції. Оптимізовані середовища посилюють фермент і зменшують собівартість продукції. Корисною є оптимізація параметрів процесу за допомогою однофакторного підходу; однак він не забезпечує взаємодії між змінними або факторами. Ефективним методом є статистична оптимізація, при якій компоненти середовища, що мають найбільш значний вплив на біопроеес, можуть бути ідентифіковані та оптимізовані. Вибір ідеального субстрату для виробництва ферментів залежить від доступності, його вартості та харчової цінності середовища.

З розглянутих вище оглядів ми тільки впевнюємось, що на сучасних етапах розвитку є “свіжі” альтернативи для впровадження та заміни вже існуючим виробництвам фібринолітичних ферментів. А результат дослідження фібринолітичного ферменту *Bacillus subtilis* WR350 показав, що постійне експериментування та впровадження з заміною більш дешевих субстратів при виробництві фібринолітичного ферменту є економічно вигідним і ефективним та демонструє високий потенціал у промисловому значенні.

## Розділ 2. Характеристика кінцевого продукту

Фібринолітики — група антитромботичних препаратів, які активують фібриноліз, завдяки чому нормалізують кровопостачання та усувають гіпоксію тканин. Фібринолітична система крові забезпечує розчинення внутрішньосудинних тромбів та відкладень фібрину в тканинах і порожнинах організму. Класифікують фібрінолітики за механізмом дії: препарати безпосередньої дії на фібриновий згусток з лізисом тромбу (фібринолізин, трипсин); препарати, які містять стрептокіназу та ін., що сприяють перетворенню неактивного профібринолізину (плазміногену) на активний фібринолізин, або плазмін (стрептоліаза, стрептодеказа, альтеплаза). Фібринолітичну активність виявляють також пірогенні препарати (пірогенал, продигіозан).

На сьогодні на ринку України представлений медичний препарат  
Фібринолізин (FIBRINOLYSINUM)

Загальна характеристика: *основні фізико-хімічні властивості*: аморфний порошок білого кольору, гігроскопічний;

*Склад препарату*: 1 пляшечка містить 20000 ОД (одиниць активності) фібринолітичної активності.

*Форма випуску*. Порошок ліофілізований для приготування розчину для ін'єкцій.

**Фармакотерапевтична група.** Антитромботичні засоби. Код АТС В01А D05.

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		КОБИЛИНСЬКИЙ			Характеристика кінцевого продукту	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		СТАРОВОЙТОВА.						9
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		СТАБНИКОВ						

**Фармакологічні властивості.** *Фармакодинаміка.* Фібринолізин - компонент крові людини, який одержують при ферментативній активації трипсином про фібринолізину плазми крові людини. У медичній практиці використо вується у вигляді безбарвних прозорих розчинів, які готують із порошку

безпосередньо перед застосуванням. Активність препарату визначають біологічним шляхом за здатністю спричиняти лізис свіжого стандар тного згустку фібрину протягом 30 хвилин при температурі +37<sup>0</sup>С і виражають в одиницях дії (ОД).

Фібринолізин відноситься до засобів, що діють на процеси згортання крові. Фібринолізин є фізіологічним компонентом природно ї протизгортувальної системи організму. Механізм дії Фібринолізину пов'язаний з його здатністю розщеплювати нитки фібрину (діє як протеолітичний фермент). Найбільший ефект Фібринолізину досягається при його ранньому застосуванні при патологічних процесах, які супроводжуються випаданням згустків фібрину та утворе нням тромбів. Ефективність знижується при більш давньому існуванні тромбу.

*Фармакокінетика.* На сьогодні ще не вивчалась.

#### **Загальні показання до застосування.**

Тромбоемболія легневих і периферійних артерій, тромбоемболія мозкових судин, інфаркт міокарда, гострий тромбофлебіт та загострення хронічного тромбофлебіту.

#### **Спосіб застосування та дози.**

При інфаркті міокарда та при тромбозах мозкових судин Фібринолізин застосовують протягом перших 6 годин, при тромбозах периферійних артеріальних гілок - до 12 годин,

при тромбозах периферійних вен - протягом перших 5-7 діб від початку тромбозу.

Фібринолізин вводять внутрішньо венно крапельно. Безпосередньо перед внутрішньо венним введенням вміст пляшки розчиняють в ізотонічному розчині натрію хлориду з розрахунку 100-160 ОД в 1 мл (слід мати на увазі, що Фібринолізин не містить стабілізатора і після розчинення може швидко втрачати активність при кімнатній температурі). До розчину обов'язково додають 10 000 ОД гепарину на 20 000 ОД Фібринолізину і суміш препаратів вводять внутрішньо венно краплинно з початковою швидкістю 10-12 крапель за 1 хвилину.

При добрій переносимості швидкість введення збільшують до 15-20 крапель за 1 хвилину. Загальна добова доза препарату - 20 000-40 000 ОД, а тривалість введення - не менше 3 годин (5 000 - 8 000 ОД/годину). Після закінчення введення Фібринолізину з гепарином продовжують терапію останнім (по 40 000-60 000 ОД на добу) протягом 2-3 діб з поступовим зниженням дози гепарину та переходом на антикоагулянти непрямої дії.

### **Побічна дія препарату.**

При внутрішньо венному введенні препарату можливі кровотечі, алергічні реакції (гарячка, гіперемія обличчя, кропив'янка).

Інколи може спостерігатися біль у грудній клітці, животі, зниження артеріального тиску, у зв'язку з чим рекомендується його повторне вимірювання під час інфузії.

**Протипоказання.** Геморагічні діатези, кровотечі, відкриті рани, гострі гепатити, цирози печінки, виразкова хвороба шлунку та 12-палої кишки, нефрити, фібриногенопенії, туберкульоз легенів у гострій формі, променева хвороба. Перенесена в

попередні 10 днів операція, травма, біопсія, пункція великих судин. Анафілактична реакція в анамнезі, періоди вагітності та годування груддю, дитячий вік.

Відносним протипоказанням є високий артеріальний тиск при мозкових ураженнях (систоличний - 220 мм рт. ст., діастолічний - 120 мм рт. ст.).

Якщо тиск вищий, призначення можливе лише за життєвими показаннями.

**Передозування.** У разі виникнення кровотечі введення препарату необхідно припинити. Внутрішньо венно призначають амінокапронову кислоту, плазму або донорську кров.

**Особливості застосування.** Лікування проводять під ретельним контролем системи згортання крові. Слід дотримуватися особливої обережності при призначенні препарату пацієнтам, вік яких перевищує 70 років. Одразу після закінчення введення фібринолізину визначають рівень протромбіну (зниження не більше 30-40%), час згортання крові (збільшення не більше ніж у 2 рази), фібриноген (але не менше 100 мг). Для зняття побічних явищ необхідно зменшити швидкість введення препарату, а при виразнішій реакції ін'єкцію припинити, ввести промедол, антигістамінні, при необхідності - відповідні серцево-судинні засоби. Досвід застосування препарату у дітей, вагітних та у жінок в період лактації, відсутній.

Взаємодія з іншими препаратами. На сьогодні не вивчалася.

**Умови зберігання та термін.** Зберігати за температури не більше 10°C. Термін придатності – 2 роки.

**Відпускається виключно за призначенням лікаря та рецептом.**

## **2.1. Аналіз фармакологічних властивостей Фібринолізіна та галузей використання**

На сьогоднішній час наше суспільство постійно зустрічається з новими викликами. Так згідно з дослідженнями *Global Burden of Disease* [6]. -

серцево-судинні захворювання є однією з основних причин смертності, а також фактором призведення до інвалідності в усьому світі. Дані захворювання стають характерними не тільки для людей похилого віку, а й молодшого. А станом на 2019 рік серцево-судинні захворювання виявлено у 523 мільйона населення світу, а кількість смертей досягла 18,6 мільйона. Україна ж є одним з основних лідерів цієї сумної статистики [7].

Тромбоз належить до серцево-судинних захворювань та являє собою утворення кров'яних згустків у кровоносних судинах. За звичайних умов утворення тромбу є важливим механізмом реакції організму на пошкодження судин. Так кров згортається, утворивши згусток, який перекриває кровотік та зупиняє втрату крові. Однак через низку хвороб механізм тромбоутворення може запускатися без кровотечі. А небезпека тромбозу полягає у тому, що тромби можуть відриватися і перекривати просвіт великих судин та призвести до летального випадку [8].

Відомо [9], що мікроорганізми синтезують різні протеази – з широкою специфічністю, які гідролізують декілька субстратів, або вузькою, які діють виключно на певний субстрат. Серед протеаз мікроорганізмів особливе значення мають ензими, що здатні розщеплювати важкорозчинні протеїни – колаген і еластин, які є складовими колагенових і еластинових волокон сполучної тканини, а також фібрин, що утворює кров'яні згустки судин. Тому протеази з колагеназною, еластолітичною і фібринолітичною активністю можуть бути використані в створенні медичних препаратів для лікування трофічних виразок, гнійних ран, опіків і для розчинення фібринових згустків, а також в інших галузях: м'ясопереробній – в процесах дозрівання м'яса, в складі миючих засобів для видалення нерозчинних білкових забруднень [10].

Продуценти протеолітичних ферментів знайдені серед найрізноманітніших груп мікроорганізмів: бактерій (*Bacillus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*), мікроміцетів (*Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium*), актиноміцетів (*Streptomyces*, *Actinomyces*). На їх основі створено виробництво багатьох

ферментних препаратів протеолітичної дії. Але найбільш перспективними мікроорганізмами-продуцентами протеаз є представники роду *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. mesentericus*, *B. licheniformis*), перевагами яких є невибагливість більшості видів до поживного середовища, висока технологічність, а також можливість довготривалого зберігання промислових штамів у вигляді висушених спор [11].

Фібринолітичні пептидази *Bacillus* відносяться до класу гідролітичних ферментів. Вони здатні гідролізувати як природні субстрати (фібрин, фібриноген, гемоглобін), так і синтетичні (хромогенні субстрати). А висока стабільність цих ензимів завдяки широкому діапазоні значень рН (5-12) та температур (10-75 °С) дає можливість для застосування їх в фармакології, медицині для запобігання розвитку і лікування серцево-судинних захворювань [3]. Проте мікробні фібрinolітичні ензими привертають все більшу увагу вчених як агенти тромболітичної терапії, завдяки термостабільності, відсутності небажаних ефектів після їх введення, а також меншими витратами на виробництво [12]. Це є хорошою передумовою виробництва нових фібрinolітичних ферментів для такого препарату як Фібринолізин.

Фібринолізин - компонент крові людини, який одержують при ферментативній активації трипсином профібринолізину плазми крові людини. У медичній практиці використовується у вигляді безбарвних прозорих розчинів, що готують із порошку безпосередньо перед застосуванням. Активність препарату визначають біологічним шляхом за здатністю спричиняти лізис свіжого стандартного згустку фібрину протягом 30 хвилин при температурі 37 °С і виражають в одиницях дії (ОД).

Фібринолізин відноситься до засобів, що діють на згортання крові. Фібринолізин є фізіологічним компонентом природної антизгортальної системи організму. Механізм дії препарату пов'язаний з його здатністю розщеплювати нитки фібрину (діє як протеолітичний фермент). Найбільший ефект засобу досягається при його ранньому застосуванні при патологічних

процесах, що супроводжуються випаданням згустків фібрину та утворенням тромбів. Ефективність знижується при більш давньому існуванні тромбу. Фармакокінетика даного препарату не вивчалася. Основні фізико-хімічні властивості: аморфний порошок білого кольору, гігроскопічний. Також слід використовувати тільки рекомендований розчинник. Приготований розчин не змішувати з іншими лікарськими засобами в одній ємкості.

У медичній практиці використовується у вигляді безбарвних прозорих розчинів, які готують із порошку безпосередньо перед застосуванням. Активність препарату визначають біологічним шляхом за здатністю спричиняти лізис свіжого стандартного згустку фібрину протягом 30 хвилин при температурі + 37°C і виражають в одиницях дії (ОД).

Фібринолізин відноситься до засобів, що діють на процеси згортання крові. Фібринолізин є фізіологічним компонентом природної протизгортувальної системи організму. Механізм дії Фібринолізину пов'язаний з його здатністю розщеплювати нитки фібрину (діє як протеолітичний фермент).

Найбільший ефект Фібринолізину досягається при його ранньому застосуванні при патологічних процесах, які супроводжуються випаданням згустків фібрину та утворенням тромбів. Ефективність знижується при більш давньому існуванні тромбу [13].

## **2.2 Обсяг ринку та очікувані темпи його розвитку**

Згідно статистики Українського центру суспільних даних в Україні щороку помирає майже 600 тисяч людей, що показує нам загальний стан здоров'я та рівень життя пересічних українців [12]. Дані щодо причин смерті є надзвичайно важливими для аналізу та розробки державної політики у сфері охорони здоров'я. Зокрема, ці дані є основою для оцінки потреби у певних розробках та впровадженнях потрібних препаратів, що так необхідні в першу чергу або у великих обсягах.

Статистика за 2018 рік вказує на захворюваність по причині хвороби системи кровообігу у 387029 населення України, що згодом призводить до смертності. Де причинами є атеросклероз інфаркт головного мозку, атеросклеретична хвороба серця, гострий інфаркт міокарда та ряд інших супутніх з кровообігом хвороб [12]. Зазвичай причина криється у надмірному накопиченні фібрину.

Тромбоемболія легеневих і периферичних артерій займає третє місце серед причин смерті і є частою причиною госпіталізації, смертності, інвалідності. Щорічно від тромбоемболії легеневих і периферичних артерій помирає 0,1 % населення земної кулі. Частота захворювань на тромбоемболію легеневих і периферичних артерій в Україні становить близько 50 тис. випадків на рік, в тому числі з летальним наслідком — близько 10 тис [15].

Тромбоемболія мозкових судин є причиною виникнення інсульту. У світі щороку інсульт виникає у понад 15 млн. людей і майже 5 млн. помирають унаслідок нього. Захворюваність на інсульт у різних країнах Європи становить 100–200 випадків на 100 тис. населення. В Україні щороку стається 100–110 тис. інсультів (понад  $\frac{1}{3}$  з них — у осіб працездатного віку), 30–40% хворих на інсульт помирають впродовж перших 30 днів і до 50% — впродовж 1-го року від початку захворювання, 20–40% хворих, що вижили, стають залежними від сторонньої допомоги (12,5% первинної інвалідності) і лише близько 10% повертаються до повноцінного життя [16].

В середньому на рік в Україні відмічають близько 40 тис. інфарктів, 20 тис. з яких потребують екстреного лікування [17].

В Україні поширеність на гострий тромбофлебіт та загострення хронічного тромбофлебіту становить від 50 до 160 випадків на 100 тис населення. Щодо світової статистики, то за різними даними, фіксується 1– 100 випадків на 10 тис осіб [18].

Так для тромболітичної терапії використовують препарати, що включають тканинний активатор плазміногену, стрептокіназу та урокіназу.

Однак ці агенти мають ряд деяких обмежень, такі як їх висока вартість та небажані побічні ефекти, які включають надмірну кровотечу та рецидив у місці залишкового тромбозу. Тому застосування мікробних фібринолітичних ферментів привертає велику увагу для використання в медичних процедурах. Так мікробні фібринолітичні ферменти допоможуть здешевити виробництво препаратів та дадуть змогу розвиватися не тільки в направленні ліків серцево-судинних захворювань, а й як функціональні харчові добавки та препарати для профілактики [18].

На вітчизняному ринку на сьогоднішній час представлені в доступності наступні препарати в якості антитромбічного засобу, які описані в таблиці:

<b>Препарати антитромбічного засобу</b>	<b>Виробник</b>	<b>Країна походження</b>
Фібринолізин [13]	ПрАТ «Біофарма»	Україна
Актилізе [19]	Берінгер Інгельхайм Фарма ГмбХ і Ко. КГ	Німеччина
Арикстра [20]	Аспен Нотер Дам де Бондевіль	Франція
Пентосан полісульфат SP 54 [21]	бене-Арцнайміттель ГмбХ	Німеччина
Фрелсі [22]	АТ «Фармак»	Україна

Отже, згідно статистичних даних в Україні кількість хворих на серцево-судинні хвороби становить 264 000 осіб щороку [14]. Враховуючи вказані вище препарати інших конкурентів, кількість хворих осіб ділимо на 6 виробників. В даному випадку маємо потребу забезпеченням даного препарату на вітчизняному ринку хворих осіб в кількості:  $264\ 000 / 6 = 44\ 000$  на рік. Також візьмемо 5% потреби ринку при виході на зарубіжний ринок. При щорічному виникненні інсульту в світі у кількості 15 млн. осіб [16] матимемо потребу:  $15\ 000\ 000 - 44\ 000 = 14\ 956\ 000$  осіб у світі. Вирахуємо 5% потребу зарубіжного ринку:  $14\ 956\ 000 * 5 / 100 = 747\ 800$  осіб на рік. В загальному обсязі маємо забезпечити препаратом 791 800 осіб на рік.

### Розділ 3. Характеристика біологічного агента

#### 3.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування

Продуцентів фібринолітичних пептидаз є досить багато, але при обґрунтуванні все ж варто враховувати економічну доцільність цільового продукту та саму активність пептидаз.

Відповідно при виборі продуцента обирали серед тих, у кого були наведені дані концентрації та специфічної активності фібринолітичних пептидаз.

У таблиці 2.1 наведено порівняння умов культивування, концентрації та активність цільового продукту різних продуцентів.

Оцінюючи активність ферментів різноманітних продуцентів в таблиці 2.1, а також враховуючи час культивування та компонентність поживного середовища, можна зробити висновок, що найбільш ефективними є мутант з штаму роду *Bacillus*.

Тому, проаналізувавши таблицю 2.1 зупинимось на найпродуктивнішому штамі серед наявних – *Bacillus subtilis* WR350, мутанті, отриманому з *B. subtilis* HQS-34.

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		КОБИЛИНСЬКИЙ			Характеристика біологічного агента	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		СТАРОВОЙТОВА.						10
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		СТАБНИКОВ						

Таблиця 3.1

## Порівняння різних продуцентів до синтезу фібринолітичних ферментів

Біологічний агент	Склад поживного середовища, г/л	Тривалість культивування, год	Особливості процесу біосинтезу	Активність ферменту, од/мг	Література
<i>B. thuringiensis</i> IMB B-7324	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> — 1,6; MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O — 0,75; ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O — 0,25; (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> — 12,0; мальтоза — 19,0;	48	42 °C, 200 об/хв., pH 6,5–7,0.	105	Оптимізація середовища для синтезу фібринолітичної пептидази <i>Bacillus thuringiensis</i> IMB B-7324 [Електронний ресурс]/ Н. А. Нідялкова, О. В. Мацелюх, Л. Д. Варбанець // <a href="#">Biotechnology</a> . - 2012. - Vol. 5, № 4. - С. 74-81. (стаття завантажується з даного ресурсу у pdf форматі) <a href="http://nbuv.gov.ua/UJRN/biot_2012_5_4_9">http://nbuv.gov.ua/UJRN/biot_2012_5_4_9</a>
<i>Bacillus sp. IND12</i>	коров'ячий гній – 5,0 пептон – 10,0 MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O – 0,093 C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> – 5,7	72	37 °C, 10000 об / хв., pH 7,0–8,0, 109,73% ВОЛОГИ.	4143	Novel Sequential Screening and Enhanced Production of Fibrinolytic Enzyme by <i>Bacillus sp. IND12</i> Using Response Surface Methodology in Solid-State Fermentation. <a href="#">Ponnuswamy Vijayaraghavan, P. Rajendran, Samuel Gnana Prakash Vincent, Arumugaperumal Arun, Naif Abdullah Al-Dhabi, Mariadhas Valan Arasu, Oh Young Kwon, and Young Ock Kim.</a> Published online 2017 Jan 17. doi: <a href="https://doi.org/10.1155/2017/3909657">10.1155/2017/3909657</a>

					<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5340989/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5340989/</a>
<i>Bacillus subtilis</i> WR350, мутант, отриманий з <i>B. subtilis</i> HQS-34	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> – 35,0 MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O – 2,0 Порошок кукурудзяний – 20,0	42	32 °C, 200 об/хв., pH 6,5–7,0.	5865	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6497689/">Cost-effective fibrinolytic enzyme production by <i>Bacillus subtilis</i> WR350 using medium supplemented with corn steep powder and sucrose.</a> Rui Wu, Guiguang Chen, Shihan Pan, Jingjing Zeng, Zhiqun Liang. Sci Rep. 2019; 9: 6824. Published online 2019 May 2. doi: 10.1038/s41598-019-43371-8 <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6497689/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6497689/</a>

На наступному етапі провели порівняння вартості поживних середовищ (табл. 2.2) з метою визначення їх рентабельності для культивування того чи іншого продуцента цільового продукту.

Таблиця 3.2

**Порівняння вартості компонентів поживних середовищ**

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації
<i>Bacillus sp. IND12</i>	коров'ячий гній – 5,0	0,35	0,00175	1
	пептон – 10,0	1060	10,6	2
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O – 0,093	65	0,006045	3
	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> – 5,7	90	0,513	4
	Вартість 1 л середовища – 11,12 грн			
<i>Bacillus subtilis WR350</i> , мутант, отриманий з <i>B. subtilis HQS-34</i>	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> – 35,0	90	3,15	4
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O – 2,0	65	0,13	3
	Кукурудзяний порошок – 20,0	14,27025	0,285405	5
	Вартість 1 л середовища – 3,56 грн			

- Примітки:** 1 – <https://prom.ua/ua/p14992065-navoz-korovij-sypets.html>;  
 2 – <https://prom.ua/ua/p151987939-pepton-fermentativnyj.html>;  
 3 – <https://prom.ua/p756858204-magnij-sernokislyj-semivodnyj.html>;  
 4 – <https://prom.ua/ua/p5251530-saharoza.html>;  
 5 - <https://russian.alibaba.com/product-detail/spray-drying-corn-steep-liquor-for-fermentation-60831752609.html>.

З табл. 2.2 бачимо, що вартість середовища для культивування штаму *Bacillus subtilis WR350*, мутанта, отриманого з *B. subtilis HQS-34* у 3,12 рази

нижча у порівнянні з штамом *Bacillus sp. IND12*, але все ж не враховано продуктивність штамів. Щоб остаточно обрати найефективніший біологічний агент, розраховували умовну вартість 1 ОД цільового продукту (табл. 2.3).

Таблиця 3.3

### Умовна вартість продукту

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища, грн	Концентрація цільового продукту, ОД/мг	Умовна вартість 1000 ОД цільового продукту, грн/ОД	Тривалість культивування, год	Кількість утвореного ферменту за годину, ОД/год
<i>Bacillus sp. IND12</i>	11,12	4143	2,68	72	57,5
<i>Bacillus subtilis</i> WR350, мутант, отриманий з <i>B. subtilis</i> HQS-34	3,56	5865	0,61	42	139,6

Умовна вартість цільового продукту визначається діленням вартості 1 л. середовища на концентрацію цільового продукту.

Економічна складова у виробництві кінцевого продукту відіграє важливу роль, і враховуючи продуктивність штамів з табл 2.3 бачимо, що ефективнішим і економічно доцільнішим є виробництво фібринолітичного ферменту під час культивування *Bacillus subtilis* WR350, мутанта, отриманого з *B. subtilis* HQS-34

### 3.2. Морфолого-культуральні ознаки та фізико-біологічні ознаки біологічного агента

*Bacillus subtilis* – це грампозитивна паличкоподібна ґрунтова бактерія (сінна паличка, трав'яна бацила), як і всі представники роду, утворює ендоспори. Розміри її коливаються в межах 3-5x0,6 мікрон.

Вперше була описана в 1835 році Еренбургом як *Vibrio subtilis*, в 1872 була перейменована Коном на *Bacillus subtilis* та стала типовим видом роду.

В українській літературі трапляється назва «сінна паличка» через те, що культури накопичення цього мікроорганізму отримують з сінного екстракту.

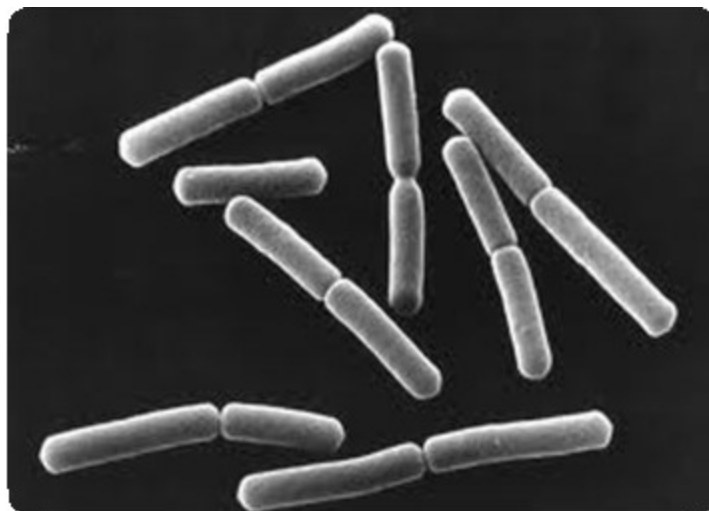


Рис. 3.1. Мікрофотографія *Bacillus subtilis*

За формою клітини *Bacillus subtilis* видовжені, вузькі (3 – 5X0,6 мікрон) палички, здатні до утворення стійких до несприятливих дій ендоспори (екстремальних температур, висушування, іонізуючого випромінювання, хімічних. За Грамом фарбуються в фіолетовий колір (позитивно).

Геном *Bacillus subtilis* представлений кільцевою дволанцюговою молекулою ДНК розміром 4214814 пар основ і містить 5279 генів, з яких 5163 кодують білки. Вміст ГЦ в ДНК агентів). Ендоспори овальні, не перевищують розміру клітини, розташовані центрально. Бактерії є рухливими і володіють джгутиками, які розташовані перетрихально у цих бактерій становить 45 %.

Штам не росте в анаеробних умовах, не гідролізує сечовину, не продукує аргінінгідролазу, дає позитивну реакцію Фогес-Проскауера, росте в присутності 7% натрію хлориду, гідролізує крохмаль і казеїн, розріджує желатин, ферментує глюкозу, арабінозу, ксилозу, маніт з утворенням кислоти без газу; редукує нітрати, знебарвлює метиленовий синій.

У складі клітинної стінки бацил виявлені тейхоєві кислоти. Вони являють собою гетерополімери гліцерофосфату або рибофосфату, *d*-аланіну. Тейхоєві кислоти *Bacillus subtilis* в експоненційній фазі росту містять близько 30%

всього запасу фосфору в клітині. Якщо цей елемент відсутній у зовнішньому середовищі, то тейхоєві кислоти можуть служити його джерелом. Вони приймають участь у регуляції проникнення різноманітних речовин із середовища в цитоплазму. Одна із основних функцій цих кислот – зв'язування двовалентних катіонів.

При вирощуванні на агаризованих середовищах спостерігається утворення колоній таких типів: плоскі, широкі, блискучі; тусклі, злегка маслянисті; зморщені з піднятою складчастою. Росте на МПА, МПБ, а також на середовищах, що містять рослинні залишки, на простих синтетичних поживних середовищах для гетеротрофів.

Бактерії виду *B. subtilis* є аеробами, більшість представників хемоорганогетеротрофи. *B. subtilis* найкраще росте при температурі 30 - 40°C та нейтральному рН середовищі, при достатньому доступі повітря. Використовує як єдине джерело вуглецю та енергії різні органічні сполуки. к субстрат окислення бацили використовують прості вуглеводи (моно- і дисахариди), деякі полісахариди (декстрин, крохмаль), органічні кислоти і спирти, а також складні високомолекулярні вуглеводи – пектин. Сінна паличка може розщеплювати ксилан (геміцелюлозу), що за своїм поширенням в природі займає друге місце після целюлози. Для більшості видів спороутворюючих бактерій роду *Bacillus* найкращими джерелами азотного живлення є пептон, гідролізат казеїну, автолізат дріжджів. *B. subtilis* має повний набір цитохромів, які також виявлені і в спорах. Тип цитохромної системи залежить від умов живлення і стадії культивування.



Рис.3.2. Ріст *Bacillus subtilis* на агаризованих середовищах.

При температурі інкубації 37°C клітини *B. subtilis* при вживанні 1 моля глюкози утворюють 4 молі АТФ, а при підвищенні температури і концентрації глюкози утворюється лише 2 молі АТФ на 1 моль глюкози. Вважається, що гліколіз при підвищенні температури переходить на цикл Еентнера-Дудорова.

Розмножується *B. subtilis* бінарним поділом клітини. Однією з постійних ознак у *B. subtilis* є утворення ендоспор в аеробних умовах. Клітини бактерії можуть утворювати спори, але спороутворення у них не є способом розмноження. Процес спороутворення вивчений у цього організму досить докладно та полягає в наступному.

Розвиток спор починається, коли популяція вегетативних клітин переходить в стаціонарну фазу. В період, перед споруляцією, в клітині знаходяться 2 нуклеотиди (0-стадія), які утворюють паличковидну структуру (1 стадія). Відбувається поява поперечної перегородки (септи) біля одного з полюсів клітини (2 стадія). В результаті формування септи від вегетативної клітини відділяється частина клітини, яка перетворюється в спору.

Менша клітина містить цитоплазму, ДНК, мембрану. Поступово мембрана великої клітини обвиває малу, і таким чином, мала перетворившись в

спору, стає якби поглинутою материнською клітиною (3 стадія). Проспора представляє собою протопласт, оточений двома шарами мембран. Далі відбувається формування нових поверхневих структур: між внутрішньою і зовнішньою мембранами закладається кортекс (4 стадія). На поверхні зовнішньої мембрани утворюється більш електронощільний шар – оболонка спори (5 стадія). 6 стадія – формування спори. Відбувається синтез дипіколінової кислоти. 7 стадія – лізис клітини і вивільнення спори. Весь процес споруляції триває 8 годин.

В останні роки спороутворюючі бактерії роду *Bacillus* як найбільш відомі представники екзогенної мікрофлори привертають увагу дослідників. Досить великий арсенал видів цього роду використовувався в якості терапевтичних речовин при лікуванні гострих і хронічних інфекцій: *B. cereus*, *B. polymyxa*, *B. brevis*, *B. megaterium*, *B. pumilus*, *B. coagulans* та ін. Однак найбільш розповсюдженні і вивчені види *B. polymyxa*, *B. subtilis* та *B. licheniformis*.

Ці мікроорганізми завдяки високим адаптивним властивостям широко розповсюдженні в природі і зокрема в тих об'єктах, з якими людина контактує найбільш близько. Завдяки цьому бацили постійно і в значній мірі кількості потрапляють в організм людини і, оскільки є стійкими до літичних і травних ферментів, зберігають життєдіяльність на протязі всього ШКТ.

Бацили не формують біоплівки, оскільки їх адгезивні властивості слабо виражені. Їх активність проявляється в кишечнику і пов'язана перед усім не з конкурентними взаєминами за місця прикріплення до слизової оболонки, а з високою антагоністичною активністю у відношенні до багатьох патогенних бактерій. В той самий час бактерії роду *Bacillus* не виявляють антагоністичної дії на представників нормальної мікрофлори, що створює умови для безконкурентного відновлення мікрофлори.

Антимікробна активність аеробних спороутворюючих бактерій роду *Bacillus* може бути обумовлена літичними ферментами, які вони синтезують.

Завдяки високій і різноманітній ферментативній активності бактерій роду *Bacillus*, які входять до складу біопрепаратів-пробіотиків, можуть відігравати

суттєву роль в стимуляції і збагаченні травної системи хазяїна необхідними ферментами. Так, наприклад, бацили характеризуються вираженою амілолітичною активністю, причому деякі амілази відрізняються тим, що при гідролізі крохмалю, який каталізують ці ферменти, утворюються сахариди б-конфігурації і олігосахариди не більше мальтотетрози. Характерною для бацил являється висока протеолітична активність.

Позитивну роль відіграє здатність бацил продукувати в значних кількостях екзоцелюлярні амінокислоти, в тому числі і незамінні (треонін, аланін, тирозин, гістидин, валін та ін.). Важливою також являється вітамінсинтезуюча активність бактерій роду *Bacillus*.

Наявність бацил в пробіотичній суміші мікроорганізмів сприяло значно ефективніше зниженню холестерину в крові тварин, чим при їх відсутності. На дослідах також спостерігали більш виражену здатність зв'язувати жирні кислоти і зменшувати утворення холестеринових міцел при наявності бактерії роду *Bacillus*.

### 3.3. Таксономічний статус біологічного агента

Згідно з IX виданням Керівництва Бергі з систематики бактерій (фенотипові систематика) *Bacillus subtilis* відносять до

царство – *Archaea*

відділ – *Firmicutes*

клас – *Bacill*

ряд – *Bacillalul*

порядок – *Bacillales*

родина – *Bacillaceae*

рід – *Bacillus*

вид – *Bacillus subtilis*

Положення згідно книги «Prokaryotes» (1999 – 2001 рр., філогенетична класифікація) рід *Bacillus* відносять до грамполозитивних бактерій, які утворюють одну групу, яка складається з двох підгруп. Рід

*Bacillus* входить до першої підгрупи «*Clostridium*» (з низьким вмістом ГЦ у ДНК).

Починаючи з 80-х років ХХ століття почали виділяти 3 царства серед живих організмів: архебактерії, еубактерії, еукаріоти. За філогенетичною систематикою еубактерії поділяються на 11 основних груп. Вид *Bacillus subtilis* належить до роду *Bacillus*, до першої групи – грампозитивні бактерії, до підгрупи *Clostridium*. Згідно з Х виданням Керівництва Бергі з систематики бактерій *Bacillus subtilis* відносять до:

Домен: Бактерії (*Bacteria*)

Відділ: *Firmicutes*

Клас: *Bacilli*

Ряд: *Bacillales*

Родина: *Bacillaceae*

Рід: *Bacillus*

До 1991 року в рід *Bacillus* входила велика кількість дуже несхожих видів, як на генотиповому рівні (відсоток ГЦ пар коливався від виду до виду в межах від 32% до 69%), так і на рівні фенотипу. Порівняння нуклеотидних послідовностей 16S рРНК 51 виду виявило принаймні 5 філогенетичних груп. У 1992 році з роду *Bacillus* виділили 3 ацидофільних і термофільних види в окремий рід *Alicyclobacillus*.

## Розділ 4. Техніко-економічне обґрунтування

### 4.1. Розрахунок потреби у фібринолітичному ферменті для випуску Фібринолізину

Препарат Фібринолізин використовують при таких показаннях, як: тромбоемболія легеневих і периферичних артерій, тромбоемболія мозкових судин, інфаркт міокарда, гострий тромбофлебіт та загострення хронічного тромбофлебіту. 1 пляшка препарату містить фібринолізину 20000 ОД. Виготовляється у формі порошка для розчину для ін'єкцій. Загальна добова доза препарату - 20000-40000 ОД, тривалість введення - не менше 3 годин. Препарат вводять внутрішньо венно краплинно з початковою швидкістю 10-12 крапель за 1 хвилину. При добрій переносимості швидкість введення збільшують до 15-20 крапель за 1 хвилину. Препарат призначається тривалістю лікування в одну добу [13].

Ми будемо синтезувати діючу речовину – фібринолітичний фермент. В подальшому можна спробувати розширити спектр застосування препарату в якості біологічної активної добавки для не тільки як лікування, але й для профілактики даних захворювань.

### 4.2. Розрахунок річної потужності виробництва

Розрахунок будемо проводити на основі знайдених нами статистичних даних (див. підпункти 1.1.2-1.1.3) для визначення потреби у фібринолітичному ферменті для виробництва препарату Фібринолізин. Нам відомо, що хворих на тромбоемболію легеневих і периферичних артерій, тромбоемболію мозкових судин, інфаркт міокарда, гострий тромбофлебіт та загострення хронічного тромбофлебіту становить 791 800 осіб (див. підпункти 1.1.2-1.1.3).

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		КОБИЛИНСЬКИЙ			Техніко-економічне обґрунтування	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		СТАРОВОЙТОВА.						5
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		СТАБНИКОВ						

Згідно інструкції [13] використання даного препарату передбачає застосування добової дози препарату - 20000-40000 ОД, тривалість лікування становить 1 добу. Відтак візьмемо максимальну добову дозу в 40 000 ОД та тривалістю лікування в одну добу.

Маємо:

$$40\,000\text{ ОД} \times 791\,800\text{ хворих} = 31\,672\,000\,000\text{ ОД фібринолітичного ферменту в рік.}$$

### 4.3. Розрахунок кількості виробничих циклів

Для забезпечення хворих антитромботичним препаратом Фібринолізин необхідно 31 672 000 000 ОД фібринолітичного ферменту в рік.

Розрахуємо, скільки культуральної рідини потрібно отримати за цикл ферментації, аби розрахувати кількість стадій приготування посівного матеріалу.

Зі статті [5] відомо, що після культивування *Bacillus subtilis* WR350, мутанта, отриманого з *B. subtilis* HQS-34, концентрація фібринолітичного ферменту становить 5865 ОД/мл за 42 год культивування. Вміст сухих речовин в готовому продукті  $CP_{\text{ГП}}$  складає частку 0,95.

Для проведення подальших розрахунків приймемо наступні початкові дані: час циклу роботи ферментера

$$T_{\text{ЦФ}} = T_{\text{Ф}} + T_{\text{ПО}} = 42 + 10 = 52\text{ год,}$$

де  $T_{\text{Ф}}$  – час культивування;  $T_{\text{ПО}}$  – час проведення підготовчих операцій (миття та огляд ферментера (2 год), перевірка на герметичність (2 год), стерилізація (2 год), охолодження (1,5 год), завантаження середовища (1 год), засів (0,5 год), вивантаження культуральної рідини (1 год));

$K_1$  – коефіцієнт запасу (втрати культуральної рідини або посівного матеріалу від нестерильних операцій 1,1 – 1,5) приймемо  $K_1 = 1,1$ . Сумарні втрати при виділенні готового продукту (сума всіх втрат на стадіях виділення готового продукту).

Мінімально можлива кількість робочих днів, які можуть бути використані для виробництва продукції, становить 30 днів, максимальна – 330 днів. Приймаємо кількість робочих трудоднів 270 ( $T_{рд}$ ). Інші дні у році використовуємо для технічної діагностики обладнання, а також для продовження синтезу ферменту, лише для використання у якості біологічної добавки або як (in bulk).

При кількості трудоднів рівному 270, кількість продукту на добу ( $G_{нтд}$ ) становитиме:

$$G_{нтд} = \frac{G_{нт}}{T_{рд}} = \frac{31\,672\,000\,000}{270} = 117\,303\,704 \text{ ОД/добу}$$

Кількість продукту на добу з урахуванням втрат за виробничий цикл ( $E_B = 15\%$ ):

$$G_{пд} = \frac{G_{нтд}}{1 - E_{св}} = \frac{117\,303\,704}{1 - 0,15} = 138\,004\,358 \text{ ОД/добу}$$

Кількість біомаси за цикл:

$$G_{цк} = \frac{G_{пд} \times T_{цф}}{24} = \frac{138\,004\,358 \times 52}{24} = 299\,009\,442 \text{ ОД/цикл}$$

Об'єм культуральної рідини, що зливається за один виробничий цикл:

$$V_{кр} = \frac{K_1 \times G_{цк} \times CP_{гп}}{P_{кр}} = \frac{1,1 \times 299\,009\,442 \times 0,95}{5865} = 53 \text{ л/цикл}$$

де  $K_1$  – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій.

Визначаємо кількість ферментацій (циклів) на рік:

$$K_{ц} = \frac{G_{нт}}{G_{цк}} = \frac{31\,672\,000\,000}{299\,009\,442} = 105,9 \text{ циклів}$$

Приймаємо 106 циклів.

При одержанні культуральної рідини потрібно врахувати також її втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які будуть становити 1%. Отже, кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом становитиме:

$$V_{\phi} = \frac{V_{кр}}{1 - E_{\phi}} = \frac{53}{1 - 0,01} = 53,5 \text{ л}$$

При вибраному коефіцієнті заповнення ферментера  $K_{зф} = 0,6$  його приблизний геометричний об'єм ферментера складе

$$V_{гф} = \frac{V_{ф}}{K_{зф}} = \frac{53,5}{0,6} = 89,2 \text{ л}$$

Знаходимо найближчий за номінальним об'ємом ферментер  $V_{нф} = 100$  л.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення ферментера:

$$K_{зф} = \frac{V_{ф}}{V_{нф}} = \frac{53,5}{100} = 0,54$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах (0,5-0,75), отже геометричний об'єм ферментера вибрано вірно.

#### 4.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері з робочим об'ємом  $V_{ф} = 53,5$  л. Найближчий за об'ємом стандартний ферментер  $V_{нф} = 100$  л.

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить 1% від об'єму поживного середовища [6].

Тоді кількість поживного середовища в ферментері буде становити:

$$V_{пс} = \frac{V_{ф}}{1 + X_{ф}} = \frac{53,5}{1 + 0,01} = 53 \text{ л}$$

де  $X_{ф}$  – доза посівного матеріалу для ферментера (0,01).

Кількість посівного матеріалу становить

$$V_{пмф} = V_{ф} - V_{пс} = 53,5 - 53 = 0,5 \text{ л.}$$

Таку кількість інокуляту можна одержати культивуванням у колбах. Для цього використовують колби об'ємом  $V_{колб} = 750$  мл та коефіцієнтом заповнення  $K_{зк} = 0,1$ .

Тоді кількість колб для отримання посівного матеріалу становитиме

$$N_{колб} = \frac{V_{пм2}}{V_{колб} \times K_{зк}} = \frac{500}{750 \times 0,1} = 6,7$$

Таким чином, для одержання посівного матеріалу необхідно 7 колб.

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу фібринолітичного ферменту у ферментері об'ємом 100 л з

коефіцієнтом заповнення 0,6 буде проходити у 3 етапи: приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування культури в колбах на качалках; приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування культури в інокуляторі об'ємом 10 л; приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 100 л.



Відповідно глибинне культивування ділиться на два основні способи культивування мікроорганізмів – періодичне та безперервне.

Безперервне культивування дозволяє зафіксувати культуру в певній фазі (експоненційній) за рахунок постійної подачі свіжого поживного середовища та відведення готової культуральної рідини.

Проте, періодичний спосіб культивування на практиці застосовується значно частіше. Це зумовлено меншою вірогідністю контамінації і простотою проведення процесу [24].

Оптимальними умовами для росту та метаболізму штаму *WR350 B. Subtilis* є температура 32 °С, та рівень рН 7,0 [23]. Це зумовлює ризик контамінації культуральної рідними мезофільними і ацидофільними мікроорганізмами. Тому, необхідно забезпечити асептичні умов при біосинтезі, чого неможливо досягти при поверхневому культивуванні. Такі умови забезпечуються попередньою стерилізацією обладнання та комунікацій, компонентів поживного середовища, та усіх компонентів і речовин які потрапляють в середину ферментера. Також для запобігання контамінації в ферментері створюється надлишковий тиск. Варто відмітити, що продуцент є суворо аеробом, тому необхідно забезпечити необхідний рівень аерації, його забезпечимо шляхом встановлення барботера в нижній частині ферментера. Достатній запас кисню важливий для росту та метаболізму *B. Subtilis* [25]. Якщо потреба клітин у кисні не буде задоволена, ріст клітин та аеробний синтез фібринолітичного ферменту будуть пригнічені [26].

Отже, спираючись на вище описане можна зробити висновок, що культивування даних мікроорганізмів проводимо періодичним глибинним способом з дотриманням асептичних умов.

## **5.2. Обґрунтування вибору ферментера**

Вибір ферментера залежить від особливостей способу культивування. Дані особливості розглянуті були раніше.

Однією з основних вимог до ферментаторів є асептичність умов та достатній для культивування продуцента рівень аерації.

Так для забезпечення та підтримання аерації в нижній частині ферментера встановлюється барботер, а для вищого коефіцієнту масообміну ферментатор повинен бути обладнаний механічним перемішуючим пристроєм. На сучасних виробництвах існує декілька типів перемішуючих пристроїв, але одним з найефективніших варіантів є мішалки турбінного типу. Турбінна мішалка має здатність підвищувати диспергацію кисню в культуральній рідині і таким чином інтенсифікувати аерацію [27].

При використанні турбінної мішалки можливе виникнення кругового руху рідини в апараті, відповідно і утвориться воронка. У такому випадку в апараті на невеликій відстані від стінок встановлюються відбивні перегородки, щоб уникнути утворення застійних зони при перемішуванні.

Отже, вибір конкретного ферментаційного обладнання залежить від вимог поставлених до проведення процесу культивування.

Згідно техніко-економічного обґрунтування для культивування нам необхідний ферментер об'ємом 100 л. Обираємо ферментер марки MODEL F3 MB від відомої та сучасної іспанської компанії Bionet, яка є провідним виробником в даній галузі [28]. Запропонований ферментер від цієї фірми дозволяє обладнати різноманітними типами мішалок, та встановити необхідні датчики та певну кількість патрубків.

### **5.3. Обґрунтування вибору підготовки приміщення.**

Враховуючи, що «Фібринолізин» це стерильний лікарський препарат, за принципами GMP, для уникнення потрапляння сторонньої мікрофлори у готовий препарат, виробництво готового препарату необхідно проводити в класі чистоти В з локальними зонами класу А. Це дасть змогу одержати безпечний лікарський засіб, що не містить сторонньої мікрофлори, та інших сторонніх частинок.

Після кожного циклу виробництва прибираємо приміщення та миємо обладнання, для видалення бруду та залишків препарату після виробництва. Це необхідно для забезпечення стерильності наступного циклу а також враховуючи невеликий розмір партій препарату, для можливості використання обладнання для фасування інших препаратів, що виробляє підприємство.

Щоденне прибирання включає миття підлоги, дезінфекційну обробку підлоги всієї ділянки, очищення та дезінфекційну обробку обладнання для видалення бруду, зниження кількості мікроорганізмів. Це є запобіжними заходами для попередження контамінації цільового продукту [12].

Генеральне прибирання включає миття та дезінфікуючу обробку підлоги, стелі, обладнання, повітроводів і вентиляційних камер, для видалення сторонніх мікроорганізмів, а також, наведення порядку в шафах, стелажах. Генеральне прибирання необхідно проводити щотижня, для знезараження сторонньої мікрофлори і забезпечення належного виробничого процесу [16].

Дозволена кількість мікроорганізмів буде наступною за вимог GMP: для класу чистоти В в 1 м<sup>3</sup> повітря 3500 частинок розміром 0,5 – 5 мкм, та взагалі не має бути частинок розміром 5 мкм, мікроорганізмів до 5, для вентиляції локальних зон класу чистоти А повітря повинно містити 3500 частинок розміром 0,5 – 5, та взагалі не має бути частинок розміром 5 мкм, і життєздатних мікроорганізмів повинно бути меншим за 1 [12].

У «чистих» приміщеннях повинний створюватися ламінарний потік повітря. Системи ламінарного повітряного потоку повинні забезпечувати рівномірну швидкість руху повітря: близько 0,30 м/с для вертикального.

Для підготовки вентиляційного повітря використовуємо трьох ступеневу систему очистки: фільтри грубого очищення G 4, фільтри тонкого очищення (F класу) та фільтри надтонкого очищення (HEPA фільтри) [12].

Спочатку проводимо забір повітря з навколишнього середовища на висоті 5-10 м. При визначенні місця забору повітря необхідно враховувати існуючі та можливі джерела аерозольних і газоподібних забруднень (димарі, автотранспорт, газоподібні промислові викиди, квітучі рослини та інше). Чим

чистіше буде повітря, яке відбирається, тим меншим є навантаження на фільтри, і тим більше вони не будуть змінюватись [13].

Відібране повітря потрапляє на фільтр грубої очистки, після чого подається на вентилятор. За допомогою вентилятора повітря проштовхується далі по повітропроводу на теплообмінники. На підприємстві, у системі вентиляції, встановлюємо два теплообмінники: один – нагрівач, інший охолоджувач, які використовуємо в залежності від пори року для того, щоб не відбувалось псування приладів та фільтруючих матеріалів. Теплообмінник нагрівач використовуємо в холодну пору року, він нагріває повітря до температури  $20\pm 2$  °C. Теплообмінник охолоджувач будемо використовувати в теплу пору року, коли потрібно знизити температуру повітря, яке подається у виробниче приміщення. В якості охолоджувального агента використовуємо воду температурою 4-7°C, оскільки вона є дешевою. Конденсат матиме температуру 12-14°C [12].

Далі повітря надходить на фільтр тонкої очистки F 7, де затримуються частинки діаметром 1 – 10 мкм, після чого подається на HEPA фільтр H12. Проте, в холодну пору року вологість повітря не висока, а для проведення технологічного процесу вона не має перевищувати 60%, і бути не меншою, ніж 30% (30% - найменша вологість повітря, яка оптимальна для роботи персоналу згідно норм охорони праці). Для забезпечення такої вологості, після фільтру тонкого очищення ставимо пароутворювач.

Далі в системі вентиляції може встановлюємо витратомір (TROX-клапан) для точної подачі повітря на фільтр H12. Після очищення на фільтрі H12, повітря потрапляє в чисте приміщення через дифузор, що використовується для його рівномірного розподілення по всьому приміщенні. В приміщенні буде ламінарний потік повітря, що входить зі стелі і виходить через перфоровану підлогу.

Для створення «надчистих» окремих зон усередині приміщення що відповідають вимогам до класу чистоти А розміщується спеціальні чисті камери типу M 825.000.000, призначені для проведення робіт у стерильній

атмосфері. Збірно-розбірна камера складається з уніфікованих елементів. Основний елемент камери — фільтрувальна лунка — містить вентилятор, фільтри грубого і тонкого очищення, освітлювальні лампи і світлорозсіюючі решітки.

Дезінфекція потрібна для знищення мікроорганізмів, надмірна кількість яких може призвести до зараження продукту.

Дезінфекція приміщень і поверхонь обладнання призводить, як правило, до зниження мікроорганізмів на 40 – 60% від їх початкового вмісту. При виборі дезінфікувальної речовини необхідно враховувати не тільки її бактерицидні та фунгіцидні властивості і спектр дії, але й можливу токсичність для людини. Треба враховувати також те, що тривале використання дезінфікувального засобу призводить до утворення стійких форм мікроорганізмів. Тому рекомендують дезінфікувальний засіб змінювати кожні 10 – 14 днів або застосовувати декілька типів [16].

Порівняємо такі дезінфікуючі засоби для персоналу, як «Стериліум», «Асептик спеціаль», «Мікроцид АФ У» та «Манорм Ф» (табл. 2.1.), які мають широкий спектр дії. Дані дезінфікуючі засобами не є концентратами. Згідно табл. 2.1. найдешевшими антисептичними засобом є «Асептик спеціаль» та «Манорм Ф». Вони містять різні діючі речовини, тому таким чином ми виключимо можливість появи резистентних штамів до них.

Для дезінфекції обладнання та приміщення порівняємо такі засоби, як «Полідез», «Дезекон», «Гембар», «Дацил максі», «Хлорантоїн» та «Дезактив М». Всі вони є концентратами.

Згідно табл. 2.1 однакові діючі речовини мають «Полідез» та «Дезактив М». Ми не можемо використовувати їх по черзі, оскільки є ризик появи резистентних мікроорганізмів, і ризик контамінації продукту, тому другий дезінфікуючий засіб обираємо з «Дезекону», «Гембару» та «Діацил максі» [6, 18].

Враховуємо, що найдешевшими є «Дезактив М» та «Діацил максі», а також те, що вони мають різні діючі речовини. Проте, слід враховувати не лише

ціну дезінфікуючого засобу, а і те, яка кількість необхідна для знезараження певної площі. Припустимо, що на 1 м<sup>2</sup> затрачається 100 мл засобу. Згідно табл. 2.1. найменшу концентрацію, що необхідна для дезінфекції мають «Дезактив М» та «Діацил максі».

**Біомой** – миючий засіб, що містить синтетичні поверхово-активні речовини та протеолітичні ферменти (лужна фосфатаза). Являє собою порошок світлого кольору (від білого до світло-жовтого). Розчинність у воді становить не менше 30 г/дм<sup>3</sup> при 20 °С. Водні розчини Біомою безбарвні, прозорі, виявляють миючі, емульгуючі та диспергуючі властивості, легко видаляють білково-жирову плівку з поверхонь технологічного обладнання, легко змиваються, не залишають нальоту. На відміну від інших засобів, Біомой виявляє високу миючу активність при температурі не вище (40±5) °С. Його розчини не ушкоджують об'єкти з нержавіючої сталі, чорного металу з антикорозійним покриттям, алюмінію, скла, гуми, полімерних матеріалів, кахлю, емалі. Засіб належить до малонебезпечних речовин (4 клас небезпеки по ГОСТ 12.1.007), не виявляє кумулятивні та алергенні властивості. У сухому вигляді подразнює шкіру і слизову оболонку очей [15].

Гарантійний термін зберігання 1 рік з дати виготовлення.

Рекомендується 0,5 % розчин Біомою температурою (40±5) °С для ручного миття технологічного устаткування, скляної і полімерної тари та інвентарю, а також (0,15-0,3) % розчини температурою (40±5) °С для циркуляційного миття технологічного обладнання і комунікацій та миття скляної і полімерної тари [14].

**Кальцинована сода.** Являє собою зневоднений вуглекислий натрій (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). Має вигляд білого дрібнокристалічного порошку, який добре розчиняється у воді. У водних розчинах кальцинована сода частково розкладається з утворенням їдкого лугу та гідрокарбонату, які зумовлюють миючі властивості. Гарячі (55±5) °С розчини кальцинованої соди добре обмилюють жирові забруднення на поверхнях та руйнують білки. При

зменшенні температури розчинів до  $(45\pm 5)$  °С їх мийна здатність різко падає. Розчини кальцинованої соди кородують об'єкти, які виготовлені з алюмінію.

Засіб належить до помірно небезпечних речовин (3 клас небезпеки по ГОСТ 12.1.007). У нативному вигляді та концентрованих розчинах подразнює шкіру і слизову оболонку очей.

Гарантійний термін зберігання 1 рік з дати виготовлення.

Рекомендується використовувати 0,5 % розчини кальцинованої соди температурою  $(45\pm 5)$  °С для ручного миття технологічного обладнання та інвентарю, а також (1-2) % розчини температурою  $(55\pm 5)$  °С для циркуляційного миття технологічного обладнання та комунікацій [15].

Розчини кальцинованої соди не призначені для миття обладнання, комунікацій та інвентарю, які виготовлені з алюмінію.

Для миття обладнання, інвентарю, комунікацій, тари доцільно використовувати миючий засіб Біомой, оскільки він менш агресивний до обладнання, та не становить загрози для персоналу.

Миючі і дезінфікуючі засоби необхідно контролювати щодо мікробіологічної чистоти. Їх розчини слід тримати в попередньо очищених контейнерах (тарі) й зберігати лише протягом установлених термінів (за винятком тих розчинів, що стерилізують).

Таблиця 5.1

## Порівняльна характеристика дезінфікуючих та миючих засобів, дозволених для використання МОЗ України

№	Торгівельна назва	Вміст діючих речовин	Показання для застосування	Концентрація робочого розчину, %	Ціна, грн./л
1	Кальцинована сода	зневоднений вуглекислий натрій ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ).	Миття та дезінфекція приміщень та обладнання працівників фармацевтичної, біотехнологічної промисловості	0,2	9
2	Дезактив-М	Алкілдиметилетилбензіламоній хлорид 4,5 – 5,5%	Дезінфекція виробничих приміщень та обладнання фармацевтичної та біотехнологічної промисловості	0,2	63
3	Асептик Спеціаль	Ізопропіловий спирт 61 – 65%; алкілдиметилбензіламоній хлорид 0,12 – 0,18%	Дезінфекція рук працівників промислових підприємств фармацевтичної, біотехнологічної галузі	-	125
4	Діацил МАКСІ	Дідецилдиметиламонію хлорид 4,5%	Дезінфекція приміщень та обладнання для фармацевтичного виробництва	0,25	96
5	Мікроцид АФ U	Етанол денатурований 25%; 1-пропанол 35%	Дезінфекція рук працівників фармацевтичної, біотехнологічної промисловості	-	200
6	Стериліум	2-пропанол 45,0 г., 1-пропанол 30,0 г., 51 тил сульфат мецитронію (INN) 0,2 г., міристиловий спирт	Дезінфекція рук працівників фармацевтичної, біотехнологічної промисловості	-	157
7	Біомой	алкілбензолсульфонат натрію (сульфанол) 5,0-8,0%; лужна протеаза 1,0-1,1%	Миття приміщень та обладнання у фармацевтичній, біотехнологічній промисловості	0,2	71
8	Гембар	Гуанідинова полімерна сполука 25%	Дезінфекція приміщень та обладнання промислових підприємств фармацевтичної, біотехнологічної галузі	0,5	150
9	Полідез	Перекис водню 5-15%; алкілдиметилбензіламоній хлорид 5-18; пар	Дезінфекція приміщень та обладнання промислових підприємств фармацевтичної, біотехнологічної галузі	0,5	120

#### 5.4. Обґрунтування вибору стадії підготовки повітря

*B. subtilis* WR350 – факультативний аероб. Відтак ми потребуємо підготовки стерильного аераційного повітря для культивування бактерій.

Для отримання стерилізованого повітря в боксах лабораторії, де безпосередньо працюють з посівною культурою та інокулятом, раціональним є використання ультрафіолетових ламп.

Сам процес підготовки та стерилізації аераційного повітря проводиться у пару етапів, задля ефективної очистки та запобіганню швидкого зносу фільтраційних матеріалів.

Відповідно повітря для вирощування посівного матеріалу та виробничого культивування пропускають через фільтри грубої очистки (головні фільтри), так цим забезпечується відокремлення з повітря часток великих розмірів. Послідуєчим етапом є пропускання через індивідуальні фільтри (фільтри високої ефективності), де остаточно відділяються часточки малих розмірів, які все-таки пройшли через попередні встановлені фільтри. Основними вимогами до фільтрувальних волокон є висока пилоємність і здатність до ефективного функціонування за малих перепадів тиску до та після фільтрів.

У випадку розташування обладнання у одноповерховій споруді висотою до 2 м. та врахуванні даху 1 м., враховується 3 м. на забір повітря. Відповідно забір повітря для фільтрів грубої очистки здійснюємо на висоті 5 м. В цьому процесі очищення повітря від пилу застосовуються пласкі тканинні фільтра грубого очищення де стискають їх в компресорах для подолання повітрям опорів під час очищення та надходження в апарати (фільтруючі матеріали, трубопроводи, культуральну рідину у ферментері). Відповідно повітря нагрівається до температури 220 – 250 °С. Потім саме повітря охолоджується до температури «точки роси» у теплообміннику, щоб відділити вологу у вигляді конденсату з повітря для попередження руйнування фільтруючих матеріалів фільтрів тонкого та індивідуального очищення, які є чутливими до неї. А сконденсована волога видаляється у ресивері, де одночасно проводиться зменшення пульсації руху повітря, яке може негативно впливати на роботу

подальших фільтрів очистки. Перед подачею на головні фільтри очистки повітря стабілізують підігріванням до потрібної нам температури паром у теплообмінниках.

Індивідуальні фільтри встановлюють безпосередньо перед ферментером, посівним апаратом або інокулятором. Головні фільтри заповнюють набивним волокном і встановлюють в цеху ферментації на головному повітряному колекторі стиснутого аераційного повітря. На цих фільтрах видаляється приблизно 98% мікроорганізмів, а на індивідуальних, які заповнюються надтонкими мембранами чи волокнами, затримується до 99,999% мікроорганізмів [29].

### **5.5. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища**

Для стерилізації поживних середовищ використовують різноманітні методи, наприклад, використання іонізуючого випромінювання, ультрафіолетового випромінювання, ультразвуку, рентгенівських променів, обробки середовищ різними антисептиками (окис етилену, перекис водню,  $\beta$ -лактон пропіонової кислоти і т. д.).

*Ультразвукові хвилі* мають бактерицидну дію у відношенні мікроорганізмів. Під його впливом відбувається зміна біохімічної активності бактерій, порушується проникність клітинних стінок, руйнуються клітинні структури.

*Стерилізація з використанням гамма-випромінювання* в наш час рідко використовується, тому що при радіаційно-індукуючій гемолітичній дисоціації хімічних зв'язків виникають вільно радикальні стани, які в результаті вторинних пострадіаційних процесів призводять до процесів, відмінних від вихідних речовин, в тому числі і токсичних.

*Ультрафіолетовий спосіб* стерилізації ґрунтується на використанні хвиль з довжиною хвилі 260 нм, проникаючи через стінку клітини, поглинається ДНК, в результаті чого процес відтворення мікроорганізму зупиняється. Даний метод не дозволяє ефективно забезпечити стерилізацію середовища.

Пропоную проводити стерилізацію поживного середовища методом *нагрівання*, який є одним з найрозповсюдженіших методів на сьогоднішній день. Найефективнішим методом теплової стерилізації є безперервна стерилізація. Перевагами даного методу є можливість автоматизованого регулювання процесу, рівномірного і швидкого прогріву середовища, збереження вихідних властивостей, компактності установки і зручності її обслуговування. Стерилізація системи безперервної стерилізації поживного середовища проводиться гострим паром при температурі 115-130 °С і тиску 1,5-1,8 атм [33].

До складу поживного середовища входять такі компоненти (г/л) [23]: 35 г/л сахарози, 20 г/л кукурудзяного порошку та 2 г/л  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ .

## **5.6. Обґрунтування стадій виділення субстанції для виробництва Фібринолізин**

При виробництві фібринолітичного ферменту стоїть завдання виділити цільовий продукт з культуральної рідини і отримати його в чистому вигляді. Це складний технологічний процес, що передбачає багатостадійне селективне розділення сумішей. Це обумовлено низькою концентрацією насинтезованого цільового продукту в культуральній рідині і їх концентруванням в процесі виділення і очищення.

Науковцями було проведено експериментальні та прикладні дослідження на основі яких було розроблено схему виділення пептидази *Bacillus thuringiensis* IMB B-7324, яка має належну фібринолітичну активність за належної концентрації. Даний ензим є лужною пептидазою. Виділення та очищення передбачає осадження сульфатом амонію, центрифугування та гель-фільтрацію [1].

В даній роботі відображено аналіз дослідження накопичення ензиму на відповідному рідкому оптимізованому середовищі.

### *Відділення клітини*

Відділення клітини від культуральної рідини пропонується проводити шляхом центрифугування при 5000 об/хв протягом 30 хв. Після завершення центрифугування до супернантанта культуральної рідини додають солі сульфату амонію з поступовим збільшення концентрації до кінцевого значення концентрації у 90%.

Наступним етапом є витримування отриманої суміші протягом 24 год за температури 2 – 4°C у відповідному обладнанні (до прикладу холодильник для зберігання фармацевтичних та медичних субстанцій, який обладнаний температурними датчиками по периметру всієї площі, котрі є каліброваними та повіреними належним чином для забезпечення існування так званого «холодильного ланцюга» - для не допущення відхилення параметрів зберігання).

Після зберігання передбачається повторне центрифугування за параметрів 5000 об/хв. протягом 30 хвилин з належним збиранням та зберіганням отриманого осаду.

В подальшому даний осад пропонується розчиняти в 1,5 рази 0,01 М трис-НСІ буфером, до значення рН 7,5 і наносити на колонку (1,8×40 см) з нейтральним TSK–гелем — Toyopearl HW-55 (виробник – Toyosoda, Японія). Елюцію при подальшій хроматографії зразка пропонується проводити тим самим 0,01 М трис-НСІ буфером. Фракції з еластазною активністю об'єднують і наносять на колонку (2,5×40 см) з Toyopearl DEAE-650(M) (виробник – Toyosoda, Японія). Вміст протеїну на всіх стадіях очищення пропонується реєструвати за допомогою спектрофотометру СФ-26 (або аналогічних за функціональними можливостями) при довжині хвилі 280 нм. Для визначення фібринолітичної активності як субстрат пропонується використовувати фібрин, одержаний із плазми крові людини на станції переливання крові. В дослідну пробу пропонується додавати 1мг фібрину, 1,8 мл трис-НСІ буферу (до значення рН 7,5) і 0,2 мл зразка. Інкубацію відповідно передбачається проводити протягом 30–45 хв за температури 37 °С.

Реакцію взаємодії передбачається призупиняти за допомогою додавання 2 мл 10%-ї трихлороцтової кислоти (ТХО). У контрольну пробу ТХО додавали одразу. Зразки витримуються за кімнатної температури протягом 20 хв, потім центрифугують при швидкості обертів у 10000 об/хв протягом 10 хв для видалення осадженого протеїну. Поглинання пропонується вимірювати за допомогою спектрофотометра СФ-26 (або аналогічних за функціональними можливостями) при довжині хвилі 275 нм. За одиницю активності приймається кількість ензиму, яка підвищує абсорбцію на 0,01 за 1 хв в умовах проведених досліджень [1].

*Bacillus subtilis WR350*, є мутантом, що отриманий з *B. subtilis HQS-34* – синтезує складний позаклітинний пептидазний комплекс, який виявляє, зокрема, еластолітичну і фібринолітичну дію та має своє відношення до лужних пептидаз [2]. Спираючись на відповідні дослідження розглянемо виділення та очищення субстанції для препарату. Технологія виділення і очищення субстанції передбачає декілька стадій – осадження, центрифугування та гель-фільтрація [1].

Для безпосереднього накопичення ензиму в культуральній рідині штаму *Bacillus subtilis WR350* культивування мікроорганізму проходить на рідкому поживному середовищі наступного складу [2], (г/л): сахароза – 35,0; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 2,0; порошок кукурудзяний – 20,0; рН – 6,5–7,0. Мікроорганізм інкубується протягом 42 год (32°C, 200 об./хв). У випадку культивування у 100 літровому ферментері, за один цикл кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом становитиме 53,5 л.

#### *Центрифугування.*

Під центрифугуванням розуміється процес розділення неоднорідних систем (емульсій і суспензій) в полі відцентрових сил із використанням суцільних або проникаючих для рідини перегородок. Центрифуга являє собою вертикальний або горизонтальний циліндричний ротор із суцільними чи перфорованими боковими стінками. Ротор закріплюється на вертикальному валу, який приводиться в обертання електродвигуном, і встановлюється в

співвісний циліндровий нерухомий кожух, що закривається знімною кришкою; на внутрішній поверхні ротора з перфорованими стінками знаходиться фільтрувальна тканина чи тонка металева сітка.

Під дією відцентрових сил суспензія розділяється на осад і рідку фазу, яку називають фугатом. Осад залишається в роторі, а рідка фаза виділяється з нього.

У фільтруючих центрифугах із проникними стінками здійснюють процес розділення суспензій за принципом фільтрування, причому замість різниці тиску використовується дія відцентрової сили. У осаджувальній центрифугі суспензія, що розділяється, чи емульсія відкидається відцентровою силою до стінок ротора, причому рідка чи тверда фаза з більшою щільністю розташовується ближче до стінок ротора, а інша фаза з меншою щільністю розміщується ближче до його осі; осад (або фаза з більшою щільністю) утворює шар біля стінок ротора, а фугат переливається через верхній край ротора [4].

У ряді випадків осаджувальні центрифуги є єдиним засобом для забезпечення технологічного процесу. Прикладом служать процеси, коли критично важливо мати малі габарити і масу устаткування, що дозволяють проводити технологічні процеси на масштабних об'єктах без створення габаритних капітальних споруд [5].

В даному випадку з огляду описаних вище центрифуг для безперебійної роботи пропонується використовувати осаджувальну горизонтальну центрифугу, що має інтегрований прямий привід (крутний момент передається безпосередньо на вал барабана). В даному випадку обладнання має знижену шумність, займає менше місця, відбувається економія енергії до 15%.

При вибраному коефіцієнті заповнення сепаратора  $K_{зс} = 0,6$  його приблизний геометричний об'єм складатиме

$$V_{гф} = \frac{V_{ф}}{K_{зф}} = \frac{53,5}{0,6} = 89,2 \text{ л}$$

Знаходимо найближчий за номінальним об'ємом сепаратор  $V_{НС} = 100 \text{ л}$ .  
Уточнюємо коефіцієнт заповнення сепаратора:

$$K_{зс} = \frac{V_c}{V_{нс}} = \frac{53,5}{100} = 0,54$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах (0,5-0,75), отже геометричний об'єм сепаратора обрано вірно.

Процес відділення клітин від культуральної рідини відбуватиметься шляхом центрифугування в осаджувальній горизонтальній центрифугі за наступних параметрів: 5000 об/хв.; час центрифугування 30 хв.

#### *Осадження.*

Осадження за рахунок використання твердого сульфату амонію є одним із найбільш використовуваних методів очищення та фракціонування білків у великих масштабах, який використовується для розділення білків шляхом зміни їх розчинності у присутності високої концентрації солі. Сульфат амонію має відносно низьку щільність, легко доступний і є відносно недорогим [3].

Дана речовина нейтралізує заряд білкових частинок і викликає їх дегідратацію, що веде до осадження білка. Механізм цього процесу проходить таким чином: іони солі притягають поляризовані молекули води, зменшуючи тим самим кількість води, яка взаємодіє з білком, оскільки при високих концентраціях солей кількість іонів солі величезне порівняно з числом заряджених груп білків. Переміщення молекул води до іонів солі супроводжується одночасним руйнуванням захисних гідратних оболонок навколо молекул білків і веде до зниження їх розчинності. Солі лужних і лужноземельних металів викликають оборотне осадження білків, тобто після видалення їх білки знову набувають здатності розчинятися, зберігаючи при цьому свої нативні властивості [3].

Перед іншими методами відомими нам (ізоелектричне осадження, адсорбційна хроматографія, хроматографія на іонообмінних смолах, хроматографія на декстрані, кристалізація) осадження за допомогою сульфату амонію є значно доступнішим і недорогим матеріалом для виконання даного процесу, білки після осадження зберігають свої властивості, сам процес являється простим.

Для досягнення 90-% насичення сульфатом амонію у 53,5 л культуральної рідини необхідно поступово додавати сухий сульфат амонію. Дана стадія проводиться у тому ж сопловому сепараторі з подальшою витримкою у 24 години при 4°C. Потім знову проводимо центрифугування при 5000 об/хв протягом 30 хв з подальшою подачею отриманого осаду в реактор. Освітлена рідина після центрифугування зливається в каналізацію. Даний осад в реакторі розчиняється 0,01 М трис-НСІ буфером (співвідношення 1:1,5), рН повинно мати значення 7,5 для передачі на стадію очищення.

## **5.7. Обґрунтування стадії виділення субстанції для виробництва Фібринолізин**

### *Гель-фільтрація*

Для очищення використовують різні методи, проте потрібно обрати оптимальний метод для даного типу продукту нашого виробництва. Один з методів - метод гель-фільтрації (або гель-проникної хроматографії) дозволяє розділяти білки за величиною та формою молекул. Розділення білка проводиться в хроматографічних колонках, заповнених сферичними частинками гелю (розміром 10-500 мкм) з полімерних матеріалів. Самі частинки гелю проникні завдяки внутрішнім каналам, що характеризуються певним середнім діаметром. Суміш білків переносять до колони з гелем та елюють буферним розчином. Білкові молекули, не маючи здатності проникати у гранули гелю, переміщуються з високою швидкістю. Середні та малі білки будуть, у тій чи іншій мірі, утримуватися гранулами гелю. На виході з колонки елюат збирають у вигляді окремих фракцій. Об'єм виходу того чи іншого білка визначається, переважно, його молекулярною масою.

Серед форм колонкової хроматографії, які на сьогодні, мають автоматизацію процесу та зчитування результату, можна розглянути рідинну хроматографію високого тиску, газову хроматографію та газову хроматографію з детекцією результатів шляхом мас-спектрометрії. Аналізатор дозволяє виводити на монітор, у вигляді графіку, величину сигналу детектору у розрізі

часу. Автоматизовані методи хроматографії, у порівнянні зі звичайними, дозволяють проводити більш чутливі та специфічні дослідження, однак вимагають висококваліфікованих й високоосвічених операторів, стандартизації методів обробки зразку, протоколів, документації тощо.

За механізмом розділення рідинна хроматографія високого тиску ділиться на адсорбційну, роздільну, іон-обмінну, ексклюзійну тощо. Однак, на практиці, розділення часто проходить за кількома механізмами одночасно [6].

Отже, для проведення етапу очищення, пропонується гель-фільтрація, що використовує весь набір хроматографічної апаратури. Увесь процес фракціонування ґрунтується тільки на співвідношенні розмірів молекул фільтрованої суміші та пор у гранулах, що в даному випадку є найкращим способом очищення.

Очищення фібринолітичної пептидази проводитимемо шляхом гель-фільтрації в відповідних колонах. Для гель-фільтрації використаємо Toyopearl DEAE-650(M) (виробник – Toyosoda, Японія) у колонах промислових масштабів.

Вміст білка на всіх стадіях очищення пропонується реєструвати за допомогою спектрофотометра СФ-26 (або аналогічних за функціональними можливостями) при довжині хвилі 280 нм.

Для визначення фібринолітичної активності як субстрат використаємо фібрин, одержаний із плазми крові людини на станції переливання крові [8, 9]. В дослідну пробу додають 1мг фібрину, 1,8 мл трис-НС1 буфера (рН 7,5) і 0,2 мл досліджуваного препарату. Інкубацію передбачається проводити протягом 30–45 хв при 37°C. Реакцію зупиняємо додаванням 2 мл 10%-ї трихлороцтової кислоти (ТХО). У контрольну пробу ТХО додається відразу.

Зразки витримуються за кімнатної температури 20 хв, потім центрифугуються при 10 000 об/хв. протягом 10 хв для видалення осадженого протеїну. Поглинання вимірюється на спектрофотометрі СФ-26 (або аналогічних за функціональними можливостями) при довжині хвилі 275 нм. За одиницю активності приймаємо кількість ензиму, яка підвищує абсорбцію на 0,01 за 1 хв.

## 5.8. Обґрунтування вибору товарної форми випуску Фібринолізину

Даний лікарський засіб відноситься до фібринолітичних препаратів, які використовуються у тромболітичній терапії. Від так тромболітичні засоби призначаються системно або локально.

Системно - подані початковим внутрішньовенним уприскуванням болюса, за яким настає внутрішньовенне вливання (класифікація 96199-01 [1920]. Внутрішньовенне введення фармакологічного засобу, тромболітичний засіб АБО 96196-01 [1920]. Внутрішньоартеріальне введення фармакологічного засобу, тромболітичний засіб).

Локально - подається безпосередньо в область тромбу через периферичну артеріальну або венозну катетеризацію (класифікація 35317-01 [741]. Артеріальна периферія або венозна катетеризація із введенням тромболітика) [11].

Відповідно до класифікації обираємо форму випуску - порошок ліофілізований для приготування розчину для ін'єкцій по 20 000 ОД у пляшках. Отже, маючи дану форму випуску препарату Фібринолізин, матимемо певні особливості щодо вимог первинного пакування та включимо ряд операцій розглянутих нижче.

### *Сушіння*

Фінальною стадією виробництва фібринолітичного ферменту буде процес сушіння. За фізичними властивостями сушіння являється складним дифузійним процесом, швидкість якого визначається швидкістю підведення тепла, випаровуванням вологи, дифузією вологи з глибини матеріалу та перенесенням вологи з поверхні матеріалу в навколишнє середовище. Відповідно сушіння поєднує пов'язані один з одним процеси тепло- та масообміну. За способом підведення тепла до матеріалу, що висушується, розрізняють наступні види сушіння: конвективне (матеріал, що висушується, обволікається потоком підігрітого повітря); контактне (нагрівання відтворюється безпосередньо контактом матеріалу з поверхнею, яка нагрівається); високочастотне (здійснюється під дією електричного поля високої частоти — 0,3–10 кГц);

радіаційне (проходить під дією ГЧ-випромінювання); сублімаційне (проводиться в замороженому стані у вакуумі) [8].

Сублімація — один з найефективніших способів зневоднення. При 0°C колоїдна система матеріалів, у тому числі їх волога, замерзає і надалі відбувається процес сублімації, тобто випаровування твердого тіла без його розплавлення. У даному випадку з твердого агрегатного стану вода переходить у пароподібний, оминаючи перехід у рідку фазу. За такого способу сушіння молекулярна структура матеріалу зберігається майже без змін і висушений матеріал характеризується доброю дисперсністю і пористістю, тим часом як за звичайного сушіння відбувається значне зменшення об'єму матеріалу. При сублімаційному висушуванні відсутня окислювальна дія кисню повітря, в результаті чого висушена біомаса відрізняється високою якістю та зберігає свої властивості. З точки зору зберігання якості сублімаційне сушіння є найбільш досконалим серед усіх способів сушіння [9,10].

Етап заморожування проходить безпосередньо в сублімаційній шафі. Заморожування біоматеріалу на полицях сучасних субліматорів значно спрощує процес отримання сухого продукту та знижує вірогідність контамінації в процесі перенесення напівпродукту між апаратами. До субліматорів належать апарати для сушіння безпосередньо у флаконах, пляшках або ампулах. Така установка являє собою горизонтальний циліндричний апарат зі з'ємною кришкою, встановленою на поворотному кронштейні. Кришка кріпиться до корпусу апарату спеціальними затискачами або відкидними бортами. На корпусі і кришці шкафу наявні оглядові вікна. Всередині апарату на чотирьох стінках встановлені нагрівальні плити, зварені з двох листових пластин з вставленими між ними перегородками. Ці перегородки направляють рух теплоносія, забезпечуючи рівномірний нагрів всієї поверхні плити. В кожній плиті наявні по два штуцери, що об'єднані в колектори входу пари і виходу конденсату. Теки з продуктом, завантажуються у касети, які встановлюють на всі нагрівальні плити, крім останньої, оскільки на неї падають краплі вологи, що конденсуються на стінках шафи. Окремі краплі вологи, що

сконденсувалися на бокових стінках шафи, стікають вниз, а після завершення процесу відводяться через зливний штуцер. Сушіння проходить під дією кондуктивного нагріву нерухомого шару матеріалу в умовах вакууму. Пари вологи, що випарюються в процесі сушіння, і повітря відкачуються з шафи вакуум-насосом [9,10].



К-5	Компресор	1	Компресор Inversys Plus з прямим приводом. Максимальний робочий тиск 1,0 МПа. Виробник: «Dalgakiran» (Туреччина). <sup>4</sup>
Т-6	Теплообмінник-охолоджувач	1	Охолоджувач повітря Systemair PGK. Максимальний робочий тиск 1,6 МПа, вихідна температура повітря 20 °С. Виробник: «Systemair» (Швеція). <sup>4</sup>
Р-7	Ресивер	1	Ресивер РВ 900.10. Об'єм 900 л, робочий тиск 1,1 МПа. Виробник: «Remeza» (Білорусь). <sup>4</sup>
Т-8	Теплообмінник-нагрівач	1	Повітренагрівач каналний водяний Systemair VBR. Максимальний робочий тиск 1,6 МПа, при температурі води 100 °С. Виробник: «Systemair» (Швеція). <sup>4</sup>
Ф-9	Головний фільтр очистки повітря	1	Фільтр (Р)–GSL N. Фільтруючий матеріал – нержавіюча стальна сітка, швидкість фільтрування – 0,025 м/с, Е = 95 %. Виробник: «Donaldson» (США). <sup>5</sup>
Р-10	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації композиції І	1	Реактор-змішувач об'ємом 60 л, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (20-500 об/хв), сталь н/ж 316L AISI. Виробник: «Промвіт» (Україна) <sup>1</sup>

1	2	3	4
Ф-12	Індивідуальний фільтр очистки повітря	2	Фільтри (P)–SRF N. Фільтруючий матеріал – фторопласт, швидкість фільтрування – 0,025 м/с, Е = 99,9999 %. Виробник: «Donaldson» (США). <sup>5</sup>
ФР-13	Ферментер	1	Ферментер об'ємом 100 л, оснащений сорочкою, барботером, пробовідбірником, лопатевою мішалкою (50-500 об/хв), $K_{зап} = 0,5-0,6$ , нержавіюча сталь 304. Виробник: Bionet (Іспанія) <sup>6</sup>
З-14	Збірник	1	Збірник сталевий емальований об'ємом 5 л. Працює під атмосферним тиском, з нижнім спуском продукту. Поверхні збірника, дотичні з робочим середовищем, покриті універсальною склоемаллю. У нижній частині корпусу розташований штуцер для нижнього випуску продукту, який комплектується емальованим клапаном-вентилем. З'єднання фланців корпусу і кришки збірки і фланців люків виконано на комбінованих прокладках за допомогою затисків. АО

			Держинський завод хімічного обладнання «Заря»
Ін-17	Інокулятор	1	$V = 0,01 \text{ м}^3$ , вертикальний, із сорочкою, барботером, з пропелерною мішалкою (частота обертання-200 об/хв), поверхня теплообміну $1,9 \text{ м}^2$ , потужність 7 кВт обладнаний оглядовим вікном та люком. Виробник: Сумський машзавод
Зм-26	Змішувач для приготування робочого розчину Хлорантоїн	1	Змішувач об'ємом 150 л, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (20-1000 об/хв), сталь н/ж 316L AISI. Виробник: «Промвіт» (Україна) <sup>1</sup>
Зм-27	Змішувач для приготування буферного агента гідроксид натрію	1	Змішувач об'ємом 15 л, оснащений змішувальним пристроєм (0-360 об/67в.), виготовлений зі сталі 12X18Н10Т. Виробник: ЗАТ «Кабельфармтех» (Україна) [9].
Д-29 Д-31 Д-33 Д-34 Д-35	Об'ємно-вагомий дозатор	5	Виготовлений зі сталі 12X18Н10Т, відносна похибка дозування 0,4%, продуктивність до 1 доз/67в.

**Примітка:** пошук та підбір обладнання здійснювався з використанням наступних електронних джерел: 1. <http://promvit.com.ua/> («Промвіт», ємнісне обладнання та ферментатори), 2. [www.debem.com.ua](http://www.debem.com.ua) («Debem», насоси), 3. <http://www.air-filter.com.ua> («General filter», фільтри для повітря), 4.

- <http://www.vent-magazin.ru>, <http://www.dalgakiran.com.ua> («Далгакиран компрессор Украина», обладнання для підготовки повітря), 5.
- <http://www.emea.donaldson.com> («Donaldson» фільтри для повітря), 6.
- <https://bionet.com/technology/f3-bioreactor/> (De Dietrich®, ферментер) 7.
- <https://www.dzho-nn.ru> (АО Дзержинський завод хімічного обладнання «Заря») 8.
- <http://www.cmz.sumy.ua> Сумський машзавод. 9.
- <http://www.kft2.com.ua/rea100.html> (ЗАТ «Кабельфармтех», Україна)

## РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

Технологічна схема біосинтезу фібринолітичного ферменту включає в себе як допоміжні роботи (процес приготування та стерилізації буферного агенту 6% розчину NaOH – для досягнення 7,0 рН, оскільки при культивуванні продукуються кислоти, процес приготування та стерилізації поживних середовищ) так і сам технологічний процес (підготовка посівного матеріалу та біосинтез цільового продукту).

Технологічну схему біосинтезу фібринолітичного ферменту наведено у графічній частині проекту.

### ***ДР 1. Санітарна підготовка виробництва***

Основною та обов'язковою частиною підготовчих робіт на підприємствах являється проведення заходів санітарно-гігієнічного спрямування. Основною ціллю санітарної підготовки виробництва є доведення до мінімальної кількості контамінантів у всіх учасників виробничого процесу, або їх повного знешкодження: в даному поживному середовищі, на поверхнях обладнання, яке має контакт з культуральною рідиною, забезпечення чистоти на виробничих ділянках де чистота та асептика впливають на якісні показники продукції. Роботи санітарно-гігієнічного призначення суттєво впливають на створення безпечних умов праці працівників підприємства. Санітарна підготовка виробництва реалізується у формі виконанням робіт по описаному в інструкціях щозмінного та генерального прибирання виробничих приміщень, обладнання та інвентарю.

Мікробіологічний контроль проводить мікробіолог за допомогою змивів стерильними тампонами не рідше 1 разу на тиждень під час виробничого процесу і за 1,5 год до початку роботи.

<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	Опис технологічної схеми	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушів</i>
<i>Розроб.</i>		КОБИЛИНСЬКИЙ						13
<i>Перевір.</i>		СТАРОВОЙТОВА.						
<i>Реценз.</i>								
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		СТАБНИКОВ						<i>Кафедра БТМ</i>

У разі виявлення в повітрі і змивах приміщень грибів або спороутворюючої мікрофлори концентрацію дезінфікуючих засобів слід збільшити. Також необхідно чергувати дезінфікуючі засоби з метою уникнення утворення стійких форм мікроорганізмів.

#### *ДР 1.1. Підготовка мийних та дезінфікуючих засобів*

##### *ДР 1.1.1. Приготування робочого розчину Хлорантоїну*

Для приготування мийно-дезінфікуючого засобу Хлорантоїну об'ємом 100 л з концентрацією 0,2 %. Нам необхідно у змішувач (ЗМ-26) об'ємом 150 л об'ємно-ваговим дозатором (Д-33) внести 160 г порошку та додати 80 л питної води. Для повного розчинення у сорочку збірника подають пару для досягнення температури розчину 60-65°C та вмикають перемішуючий пристрій (100-500 об/хв).

##### *ДР 1.1.2. Приготування робочого розчину каустичної соди*

Для приготування 100 л робочого розчину каустичної соди концентрацією 2,0 %. Нам необхідно у змішувач (ЗМ-1) об'ємом 150 л об'ємно-ваговим дозатором (Д-34) внести 2 кг каустичної соди і додати 98 л питної води. Для повного розчинення у сорочку збірника подають пару для досягнення температури розчину 55-60°C та вмикають перемішуючий пристрій (100-500 об/хв).

#### *ДР 1.2. Підготовка виробничих приміщень*

##### *ДР 1.2.1. Щоденне прибирання виробничих приміщень*

Один раз на зміну проводять миття підлоги, використовуючи розчин мийно-дезінфікуючого засобу Хлорантоїну (від ДР 1.1.1). Цим же розчином протирають ззовні обладнання та комунікації; змочують килимки при вході у всі приміщення. Так як виробництво триває 270 днів, необхідно забезпечити виробництво додатковим миючим засобом з іншою діючою речовиною. Через 1 місяць будемо використовувати Санокварт.

##### *ДР 1.2.2. Генеральне прибирання виробничих приміщень*

Раз на місяць проводять миття стін, вікон та дверей, використовуючи розчин мийно-дезінфікувального засобу Хлорантоїну (від ДР 1.1.1). Протирають ззовні апаратуру і комунікації.

Для перевірки мікробіологічної чистоти проводять мікробіологічний контроль ( $KУО < 800/см^2$ ). Мікробіологічний контроль проводить мікробіолог за допомогою змивів стерильними тампонами не рідше 1 разу на тиждень під час виробничого процесу і за 1,5 год до початку роботи.

У разі виявлення в повітрі і змивах приміщень грибів або спороутворюючої мікрофлори концентрацію дезінфікуючих засобів слід збільшити. Також необхідно чергувати дезінфікуючі засоби з метою уникнення утворення стійких форм мікроорганізмів.

### *ДР 1.3. Підготовка технологічного обладнання та комунікацій*

#### *ДР 1.3.1. Миття та ополіскування обладнання та комунікацій*

Для миття обладнання та комунікацій застосовують розчин каустичної соди у концентрації 2 % (від ДР. 1.1.2) підігрітого до температури 50 – 60 °С, шляхом подачі цього розчину від змішувача (ЗМ-1) відцентровим насосом (Н-23) по комунікаціям до відповідних апаратів з заповненням 50% об'єму апаратів, вмикають перемішуючий пристрій. Миття здійснюють протягом 1 год при перемішуванні. Відпрацьований розчин після миття йде на стадію знешкодження відходів (до ЗВ 7.1). Для ополіскування в апарати по комунікаціях подається питна вода до заповнення 50% об'єму апаратів, та вмиканням перемішуючого пристрою. Потім дана вода направляється на стадію знешкодження відходів (до ЗВ 7.1).

Мікробіологічний контроль проводить мікробіолог за допомогою змивів стерильними тампонами не рідше 1 разу на тиждень під час виробничого процесу і за 1,5 год до початку роботи.

У разі виявлення в повітрі і змивах приміщень грибів або спороутворюючої мікрофлори концентрацію дезінфікуючих засобів слід збільшити. Також необхідно чергувати дезінфікуючі засоби з метою уникнення утворення стійких форм мікроорганізмів.

### *ДР 1.3.2. Технічний огляд та перевірка на герметичність*

Після завершення процесу миття та ополіскування ємкісного обладнання проводиться його технічний огляд. В даному випадку метою цього огляду є виявлення можливих неущільнень в комунікаціях та запірній арматурі на обладнанні. У разі їх знаходження проводять підтягування різьбових з'єднань або ремонт.

На ємкісному обладнанні закривають усю запірну арматуру і подають аераційне повітря до набору надлишкового тиску  $P = 0,1-0,2$  МПа. Перекривають вентиль подачі повітря і фіксують показання манометра на кришці апарату та час витримки (30-60 хв) в операційному журналі. Якщо падіння тиску не перевищує 0,01 МПа, вважається, що апарат герметичний. В іншому випадку здійснюють пошук неущільнень за допомогою галогенових течіє-шукачів. Перед набором тиску в апарат вносять невелику кількість легкої галогенвмісної речовини (чотирихлористий карбон), закривають усю запірну арматуру, апарат нагрівають до температури 80 °С та збільшують тиск в апараті до 0,2 МПа.

Тривалість даної операції становить 1,5-2 год. У разі виявлення неущільнень здійснюють процес усунення недоліків.

### *ДР 1.3.3. Стерилізація обладнання*

Для здійснення процесу стерилізації в сорочку даного апарату подають пару та нагрівають його до температури 80–90 °С. Наступним етапом є відкривання усієї запірної арматури на відкритих трубних закінченнях та підведених до апарату комунікаціях та подання гострої пари безпосередньо в сам апарат (через нижній спуск або барботер), при цьому обов'язковою умовою є відкривання вентилю виходу відпрацьованого повітря, здійснюють для видалення повітря з апарату. При досягненні температури стерилізації (130–135 °С) всю запірну арматуру, крім парової, закривають і витримують протягом 1 години. Після завершення процесу витримки парову арматуру закривають, подають в апарат стерильне повітря, а в сорочку холодну воду. Процес

охолодження здійснюють до досягнення температури 30–40 °С і надлишкового тиску  $P = 0,003–0,005$  МПа.

#### *ДР 1.4. Підготовка персоналу*

##### *ДР 1.4.1 Навчання персоналу*

Навчання персоналу забезпечує власне саме підприємство. На підприємстві існують такі види навчань:

1. Основне навчання: проводиться один раз на рік; персонал ознайомлюється з теорією і практикою;
2. Вступне навчання: проводиться по мірі необхідності, коли на певну посаду наймають нового співробітника;
3. Подальше навчання: здійснюється систематично з подальшим оцінюванням практичної ефективності проведених навчань.

##### *ДР 1.4.2 Санітарно-гігієнічна підготовка персоналу*

Для миття рук персоналу використовують мило туалетне та мило господарське.

#### ***ДР 2. Підготовка аераційного повітря***

##### *ДР 2.1. Забір атмосферного повітря*

Забір атмосферного повітря здійснюється на висоті 5 м через пристрій для забору повітря (ПЗ-3).

##### *ДР 2.2. Грубе очищення повітря*

Повітря очищується від грубого аерозолю із застосуванням фільтрів грубої очистки (Ф-4). Ступінь очищення – 90 %.

##### *ДР 2.3. Стиснення повітря*

Далі надходжене повітря стискають у компресорі (К-5) до 0,4 МПа. Стиснення повітря в компресорі призводить до підвищення його температури до 120–250 °С і збільшення вмісту вологи.

##### *ДР 2.4. Охолодження повітря та видалення вологи*

Стиснене повітря охолоджується в охолоджувачі (Т-6) повітря до температури 20 °С для відведення надлишкової вологи. Далі повітря подають

на ресивер (Р-7) для згладжування пульсацій і відділення зайвої вологи ( $W = 60\%$ ).

#### *ДР 2.5. Нагрівання повітря та очищення в головному фільтрі*

Наступним етапом є підігрівання охолодженого повітря до  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$  для попередження конденсації пари на волокнах головного та індивідуальних фільтрів. Нагрів здійснюють за теплообмінника (Т-8).

Попереднє очищення повітря від мікроорганізмів здійснюють в головному фільтрі (Ф-9). Ступінь очищення –  $98\%$ .

#### *ДР 2.6. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі*

Інокулятор та ферментер оснащують індивідуальними фільтрами для завершальної очистки повітря (Ф-12). Ступінь очищення досягає  $99,999\%$ .

### ***ДР 3. Приготування та стерилізація титрувальних агентів***

#### *ДР 3.1. Приготування і стерилізація 6% розчину гідроксиду натрію*

При проведенні процесу культивування є необхідність підлужнювати рН середовища за допомогою луку, оскільки при культивуванні продукуються кислоти.

Для одного виробничого циклу необхідно приготувати  $11,36\text{ л}$   $6\%$  розчину  $\text{NaOH}$ . Зі складу беруть сухий  $\text{NaOH}$ , який являє собою білі, непрозорі кристали. Для розчинення використовують питну воду. Для приготування  $1\text{ л}$   $6\%$  розчину  $\text{NaOH}$  необхідно  $0,06\text{ кг}$  сухого натрій гідроксиду, тоді для приготування  $11,36\text{ л}$  необхідно  $0,68\text{ кг}$  сухого натрій гідроксиду. Оскільки при стерилізації утвориться конденсат ( $1,1\text{ л}$ ), необхідно розрахувати кількість води, яку необхідно додати:  $V_{\text{води}} = 11,36 - 0,68 - 1,1 = 9,58\text{ л}$ . Отже, для приготування  $11,36\text{ л}$   $6\%$  розчину необхідно  $680\text{ г}$  сухого  $\text{NaOH}$  та  $9,58\text{ л}$  питної води. На технічних вагах зважують  $680\text{ г}$  сухого натрій гідроксиду, поміщають у змішувач (ЗМ-27) об'ємом  $15\text{ л}$  та додають  $9,58\text{ л}$  питної води. Для приготування розчину використовують змішувач (ЗМ-27) з мішалкою об'ємом на  $15\text{ л}$ .

Стерилізують в реакторі при температурі  $131\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $0,15\text{ МПа}$ ) упродовж  $40\text{ хв}$ .

#### ДР 4. Приготування та стерилізація поживних середовищ

*ДР 4.1. Приготування поживного середовища для вирощування інокуляту у колбах на качалках*

Для вирощування інокуляту на даному етапі необхідно приготувати 0,5 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 0,5 л поживного середовища наведено в табл. 4.1.

*Таблиця 7.1*

#### Розрахунок вмісту компонентів для приготування 0,5 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 0,5 л середовища, г (л)	Композиція	Об'єм композиції, мл
Сахароза	35	17,5	I	300
кукурудзяний порошок	20	10		
вода		272,5		
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2	1	II	200
вода		199		

##### *ДР 4.1.1. Приготування і стерилізація композиції I*

На технічних вагах зважують 17,5 г сахарози та 10 г кукурудзяного порошку. Наважку поміщають у колбу об'ємом 500 мл, мірним циліндром відміряють та додають 272,5 мл питної води, перемішують до повного розчинення. Колба закривається ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 115°C упродовж 30 хв.

##### *ДР 4.1.2. Приготування і стерилізація композиції II*

На технічних вагах зважують 1 г кристалогідрату магній сульфату. Наважку поміщають у колбу об'ємом 500 мл, мірним циліндром відміряють та додають 199 мл питної води і перемішують до повного розчинення. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°C упродовж 40 хв.

*ДР 4.1.3. Змішування компонентів*

Змішування компонентів ДР 4.1.1 та ДР 4.1.2. Також обов'язковою стадією є контролювання стерильності.

*ДР 4.2. Підготовка поживного середовища для інокулятора*

Об'єм композиції для інокулятора становить 5 л. Отже розрахуємо необхідну кількість компонентів та води, що необхідні для приготування заданої кількості поживного середовища.

*Таблиця 7.2*

**Розрахунок вмісту компонентів для приготування 5 л середовища**

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 5 л середовища, г (л)	Композиція	Об'єм композиції, л
Сахароза	35	175	I	4
кукурудзяний порошок	20	100		
вода		3,3		
конденсат		0,4		
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2	10	II	1
вода		0,9		

конденсат		0,1		
-----------	--	-----	--	--

*ДР 4.2.1. Приготування і стерилізація композиції I*

За допомогою технічних вагів відважують 175 г сахарози і 100 г кукурудзяного порошку та переносять до збірника (З-14), об'ємом 5 л, відкриваємо вентиль подачі питної води та додаємо її в збірник у кількості 3,3 л для розмішування з водою питною за допомогою мішалки (200 об/хв) та проводимо стерилізацію за температури 115°C протягом 30 хв. Об'єм конденсату становить 0,4 л. Після стерилізації та охолодження композицію I за допомогою насоса відцентрованого (Н-16) перекачуємо до інокулятора (Ін-17) об'ємом 10 л.

*ДР 4.2.2. Приготування і стерилізація композиції II*

За допомогою технічних ваг відважують 10 г кристалогідрату магній сульфату та переносять до інокулятору об'ємом 10 л для розмішування з водою питною за допомогою мішалки (200 об/хв), відкриваємо вентиль подачі питної води та додаємо її в інокулятор у кількості 0,9 л та проводимо стерилізацію за температури 131°C протягом 40 хв. Об'єм конденсату становить 0,1 л. Після стерилізації та охолодження додають композицію I за допомогою насоса відцентрованого (Н-16) шляхом перекачування від збірника (З-14) до інокулятора (Ін-17) об'ємом 10 л.

*ДР 4.3. Приготування поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 100 л*

Для проведення стадії виробничого біосинтезу необхідно приготувати 53,5 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 53,5 л поживного середовища наведено в табл. 4.4.

Для засіву поживного середовища у ферментері необхідно внести 0,5 л рідкого інокуляту, тому сумарна кількість води для композиції становить 50 л (так як стерилізація проходить безпосередньо в реакторах, також враховують 10% конденсату).

## Розрахунок вмісту компонентів для приготування 53,5 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 53,5 л середовища, г (л)	Композиція	Об'єм композиції, л
Сахароза	35	1872,5	I	50
кукурудзяний порошок	20	1070		
вода		42		
конденсат		5		
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2	107	II	3,5
вода		3		
конденсат		0,35		

*ДР 4.3.1. Приготування і стерилізація композиції I*

За допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-31) відважують 1872,5 г сахарози та 1070 г кукурудзяного порошку та почергово вносять до реактора (Р-10) геометричним об'ємом 60 л, відкриваємо вентиль подачі води питної і подаємо за лічильником у реактор 42 л води питної. Вмикаємо мішалку і проводимо перемішування до повного розчинення розподілу протягом 10±1 хв (200 об/хв). Процес стерилізації триває 30 хв при температурі 115 °С. Після завершення стерилізації та охолодження композиція I за допомогою насоса відцентрованого (Н-11) перекачується до виробничого ферментера (Фр-13).

### *ДР 4.3.2. Приготування і стерилізація композиції II*

За допомогою об'ємно-вагового дозатора відважують 107 г кристалогідрату магній сульфату. Наважку переносимо до ферментера (Фр-13) геометричним об'ємом 100 л, відкриваємо вентиль подачі води питної і подаємо за лічильником у ферментер 3 л води питної. Вмикаємо мішалку (200 об/хв) і проводимо перемішування до повного розчинення розподілу протягом  $10 \pm 1$  хв. Процес стерилізації триває 40 хв при температурі 131 °С. Після завершення стерилізації та охолодження композиція I за допомогою насоса відцентрованого (Н-2) перекачується від реактора (Р-10) до виробничого ферментера (Фр-13).

### ***ТП 5. Підготовка посівного матеріалу***

#### *ТП 5.1. Підтримання колекційної культури*

Культуру *B. subtilis* WR350 зберігають на агарових пластинках Luria Bertani (LB) та 50% (об./об.) гліцерину при -80 ° С, забезпечуючи таку температуру медичним морозильником. Пересіви здійснюють кожний місяць. Усі роботи з культурою проходять асептичних умовах. Також обов'язково здійснюють мікробіологічний контроль.

*ТП 5.2. Відновлення робочої культури Bacillus sp. WR350 на агаризованому середовищі*

Робочу культуру штаму-продуцента відновлюють розсівами культури на чашки Петрі із агаризованим LB середовищем в асептичних умовах. Культуру на чашці Петрі вирощують при температурі 37°С протягом 24 год. Обов'язково здійснюють мікробіологічний контроль.

#### *ТП 5.3. Культивування робочої культури Bacillus sp. WR350 у пробірках*

Ізольовані колонії від ТП 5.2 в асептичних умовах пересівають петлею у пробірки з агаризованим середовищем Luria Bertani (LB). Одна ізольована колонія засівається в одну окрему пробірку. Для пересіву використовують колонії, що знаходяться на відстані не менше 1 см одна від одної. Пробірки

інкубують 24 год при температурі 37°C. Здійснюють мікробіологічний контроль в кожній пробірці.

#### *ТП 5.4. Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках*

Посівний матеріал розливають по 100 мл в 5 стерильних качалочних колби об'ємом 750 мл.

У пробірку з робочою культурою асептично вносять 5 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини (змивають культуру), піпеткою відбирають одержану суспензію клітин і вносять у колби з розлитим поживним середовищем. Для засіву однієї колби використовують бактеріальну суспензію, одержану з однієї пробірки.

Культивування здійснюється у колбах на качалці протягом 42 год при температурі 32°C. Під час культивування відбирають пробу для здійснення мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси. Після завершення вирощування в асептичних умовах інокулянт з 5 колб переносять в засівну колбу об'ємом 1 л, перемішують, закривають пробкою.

#### *ТП 5.5. Приготування посівного матеріалу в інокуляторі*

Культивування проводять в інокуляторі загальним об'ємом 10 л. для одержання 5,3 л. інокуляту. Комозицію I подають в інокулятор в асептичних умовах за допомогою насосу (Н-16). Комозицію II стерилізують безпосередньо в інокуляторі. Потім вмикають мішалку (200 об/хв), подають стерильне аераційне повітря через барботер, подають пару в рубашку (для підтримання температури 32°C), та культивують впродовж 42 год. Кожні 4 – 6 год відбирають проби для проведення мікробіологічного контролю.

### ***ТП 6. Біосинтез***

У виробничий ферментер (Фр-13), перед початком внесення посівного матеріалу (від ТП 5.5), за допомогою відцентрового насосу перекачують композицію I (з Р-10) а композиція II стерилізується безпосередньо в самому ферментері. Після цього вмикаємо перемішуючий пристрій на 30±1 хв для рівномірного розчинення всіх композицій у виробничому ферментері. Перед

внесенням посівного матеріалу, відбираємо пробу для проведення мікробіологічного контролю.

Посівний матеріал (від *ТП 5.5*) подаємо в асептичних умовах за допомогою насосу до виробничого ферментера. Вмикаємо мішалку, подаємо аераційне стерильне повітря через барботер, подаємо пару в рубашку та культивуємо при температурі 32°C протягом 42 годин. Швидкість обертання мішалки – 200 об/хв. Також використовується автоматичне подавання 6% розчину NaOH (*ДР 3.1*) за зміною значення до рН 7,0.

Кожні 4 – 6 год відбираємо проби для проведення мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси. У пробі відібраній на 42 годину культивування, при досяганні фібринолітичної активності ферменту в межах 5867 ОД/мл виробничий синтез завершується.

### ***ЗВ 7. Знешкодження відходів***

#### ***ЗВ 7.1. Знешкодження рідких відходів***

Розчини мийно-дезінфікуючих засобів від *ДР 1.2.1*, *ДР 1.2.2*, *ДР 1.3.1* йдуть на очисні споруди.

#### ***ЗВ 7.2. Знешкодження повітряних відходів***

Відпрацьоване повітря, що надходить з інокулятора та ферментеру (від *ТП 5.5* та *ТП 6*) відправляють у системи знешкодження повітряних відходів.

## РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

### 8.1. Мікробіологічний контроль

Здійснення мікробіологічного контролю відбувається розсівом культуральної рідини на чашки Петрі з агаризованими середовищами та мікроскопіюванням.

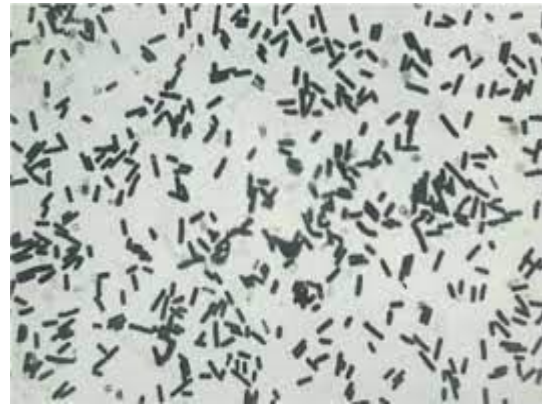
Культуральну рідину розсівають петлею до ізольованих колоній на чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром (МПА) для виявлення бактерій. Сусло-агар (СА) або глюкозо-картопляний агар (ГКА) використовують для виявлення дріжджів та грибів [32].

Для цього досліджуваний штам бактерії в обсязі 0,1-0,2 см<sup>3</sup> засівають на тверді і в рідкі поживні середовища. Посівний матеріал рівномірно розподіляють по поверхні МПА шляхом похитування, чашки Петрі підсушують 30-40 хв при кімнатній температурі, переносять в термостат і інкубують догори дном при температурі 35-37 ° С протягом 20-24 год. Посіви в рідкому поживному середовищі культивують в цьому ж режимі. У посівах на МПА повинні спостерігатися характерні для *Bacillus subtilis* зростання культури, що супроводжується помутнінням середовища та утворенням плівки сірувато-білого кольору на поверхні бульйону, що важко розбивається. На поверхні МПА після добової інкубації повинні спостерігатися сірувато-білі горбисті колонії з нерівними краями (рис. 1) в'язкої консистенції. У мазках, забарвлених по Граму, повинні спостерігатися грампозитивні ланцюжки та палички діаметром близько 0,6 мкм і довжиною 3-5 мкм (рис. 2). У препаратах, приготовлених за методом роздавленої краплі, клітини, завдяки своїм жгутикам, повинні бути рухливі.

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		КОБИЛИНСЬКИЙ			Контроль виробництва	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		СТАРОВОЙТОВА.						13
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		СТАБНИКОВ						



(рис. 1)



(рис. 2)

Здійснення мікробіологічного контролю поживного середовища відбувається аналогічно описаному вище мікробіологічному контролю культуральної рідини, який проводиться шляхом розсіву на чашки Петрі з агаризованими середовищами та мікроскопіюванням.

## 8.2. Показники росту і синтезу

### *Визначення концентрації біомаси*

Біомасу визначають непрямим методом – за оптичною густиною клітинної суспензії з наступним перерахунком на суху біомасу за допомогою калібрувального графіка.

Суть методу є вимірювання інтенсивності світла при його проходженні через суспензію мікроорганізмів. Клітини мікроорганізмів поглинають і розсіюють світло, причому інтенсивність цих процесів залежить від числа клітин і їх розмірів.

Методика визначення: відбирають проби по 10 мл культуральної рідини. Зміну інтенсивності світла при проходженні через суспензію клітин вимірюють за допомогою фотоелектроколориметра (ФЕК) або спектрофотометра, вибираючи довжину хвилі (зазвичай в інтервалі 540-650 нм), за якої поглинання світла даною суспензією клітин є мінімальним. За високих концентрацій клітин в культуральній рідині відбувається вторинне розсіювання світла, що призводить до отримання занижених результатів. Тому суспензії великої щільності перед вимірюванням необхідно розводити водою. Розведення проб однієї і тієї ж культури різними рідинами неприпустимо, так як набухання і

стиснення клітин впливає на величину світлорозсіювання. Для побудови калібрувальної вимірюють величину світлорозсіювання суспензій з різним вмістом клітин і в кожній з них визначають одним із застосовуваних методів кількість клітин або біомасу. Отриману залежність виражають графічно, відкладаючи на осі ординат значення ФЕК, а на осі абсцис – кількість клітин, що містяться в 1,0 мл суспензії, або біомасу в г/л. Для кожного мікроорганізму слід будувати свою калібровану криву [32].

#### *Визначення активності фібринолітичних ферментів*

Активність фібринолітичних ферментів визначали методом, описаним Astrup та Mullertz [35], з використанням багатих плазміногеном фібринових пластинок. Шляхом нанесення зразку, що тестується, на поверхню пластини з наступним визначенням величини ділянки лізису фібрину. Ковалентне прошивання фібринових пластин здійснюється активованим фактором XIII системи зсідання крові, що присутній у препаратах фібриногену як домішок. В якості контролю використовували урокіназу, яка каталізувала утворення плазміну з плазміногену. Вимірювали розмір чистої зони на кожній фібриновій пластинці, і фібринолітичну активність розраховували за стандартною кривою, сформованою за допомогою контролю, де концентрація урокінази (20–120 ОД/мл) була нанесена на площу прозорої зони.

### **8.3. Визначення концентрації джерел вуглецю і азоту**

#### *Визначення концентрації джерела вуглецю*

Джерелом вуглецю є сахароза.

Визначення редукуючих цукрів (метод Мюллера) [36]

Реактив Мюллера складається з сульфату міді, сегнетової солі та карбонату натрію.

Метод визначення ґрунтується на окисненні редукуючих цукрів сіллю двовалентної міді та прямому визначенні відновленої форми міді в присутності її окисненої форми .

*Метод визначення:* у термостійку конічну колбу вносять 25 мл поживного середовища, в якому міститься 15-40 мг/100 мл редукуючих цукрів і

додають 10 мл реактиву Мюллера. Колбу витримують 10 хв у киплячій водяній бані так, щоб рівень розчину в ній був на 2-3 см нижчим, ніж рівень води у бані. Дно колби не повинне торкатись дна бані. Після десятихвилинного кип'ятіння колбу виймають з бані, швидко охолоджують до кімнатної температури.

Розчин повинен мати голубе або зелене забарвлення. Наявність жовтого забарвлення вказує на недостатню кількість реактиву Мюллера. У цьому випадку дослід слід повторити. Після охолодження додають 5 мл оцтової кислоти і 5-20 мл розчину йоду концентрацією  $C = 1/30$  моль/л. колбу закривають пробкою і залишають на 2 хв при кімнатній температурі, періодично перемішуючи суміш. Надлишок йоду титрують розчином  $N_2S_2O_3$  до появи блідо-жовтого забарвлення, надалі додають 2-3 мл 0,5% розчину крохмалю. титрування завершують після досягнення зеленого забарвлення розчину.

Паралельно ставлять контрольний дослід за цією ж методикою, але без кип'ятіння. Вміст редуруючих цукрів розраховують з врахуванням того, що 1 мл витраченого на реакцію розчину йоду відповідає 1 мг інвертного цукру:

$$C = 100 \cdot (V_1 - (V_2 - V_3))_n / 1000 \cdot V$$

- $V_1$  – об'єм доданого розчину йоду, мл;
- $V_2$  – об'єм розчину  $Na_2S_2O_3$ , витрачений на титрування в контрольному досліді, мл;
- $V_3$  – об'єм розчину  $Na_2S_2O_3$ , витрачений на титрування в основному досліді, мл;
- $n$  – ступінь розбавлення специфічного розчину;
- $V$  – об'єм аналізованої проби, мл.

#### *Визначення концентрації джерела азоту*

В якості джерела азоту в середовищі виступає кукурудзяний порошок. Для визначення азоту амінокислот використовуємо метод формольного титрування (або титрування по Серенсену). Метод базується на взаємодії аміногруп білків з формаліном. Під час реакції з формаліном аміногрупа втрачає свої основні

властивості, а утворювана метиламінокислота відтитровується 0,1 нормальним розчином лугу NaOH. За кількістю витраченого на титрування лугу визначають кількість COOH-груп. В середньому число карбоксильних груп в амінокислотах приймають рівним числу аміногруп (що цілком справедливо для моноамінокислот, для діамінокислот вводяться відповідні поправки в методику титрування).

Методика визначення. До 1 мл супернатанту культуральної рідини додають 9 мл води (рН розчину має становити 7,0). При необхідності розчин нейтралізують шляхом додавання 0,1 М розчину NaOH або 0,1 М розчину HCl. Після закінчення нейтралізації додають 2 мл розчину формальдегіду, перемішують і титрують 0,1 М розчином NaOH до значення рН 9,1, що не змінюється при перемішуванні протягом 2 хв, або до появи слабо рожевого забарвлення (індикатор – 1% розчин фенолфталеїну). Паралельно проводять контрольний дослід (паралельно титрують дистильовану воду). 1 мл 0,1 М розчину натрію гідроксиду відповідає 1,4 мг амінного азоту [37].

#### **8.4. Карта постадійного контролю**

Карту постадійного контролю виробництва препарату на основі *Bacillus subtilis* WR350 наведено у табл. 5.4.

## Карта постадійного контролю

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
1	2	3	4	5
<b>ДР 1. Санітарна підготовка виробництва</b>				
<b>ДР 1.1. Підготовка миючих та дезінфікуючих засобів</b>				
Кх 1.1.1. Приготування робочого розчину Хлорантоїну	Концентрація розчину Хлорантоїну	Хімічний метод	Після приготування розчину	C = 0,2%
Кх, Кт 1.1.2. Приготування робочого розчину каустичної соди	Концентрація розчину каустичної соди	Хімічний метод	Після приготування розчину	C = 2%
<b>ДР 1.2. Підготовка виробничих приміщень</b>				
Кх, 1.2.1. Щоденне прибирання приміщень	Підлога, ззовні апаратура. Чистота	Візуальний огляд	Після прибирання	Чисте приміщення, відсутність пилу та бруду

Кх, Км 1.2.2. Геренальне прибирання приміщень	Підлога, стіни, двері, вікна, ззовні апаратура. Чистота	Візуальний огляд, мікробіологічний контроль	Після прибирання	Чисте приміщення, відсутність пилу та бруду КУО < 300/см <sup>2</sup>
<b>ДР 1.3. Підготовка обладнання та комунікацій</b>				
Кт 1.3.1. Миття та ополіскування обладнання	Мийний розчин, обладнання, температура розчину, тривалість, чистота	Термометр технічний, годинник	Під час проведення операції обробки	t = 80°C, τ = 1-2 год
Кт 1.3.2. Перевірка на герметичність	Герметичність роботи обладнання, час роботи, тиск	Манометр технічний, годинник, візуальний огляд	Тиск визначається безперервно під час перевірки на герметичність	P = 0,2 МПа, τ = 1 год
Кт 1.3.3. Стерилізація обладнання	Обладнання, температура стерилізації, час стерилізації	Манометр технічний, годинник	Тиск визначається безперервно під час стерилізації	P = 0,2 МПа, t = 130-135 °C, τ = 1,5 год
<b>ДР 2. Підготовка аераційного повітря</b>				
Кт 2.2.	Повітря на виході з	Манометр,	Після очистки повітря у	E = 80 %,

Попереднє грубе очищення повітря	фільтра, ступінь очищення, перепад тисків	перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	фільтрі грубого очищення	тиск згідно паспорту
Кт 2.3 Стиснення повітря	Стиснене повітря, температура, тиск	Манометр технічний, термометр	Після компресування повітря	$P = 0,4 \text{ МПа}$ $t = 120-250 \text{ }^\circ\text{C}$
Кт 2.4 Охолодження повітря та видалення зайвої вологи	Охолоджене повітря, повітря після видалення зайвої вологи, температура	Термометр технічний, психометричний метод	Після охолодження повітря та видалення зайвої вологи	$t = 15-18^\circ\text{C}$ , $W = 60 \%$
Кт 2.5 Нагрівання повітря Очищення повітря в головному фільтрі	Нагріте повітря, температура Очищене повітря, ступінь очищення, перепад тисків	Термометр технічний Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після нагрівання повітря Після очистки повітря у фільтрі головного очищення	$t = 30 - 40 \text{ }^\circ\text{C}$ $E = 97 - 99 \%$ , тиск згідно паспорту
Кт 2.6. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі	Очищене повітря, ступінь очищення	Перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря в індивідуальному фільтрі	$E = 99,999 \%$

**ДР 3. Приготування та стерилізація титрувальних агентів**

Кт, Км 3.1. Приготування і стерилізація 6% розчину гідроксиду натрію	Гідроксид натрію, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,15 МПа, t=131 °С, τ = 40хв, відсутність мікробіоти
---	--	---	---	---

**ДР 4. Приготування та стерилізація поживного середовища****ДР 4.1. Підготовка поживного середовища для вирощування інокуляту об'ємом в колбах на качалках**

Кт, Км 4.1.1. Приготування і стерилізація композиції I	Композиція I, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,05 МПа, t=115 °С, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1.2. Приготування і	Композиція II, температура, час,	Манометр технічний,	Тиск визначається безперервно під час	P=0,15 МПа, t=131 °С,

стерилізація композиції II	стерильність	годинник, мікробіологічний контроль	стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$\tau = 40$ хв, відсутність мікробіоти
<b>ДР 4.2. Підготовка поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 10 л</b>				
Кт, Км 4.2.1. Приготування і стерилізація композиції I	Композиція I, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P=0,05$ МПа, $t=115$ °С, $\tau = 30$ хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.2.1. Приготування і стерилізація композиції II	Композиція II, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P=0,15$ МПа, $t=131$ °С, $\tau = 40$ хв, відсутність мікробіоти
<b>ДР 4.3. Приготування поживного середовища для виробничого культивування у ферментері об'ємом 100 л</b>				
Кт, Км 4.3.1.	Композиція I,	Манометр	Тиск визначається	$P=0,05$ МПа,

Приготування і стерилізація композиції I	температура, час, стерильність	технічний, годинник, мікробіологічний контроль	безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t=115^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 30$ хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.3.2. Приготування і стерилізація композиції II	Композиція II, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P=0,15$ МПа, $t=131^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 40$ хв, відсутність мікробіоти
<b>ТП 5. Підготовка посівного матеріалу</b>				
Кт, Км 5.4 Вирощування інокуляту в колбах на качалках	матеріал, швидкість перемішування, тривалість культивування, температура, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, фотоелектроколориметр, мікробіологічний контроль	Під час вирощування посівного матеріалу в інокуляторі і в кінці процесу	$\tau = 42$ год, $t = 32^{\circ}\text{C}$ , $n = 200$ об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти

Кт, Км 5.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 10 л	матеріал, швидкість перемішування, тривалість культивування, температура, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, фотоелектроколомиметр, мікробіологічний контроль	Під час вирощування посівного матеріалу в інокуляторі і в кінці процесу	$\tau = 42$ год, $t = 32^{\circ}\text{C}$ , $n = 200$ об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти
---	--	---	---	---

### ТП 6. Виробничий біосинтез

Кт, Км, Кх 6. Виробниче культивування у ферментері об'ємом 100 л	Культуральна рідина, швидкість перемішування, температура, рН, тривалість культивування, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, датчик рН, фотоелектроколомиметр, мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль та визначення рівня біомаси проводять кожні 4-6 годин, концентрація фібринолітичного ферменту визначається після закінчення процесу культивування	$t = 32^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 42$ год, $\text{pH} = 7,0$ , $n = 200$ об/хв, $C = 5867$ ОД/мл, відсутність сторонньої мікробіоти.
---	---	--	---	--

## 9. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА ГОТОВОГО ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ

### 9.1. Обґрунтування вибору підготовки первинної упаковки.

Отриманий препарат – це сипучий білий або жовтуватого кольору гігроскопічний порошок. Зазвичай існує два основних типи первинної упаковки: скляні ампули та флакони.

Флакон (від лат. *Flasco* - "пляшка для вина") — спеціальна тара для зберігання рідин, сипких і таблетованих речовин.

Використання флаконів несе в собі ряд переваг: флакон як і ампули забезпечують повну герметичність, але ще й зручніші в застосуванні, оскільки завдяки гумовій пробці можна приготувати розчин не розгерметизовуючи флакона, що дозволяє з одного флакона робити декілька ін'єкцій в залежності від призначеної лікарем дози

Ампула (від лат. *ampulla*, зменч. від *amphora*—ємкіст у римлян), посудина зі скла з широкою підставкою і вузькою шийкою. Лікарська ампула служить для зберігання дозованих стерилізованих розчинів, сироваток, а також порошоків і рідин, що змінюються при дії на них повітря. Введені в 1886 р. паризьким аптекарем Лімузеном, ампули отримали широке вживання в медичній практиці в силу наступних своїх переваг: Використання ампул є стерильність препарату та зручність дозування.

Проте при необережному відкриванні залишки скла можуть потрапити у препарат, також складність у виготовленні, наповненні та запаюванні ампул, несе в свою чергу додаткові витрати.

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Обґрунтування вибору технологічної схеми	Літ.	Арк.	Акрюшів
Розроб.		КОБИЛИНСЬКИЙ						7
Перевір.		СТАРОВОЙТОВА.						
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		СТАБНИКОВ						Кафедра БТМ

Але оскільки ампули при однаковій кількості лікарської речовини потребують меншої кількості скла, їх упаковка є більш компактною, а також враховуючи те що на ринку виробників первинної упаковки для ампул з'являють такі ж технології як і для флаконів: тобто весь цикл виробництва ампул а також стерилізація та де пірогенізація з подальшою упаковкою к стерильні, герметичні касети.

Отже враховуючи всі перелічені фактори як первинна упаковка пропонується обирати ампули.

## **9.2. Обґрунтування вибору діючих та допоміжних речовин.**

Оскільки діюча речовина препарату фібринолізин білкової природи, і має високу біологічну активність, то для збереження його біохімічних властивостей та покращення фармакокінетики застосовується ряд допоміжних речовин:

- Натрію додецилсульфат — натрієва сіль лаурилсірчаної кислоти, аніоноактивна поверхнево-активна речовина покращує розчинність препарату;
- D-маніт – має протинабрякову, діуретичну дію. Підвищує осмотичний тиск плазми, сприяє переходу рідини з тканин в судинне русло, тобто покращує фармакокінетику препарату; дитіотрейтол – відновлювальний агент.

Допоміжні речовини до препарату можливо додати перед стадією фасуванням у факони, оскільки ми розфасовуватимемо препарат у рідкому вигляді, для подальшого його висушування в ліофільній сушилці. Отже допоміжні речовини найкраще буде додати в збірнику, в якому рідка маса зберігається після стадій виділення і перед стадією фасування.

## **9.3. Обґрунтування вибору обладнання для мембранної фільтрації розчину фібринолізину**

Враховуючи об'єм рідини яку необхідно профільтрувати, необхідно обрати устаткування для мембранної фільтрації з невеликою продуктивністю.

Тому ми обрали ультрафільтраційну установку Pentair X-flow UFS1-550BW, оскільки дана установка максимально проста в експлуатації, і обладнана насосом зворотної промивки, та блоком СІР-мийки (промивки), що значно спрощує обслуговування та подовжує строк служби мембран.

#### **9.4. Обґрунтування вибору обладнання для сублімації фібринолізину.**

Враховуючи не великий об'єм виробництва нам необхідно підібрати ліофільну сушилку з не великою продуктивністю, щоб не відбувалась перевитрата енергоносіїв.

- Субліматор фірми Zirbus-technology GMBH (Німеччина) модель 100-5
- Сушарка сублімаційна ЕКАФАРМ FNLY 40

Дані установки для сублімації володіють приблизно однаковими параметрами енергоспоживання та габаритними розмірами (Ш)х(Д)х(В): 1495х2000х24. Тому при виборі сублімаційної сушарки ми врахували наявність у німецького зразка автоматизованої системи завантаження лотків, що в свою чергу автоматизує процес завантаження і вивантаження, виключає втручання людини у що є виключно позитивним, та й процес все ще потребує повної асептики. Тому розумним буде зупинити вибір на субліматорі моделі 100-5.

#### **9.5. Обґрунтування вибору обладнання для наповнення ампул.**

Враховуючи не великі об'єми виробництва, нам необхідно використовувати пакувальну машину з невеликими об'ємами завантаження та продуктивністю. Пропонуємо обрати з наступних пакувальних апаратів:

- машина для наповнення ампул ААG4/1-2
- автомат для наповнення ампул АП-4М2

Автоматична машина для наповнення ампул ААG4/1-2

Спосіб наповнення шприцевий, що є перевагою даної машини оскільки забезпечує більшу точність наповнення.

**Напівавтомат для наповнення ампул АП-4М2** призначений для наповнення ампул типу В та ВП місткістю від 1 до 20 мл поміщених в касети вакуумним способом.

Продуктивність (1 мл), касет в годину 70

Тривалість циклу, сек 40-60

Тиск пневмомережі, МПа 0,025

Тиск вакуумної мережі, 0,08 МПа

Габарити напівавтомата, мм 720x620x945

Споживана потужність, кВт 0,1

Маса, кг 105

Даний апарат має суттєвий недолік пов'язаний з меншою точністю вакуумного наповнення ампул. Але оскільки даний апарат наповнює ампули поміщені в касети, то даний фактор суттєво полегшує завантаження ампул в сублимаційний апарат, за рахунок того що вони вже поміщені а касети. Отже наш вибір зупинився на **автоматі АП-4М2**



Рис. 9.1. Схема процесу підготовки ампул *EZ-Fill*

## 9.6. Обґрунтування вибору обладнання для запаювання ампул.

- Машина для запаювання ампул з інертним середовищем типу 432

- Машина для запаювання ампул АП-6М

Машина для запаювання ампул з інертним середовищем типу 432. Машина забезпечує невеликий інтервал часу між виходом ампул, заповнених інертним газом, і їх запаювання, що дозволяє отримувати ампули з великим відсотком вмісту інертного газу у вільному об'ємі ампул.

Машина для запаювання ампул АП-6М а призначена для запаювання без відтяжки капілярів ампул типу В та ВП місткістю 1,2,5,10,20 мл і укладання їх в прямокутні касети типу АП 16-4-0. Заповнення інертним газом не проводиться.

Машина типу 432 має перевагу, оскільки інертний газ яким заміщується повітря збільшує термін придатності лікарського засобу, але оскільки в ампулах знаходиться порошок, то вихід інертного газу з форсунки може спровокувати розпилення порошку, тому найдоцільнішим буде використовувати машину для запаювання ампул АП-6М .

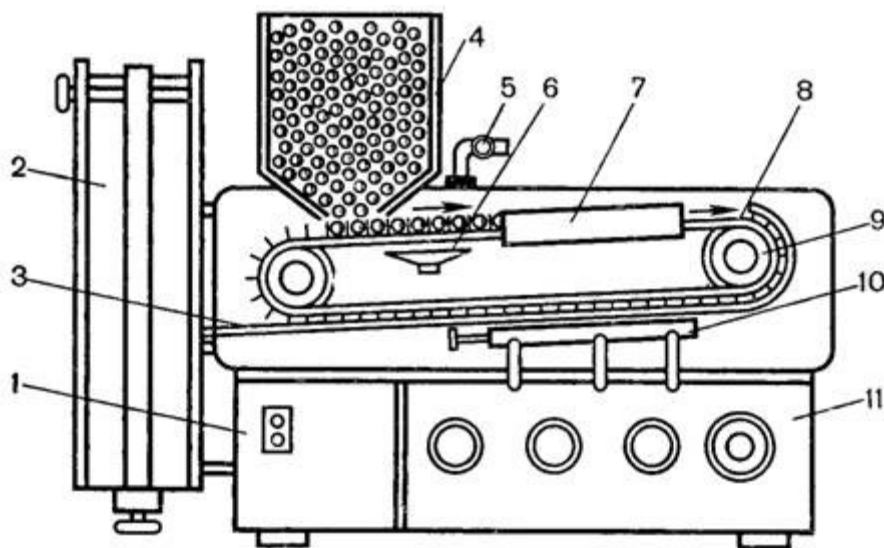


Рис. 9.2. Машина для запаювання ампул (модель АП-6М)

1 – корпус; 2 – укладальник ампул в касети; 3 – напрямна; 4 – бункер; 5 – зрошувач; 6 – ванна; 7 – щиток; 8 – транспортерна стрічка; 9 – шквіви; 10 – пальник; 11 – панель управління

### 9.7. Пакування і маркування готової продукції

Пакування й оформлення готової продукції включає в себе пакування ампул (разом з інструкціями по використанню) у картонні пачки, з наступним

пакуванням пачок у коробки з подальшою передачею на склад проміжного контролю та зберігання до отримання позитивного висновку від відділу контролю якості щодо можливості реалізації продукції..

На сьогодні розроблено багато функціональні, автоматизовані, економічно вигідні.

Автомат призначений для укладання інструкцій і упаковки ампул в пачки складається з наступних основних вузлів і механізмів:

- транспортеру подачі ампул;
- каналу загрузки конвалюти;
- механізму формування пачки;
- вузла “СК” для складання інструкцій з каналом загрузки інструкцій;
- вузла вкладання інструкцій і ампул у пачки;
- багатопозиційної станції закривання пачок;
- друкувального механізму.

Всі ці операції в змозі виконувати пакувальна лінія. При пакуванні ампул у пачки на останні наноситься номер серії та дата виготовлення.

У моделі AS100 (PROMATIC, Італія) (Рис. 9.11) «балконний» тип конструкції машини дозволяє відокремити механічну частину від робочої пакувальної частини, що відповідає всім гігієнічним нормам і нормам з технічної безпеки. Пакування продукту в картонну пачку проводиться покроково і за допомогою електричних синхронізуючих систем. Керування машиною здійснюється через сенсорний дисплей. Ручне колесо для настройки вузлів машини під нову довжину картонної пачки. В якості основних вузлів приводу машини використовуються копіри. Пневматична система захоплення картонної пачки. Для завантаження картонних пачок магазин машини можна встановлювати в горизонтальне положення. Є датчик наявності мінімальної кількості пачок. Використання програмно-логічного контролера в управлінні машиною дозволяє зберігати налаштування для 100 різних типів продукції. Система визначення відсутності продукту і відбраковування.

Опції:

- чорнильний принтер,
- автоматичний пристрій складання інструкцій,
- система зчитування штрих-коду на коробці,
- система зчитування штрих-коду на інструкції,
- додатковий конвеєр на виході машин,
- додатковий набір форматних частин.

Виходячи з опису та характеристик пропонується обрати пакувальну машину моделі AS100 (PROMATIC (Італія), оскільки: висока продуктивність, наявність системи визначення відсутності продукту і відбраковування, датчик наявності мінімальної кількості пачок.

## Розділ 10. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Таблиця 10.1

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
1	2	3	4
Ц-1	Центрифуга	1	Осаджувальна горизонтальна центрифуга об'ємом на 100 л., інтегрований прямий привід, закритий двигун з водяним охолодженням, швидкість 50-220 л/год Сталь AISI 316L. Виробник: (ЕКОМАШ, Україна) <sup>1</sup>
Н-2, Н-4, Н-6, Н-14	Насос відцентровий	4	Насос відцентровий Debem MB 25. Продуктивність 2,5 м <sup>3</sup> /год, матеріал поліпропілен (PP/PVDF). Виробник: «Debem» (Україна). <sup>2</sup>
Гф-3	Гель-фільтраційна колонка	1	Toyoparl DEAE-650(M) максимальний тиск до 3 Бар, розмір часток 65 мкм, робочий діапазон 2-8 рН, матриця – метакрилат, потужність: 30 г/л±5 адсорбційна здатність (BSA); 30 мг/мл ±5 мг/мл зв'язуюча здатність (бичачий сироватковий альбумін). Виробник – Toyosoda, Японія <sup>3</sup>
3-5	Змішувач для змішування допоміжної речовини	1	Змішувач об'ємом 100 л, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (20-1000 об/хв), сталь н/ж 316L AISI. Виробник: «Промвіт» (Україна) <sup>4</sup>
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис
Розроб.	КОБИЛИНСЬКИЙ		
Перевір.	СТАРОВОЙТОВА.		
Реценз.			
Н. Контр.			
Затверд.	СТАБНИКОВ		
Специфікація обладнання			Літ.
			Арк.
			Аркушів
			3
			<b>Кафедра БТМ</b>

Мф-7	Ультрафільтраційна установка	1	Ультрафільтраційна установка Pentair X-flow UFS1-550BW – трубчаста ультрафільтраційна мембрана, розмір часток 0,03 мікрони. Виробник: X-Flow BV Marssteden, Нідерланди <sup>5</sup>
На-8	Машина для наповнення ампул	1	автомат для наповнення ампул АП-4М2. Продуктивність (мл), касет за годину 70 Тривалість циклу, сек 40-60 Тиск пневмомережі, МПа 0,025 Тиск вакуумної мережі, МПа 0,08. Виробник: «Трансмедтех» (Україна) <sup>6</sup>
Сш-9	Люфільно висушувальний апарат	1	Сушарка сублімаційна модель 100-5. Корисна площа полиць: 6 м <sup>2</sup> , Діапазон температур полиць: від -55°С до +60°С, Сушильна камера з'єднана з конденсором, що вловлює віддалену вологу. Продуктивність: 50 кг/добу Мінімальна температура: -80 °С Мінімальний вакуум у системі: <0,005 мбар.Виробник:Zirbustechonology GmbH (Німеччина) <sup>7</sup>
Мз-10	Машина для запаювання ампул	1	Машина для запаювання ампул (модель АП-6М). Продуктивність, ампул/година 6000 – 15500. Напруга мережі змінного струму частотою 50 Гц, 380 Маса, кг 190. Виробник: «Трансмедтех» (Україна) <sup>6</sup>
Мп-11	Пакувальна машина	1	Пакувальна машина моделі AS100. Діапазон форматів:А: від 20 до 100 мм, В: від 12 до 60 мм, Н: від 60 до 150 мм Станція вставки коробок та станція вставки листівок. Станція викиду Потужність: 380 В, 50 Гц, 3 кВт, 8 А. Виробник: «Проматік» (Італія) <sup>8</sup>
Р-13	Реактор	1	Реактор об'ємом 150 л, оснащений

			сорочкою та перемішувальним пристроєм (20-1000 об/хв), сталь н/ж 316L AISI. Виробник: «Промвіт» (Україна) <sup>4</sup>
Д-13	Об'ємно-ваговий дозатор	1	Виготовлений зі сталі 12Х18Н10Т, відносна похибка дозування 0,4%, продуктивність до 1 доз/103в. Виробник: «Промвіт» (Україна) <sup>4</sup>

**Примітка:** пошук та підбір обладнання здійснювався з використанням наступних електронних джерел:

1. [https://www.ecomass.com.ua/product\\_tax/czentrifugi-rotor-cilindroconichnii-protutochna/](https://www.ecomass.com.ua/product_tax/czentrifugi-rotor-cilindroconichnii-protutochna/) (ЕКОМАШ, Україна),
2. [www.debem.com.ua](http://www.debem.com.ua) («Debem», насоси),
3. <https://www.sigmaaldrich.com/UA/en/product/supelco/807473> (Тоуосода, Японія),
4. <http://promvit.com.ua/> («Промвіт», ємнісне обладнання та ферментатори),
5. <https://xflow.pentair.com/en> (X-FlowBVMarssteden, Нідерланди),
6. <http://transmedteh.com/contacts/> («Трансмедтех» Україна),
7. <https://www.zirbus.com> Zirbustechonology GmbH (Німеччина),
8. <https://www.romaco.com/ru/ispolzuemye-tekhnologii/promatic/> «Проматік» (Італія)

**Розділ 11. Опис технологічної схеми отримання готового препарату  
ТП 8. Виділення та очищення фібринолітичного ферменту**

*ТП 8.1. Центрифугування фібринолітичного ферменту*

Середовище перекачується від ферментера до соплового сепаратора та центрифугується при 5000 g 30 хв.

*ТП 8.2. Осадження фібринолітичного ферменту*

Після завершення процесу центрифугування додають до нього сульфат амонію з насиченням до 90 %. Дана суміш витримується 24 год при 4 °С.

*ТП 8.3. Центрифугування фібринолітичного ферменту*

Виділення та збирання осаду проводиться методом центрифугування, використавши осаджувальну горизонтальну центрифугу. Дане середовище центрифугується при 5000 g 30 хв. Освітлена рідина відкачується насосом з центрифуги. Даний осад в реакторі розчиняється 0,01 М трис-НСІ буфером (співвідношення 1:1,5), рН повинно мати значення 7,5 для передачі на стадію очищення.

*ТП 8.4. Очищення фібринолітичного ферменту*

Очищення фібринолітичної пептидази проводитимемо шляхом гель-фільтрації. Для гель-фільтрації використаємо колонку Toyopearl DEAE-650(M) (Toyosoda, Японія) промислових масштабів.

**ТП 9. Підготовка виробничого процесу**

Для виробництва лікарського засобу Фібринолізин, порошок ліофілізований для приготування розчину для ін'єкцій по 20 000 ОД у ампулах, використовується сировина та матеріали, які пройшли вхідний контроль якості

<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		КОБИЛИНСЬКИЙ			Опис технологічної схеми отримання готового продукту	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушів</i>
<i>Перевір.</i>		СТАРОВОЙТОВА.						5
<i>Реценз.</i>						Кафедра БТМ		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		СТАБНИКОВ						

за показниками нормативної документації для вхідного контролю, відповідають всім показникам якості і дозволені відділом контролю якості до використання. На початку стадії при отриманні кожної серії, кожного найменування сировини і матеріалів перевіряють наявність дозволу відділу контролю якості на використання у виробництві.

#### *ТП 9.1. Приготування розчину допоміжних речовин.*

Перед розчиненням на технічних вагах зважуємо наважки: Натрію додецилсульфату – 7.3г, D-маніту – 36.5г. Наважки розчиняють в 250 мл води очищеної в колбі на 500 мл, після чого колбу закриваємо марлевою пробкою і стерилізуємо в автоклаві при температурі 131 °С, тиску 0,05 МПа протягом 40 хв

#### *ТП 9.2. Внесення допоміжних речовин до суспензії фібринолізину.*

Через люк в верхній частині збірника (3-5), під полум'ям факела з колби виливається попередньо простерилізований розчин допоміжних речовин від ТП 9.1, після чого збірник закривається, і вмикається мішалка. Після перемішування суспензія подається на мембранну фільтрацію на ТП 9.3.

#### *ТП 9.3. Фільтрація суспензії фібринолізину.*

Суспензія фібринолізину з допоміжними речовинами насосом (Н-6) подається на установку мембранної фільтрації (Мф-7) з розміром пор 0.48 мкм та 0.22 мкм. Від мембранно-фільтраційної установки стерильна суспензія надходить на розливну машину (На-8).

#### *ТП 9.4. Підготовка ампул*

Процес підготовки ампул складається з операцій розтарювання, сортування, миття та стерилізації. Операцію розтарювання з подальшим сортуванням здійснюють в приміщенні з ненормованим вмістом частинок і мікроорганізмів.

Ампули після розтарювання та сортування передають у приміщення мийки через санпропусник сировини. Мийка та ополіскування здійснюється на механізованій машині в автоматичному режимі. Ампули миють водою

очищеною, споліскують водою для ін'єкцій і продувають стисненим повітрям, очищеним на фільтрі. Після мийки ампули надходять у тунельний стерилізатор.

Сушка, стерилізація та охолодження ампул здійснюється в тунельному стерилізаторі.

Під час процесу здійснюють контроль режиму мийки, стерилізації та охолодження ампул.

Стерильні ампули з тунельного стерилізатора надходять на стадію розливу. Ампули після стерилізації контролюють на стерильність та механічні вклучення.

## **ТП 10. Дозування та висушування.**

### *ТП 10.1 Розлив стерильного розчину у ампули*

Використовується метод розливу. Суспензію фібринолізину з допоміжними речовинами від мембранно-фільтраційної установки (Мф-7) розливаємо в скляні ампули в автоматі для наповнення ампул АП-4М2, після чого по конвеєрній стрічці ампули незапалими надходять в касету і касета автоматично потрапляє на сублимаційну сушку (Сш-9). У процесі дозування здійснюють контроль за показниками: відхилення від ваги об'ємної дози, механічні вклучення. Крім того здійснюють контроль кількості отриманих ампул зі стерильним розчином.

### *ТП 10.2 Сублимаційне висушування Фібринолізину*

Касети з суспензією у ампулах від (Мф-7) автоматично завантажуються в сублимаційну сушилку. Висушування проводять при температурі  $-60^{\circ}\text{C}$  протягом 2 х годин, після сублимації ампули надходять на ПМВ 11.

## **ПМВ 11. Пакування, маркування, відвантаження.**

### *ПМВ 11.1 Запаювання ампул.*

Ампули подаються від ТП 10.2. до машини для запаювання ампул АП-6М за допомогою перехідного ламінару. Після запаювання капіляра здійснюють

контроль запаяних ампул з препаратом за показниками: зовнішній вигляд, механічні включення.

Ампули з лікарським засобом по транспортеру надходять на операцію ПМВ

11.2 Маркування розфасованої непромаркованої продукції етикетками-самоклейки

*ПМВ 11.2. Маркування розфасованої непромаркованої продукції етикетками-самоклейки та складання в короба.*

Операція проводиться в приміщенні маркування та пакування з ненормованим вмістом механічних часток та мікроорганізмів в повітрі на етикувальній машині відповідно до діючої інструкції по експлуатації.

На початку процесу здійснюється налаштування процесу роботи машини для наклеювання етикеток (Мп-11), а також сканера, призначеного для зчитування штрих-коду з етикеток-самоклейок (з метою відбракування етикеток з невідповідним штрих-кодом).

Під час технологічного процесу здійснюють контроль правильності маркування етикеток датою закінчення терміну придатності та номером серії, якість наклеювання етикеток.

Регламентовану кількість ампул з лікарським засобом Фібринолізин, промаркованих етикетками-самоклейками, пакують в коробку для групового пакування, разом з відповідною кількістю інструкцій для медичного застосування та одним листом укладальника.

Кожну коробку з лікарським засобом обклеюють етикеткою-бандероллю, з відповідним маркуванням.

Під час проведення операції пакування в коробки, здійснюють контроль: комплектності упаковки, правильності та чіткості нанесення маркувальних реквізитів, кількості отриманих коробок з лікарським засобом.

Відповідну кількість коробок з лікарським засобом з одним листком укладальника вкладають в ящики з гофрокартону.

Під час технологічного процесу здійснюють контроль комплектності упаковки, правильності нанесення маркувальних реквізитів та кількості отриманих групових упаковок.

Відходи збираються та передаються на утилізацію.

## **ТП 12 Контроль якості готової субстанції Фібринолізин**

З кожної партії відбирають зразки препарату та перевіряють якість готової субстанції відповідно до системи оцінки якості ДСТУ ISO 13485:2005 Вироби медичні. Системи управління якістю. Вимоги щодо регулювання.

## **ЗВ 13. Знешкодження відходів**

До стадії подаються речовини та матеріали наступного походження:

- складові миючих та дезінфікуючих розчинів, що застосовуються на стадії санітарної підготовки обладнання та приміщень;

- компонентами напівпродуктів, що переробляються на стадіях.

Апаратурне оформлення виробництва не забезпечує 100% використання сировини, напівпродуктів, матеріалів. Наявні втрати їх обумовлюють утворення твердих та рідких промислових відходів.

### *ЗВ 13.1. Знешкодження рідких відходів*

Виробничі стоки на ділянці виробництва готових лікарських препаратів утворюються на стадії санітарної підготовки та промивки обладнання та разом з загальнозаводськими стоками скидаються в міську каналізацію. Вміст специфічних речовин в стічних водах перевіряють щодо відповідності регламентними нормам. Вони не мають перевищувати значення санітарно-гігієнічних нормативів.

### *ЗВ 13.2. Знешкодження твердих відходів.*

Тверді некондиційні відходи виробництва збираються у спеціальну тару та направляються на полігон твердих побутових відходів. Не допускається змішування різних видів відходів під час зберігання та транспортування.

## Розділ 12. Контроль виробництва

### 12.1. Контроль первинної упаковки

Ампули що надходять від постачальника піддають регламентованому контролю, що полягає у перевірці кожної виготовленої ампули на відсутність механічних забруднень, а також в кількісному контролі і мікробіологічному аналізі. Контроль здійснюють вибірково щодо кожної серії ампулірованих ліків і проводять в заводській лабораторії.

Відсутність механічних забруднень перевіряють візуально або з допомогою відповідних оптичних пристроїв

### 12.2. Мікробіологічний контроль

Після завершення виготовлення партії препарату здійснюється вибірковий мікробіологічний контроль вмісту ампул.

Мікробіологічний контроль проводять наступним чином: здійснюють розсів проб розчиненого препарату на агаризовані середовища для виявлення сторонніх мікроорганізмів. Для виявлення бактерій використовуємо середовище з м'ясо-пептонним агаром (МПА), для дріжджів та грибів – середовище з сусло-агаром (СА) або з глюкозо-картопляним агаром (ГКА).

Проби відбирають у стерильних умовах ампул і для виявлення сторонньої мікрофлори засівають на перераховані вище середовища.

Однак, такі методи є досить тривалими у часі, тому для швидшого виявлення сторонньої мікрофлори проводять мікроскопіювання методом «роздавленої краплі», та переглядають у світловому мікроскопі при збільшенні  $\times 40$ .

### 12.3. Контроль концентрації та активності фібринолізину.

Наявність і кількість фібринолізину в отриманому препараті підтверджують методом електрофорезу в поліакріламідном гелі у присутності

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		КОБИЛИНСЬКИЙ			Контроль виробництва	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		СТАРОВОЙТОВА.						4
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		СТАБНИКОВ						

додецилсульфату натрію. Аналіз електрофореграми підтверджує присутність в пробі фібринолізину з молекулярною масою 14,7 кДа і дозволяє визначити кількість фібринолізину, використовуючи калібрувальну пряму.

Біологічна активність отриманого препарату фібринолізину. Як стандарт для визначення активності випробовуваного фібринолізину використовують відкалібрований по міжнародному еталонному реагенту зразок фібринолізину, що зберігається при температурі  $-70^{\circ}\text{C}$  і розморожується лише один раз.

#### **12.4. Контроль якості закупорювання (запаювання) ампул.**

Контроль якості закупорювання (запаювання) проходять всі ампули. Для визначення герметичності ампул використовують метод заснований на візуальному спостереженні за світінням газового середовища всередині ампули під дією високочастотного електричного поля 20-50 МГц. В залежності від величини залишкового тиску всередині ампули спостерігається різний колір світіння. Визначення проводять при  $20^{\circ}\text{C}$  і діапазоні вимірювань від 10 до 100 кПа.

## Карта постадійного контролю

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник, що визначається	Метод контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
1	2	3	4	5
ТП 8 Контроль вмісту мікроорганізмів та часток у повітрі виробничих приміщень	Поверхні виробничих приміщень (стіни, підлога, двері), мікробіологічна чистота	Змиви тампонами або метод відбитків	1 раз на тиждень під час виробничого процесу. 2 рази на місяць після обробки дезинфікуючими розчинами	В змивах з площі 10x10 см допускається ріст не більше 50 мікроорганізмів (бактерій і грибів сумарно); після дезинфікуючої обробки – відсутність росту.
ТП 8 Контроль мікробіологічної чистоти технологічного обладнання та інвентарю	Поверхні технологічного обладнання та інвентарю, мікробіологічна чистота	Змиви з обладнання	Проводять вибірково не менше 1 разу на тиждень та під час виробничого біосинтезу та за 1,5 години до початку роботи (висівом на чашки Петрі)	У змивах з площі 10x10 см допустимий ріст не більше 10 колоній неспороутворюючих мікроорганізмів на 2-х паралельних чашках
ТП 9.4 Контроль мийки та стерилізації ампул	Режим стерилізації та миття Тиск Температура	Манометр технічний Термометр	Температура та тиск визначаються безперервно під час виробничого процесу шляхом розпечатування	t=330-350°C, 15 – 20 хв. Після стерилізації не повинно міститися мікроорганізмів. Термін зберігання

		Діаграма	діаграми. Автоматичний регулятор температури Манометр технічний	
ТП 10.1 Контроль розливу стерильного розчину	Прозорість розчину	Відбирання проб	На початку, в середині та в кінці приготування стерильного розчину	Повинен бути прозорим
ТП 10.1 Контроль дозування стерильного розчину	Механічні включення Відхилення від ваги об'ємної дози	Відбирання ампул. Зважування на вагах	На початку, в середині та в кінці дозування. Зважування на вагах по 10 ампул через кожні 2000 ампул з дозою	Повинні бути відсутні видимі частки.  Відхилення ваги $\pm 2,5\%$
ТП 8 Контроль запаяних ампул з ліофілізованим порошком	Механічні включення Зовнішній вигляд ампул з порошком	Відбирання ампул. Постійний візуальний огляд	На початку, в середині та в кінці дозування.  На постійній основі	Приймальне число – не більше 1 ампули з механічним включенням. Відсутність явних дефектів бою, сколів, ампул з оплавленим порошком
ТП 9 Контроль ідентифікації ампул назвою та номером партії	Якість маркування Цілісність ампул	Постійний візуальний огляд.  Відбір ампул	На постійній основі  На початку, в середині та в кінці ідентифікації.	Чітке та правильне нанесення назви та номеру партії на етикетці ампули

## Список використаних літературних джерел

1. Khristich AN, Mirkin SM. On the wrong DNA track: Molecular mechanisms of repeat-mediated genome instability. *J Biol Chem.* 2020;295(13):4134-4170. doi:10.1074/jbc.REV119.007678
2. Препарати для розрідження крові. Електронний ресурс. – Режим доступу: <https://www.symbiotyka.ua/post/preparatu-rozridzennja-krovi>
3. Фібринолітичні пепетидази *Bacillus*. Електронний ресурс. – Режим доступу: [http://microbiolj.org.ua/images/files/magazine/2013/3/2013\\_75\\_3\\_11\\_Nidialkova.pdf](http://microbiolj.org.ua/images/files/magazine/2013/3/2013_75_3_11_Nidialkova.pdf)
4. Фібринолізин. Електронний ресурс. – Режим доступу: <https://mozdocs.kiev.ua/liki/view.php?id=29917>
5. Економічне виробництво фібринолітичного ферменту з *Bacillus subtilis* WR350. Електронний ресурс. – Режим доступу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6497689/>
6. Про глобальний тягар хвороб. Електронний ресурс. – Режим доступу: <https://www.thelancet.com/gbd>
7. Серцево-судинні захворювання. Електронний ресурс. – Режим доступу: <https://phc.org.ua/news/sercevo-sudinni-zakhvoryuvannya-golovna-prichina-smerti-ukrainciv-visnovki-z-doslidzhennya>
8. Тромбоз. Електронний ресурс. – Режим доступу: <https://phcent.com.ua/13-zhovtnia-vsivnij-den-borotby-z-trombozom/>
9. Rawlings ND, Salvesen GS. Handbook of Proteolytic Enzymes. 3rd ed. London: Academic Press, Elsevier; 2013. P. 1062-1064. Електронний ресурс. – Режим доступу: <https://www.elsevier.com/books/handbook-of-proteolytic-enzymes/barrett/978-0-12-382219-2>
10. Contesini FJ, Melo RR, Sato HH. An overview of *Bacillus* proteases: from production to application. *Crit Rev Biotechnol.* 2018; 38(3):321-334. Електронний ресурс. – Режим доступу: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28789570/>
11. О.В. Мацелюх, А.С. Левішко, Л.Д. Варбанець Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, вул. Академіка Заболотного,

154, Київ МСП, Д03680, Україна Протеолітичні ферменти мікроорганізмів / ISSN 0201-8462. Мікробіол. журн., 2010, Т. 72, № 4.

12. Dubey R., Kumar J., Agrawala D., Char T., Pusp P. Isolation, production, purification, assay and characterization of fibrinolytic enzymes (*Nattokinase*, *Streptokinase* and *Urokinase*) from bacterial sources // Afr. J. Biotechnol. – 2011. – 10, N 8. – P. 1408–1420 Електронний ресурс. – Режим доступу: <https://scialert.net/abstract/?doi=pjbs.2014.529.534>

13. Фібринолізин. Електронний ресурс. – Режим доступу: [http://likicontrol.com.ua/інструкція/?\[3434\]](http://likicontrol.com.ua/інструкція/?[3434])

14. Український Центр Суспільних Даних. Електронний ресурс. – Режим доступу: [https://socialdata.org.ua/prosto\\_cyfr/](https://socialdata.org.ua/prosto_cyfr/)

15. Тромбоемболія. Електронний ресурс. – Режим доступу: <https://www.webcardio.org/Forums/Thread.aspx?thread=83&mid=34&pageid=5&itemID=7>

16. Порушення мозкового кровообігу. Електронний ресурс. – Режим доступу: <https://www.umj.com.ua/article/124543/aktualni-pitannya-etioopatogenezu-gostrih-porushen-mozkovogo-krovoobigu-ta-diferentsijovanogo-likuvannya-patsiyentiv-u-najgostrishij-period-ishemichnogo-insultu>

17. Інфаркт міокарда. Електронний ресурс. – Режим доступу: <https://www.umj.com.ua/article/160518/infarkt-miokarda-informatsijna-kampaniya-maye-pokrashhiti-situatsiyu-v-krayini>

18. Тромбоз. Електронний ресурс. – Режим доступу: <https://www.vz.kiev.ua/tromboz-glybokyh-ven-shho-mayut-znaty-likar-i-patsiyent/>

19. Актилізе. Електронний ресурс. – Режим доступу: [http://likicontrol.com.ua/інструкція/?\[21457\]](http://likicontrol.com.ua/інструкція/?[21457])

20. Арикстра. Електронний ресурс. – Режим доступу: [http://likicontrol.com.ua/інструкція/?\[25667\]](http://likicontrol.com.ua/інструкція/?[25667])

21. Пентосан. Електронний ресурс. – Режим доступу: [http://likicontrol.com.ua/інструкція/?\[9234\]](http://likicontrol.com.ua/інструкція/?[9234])

22. Фрелсі. Електронний ресурс. – Режим доступу: [http://likicontrol.com.ua/інструкція/?\[29736\]](http://likicontrol.com.ua/інструкція/?[29736])

23. Cost-effective fibrinolytic enzyme production by *Bacillus subtilis* WR350 using medium supplemented with corn steep powder and sucrose. [Rui Wu](#), [Guiguang Chen](#), [Shihan Pan](#), [Jingjing Zeng](#), [Zhiquan Liang](#). Affiliations expand. PMID: 31048760. PMCID: [PMC6497689](#). DOI: [10.1038/s41598-019-43371-8](https://doi.org/10.1038/s41598-019-43371-8)

Електронний ресурс. – Режим доступу:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6497689/>

24. Пирог Т.П., Ігнатова О.А. Загальна біотехнологія: Підручник. – К.: НУХТ, 2009. – 336 с

25. Fahim S, et al. Oxygen transfer in three phase inverse fluidized bed bioreactor during biosurfactant production by *Bacillus subtilis*. *Biochemical Engineering Journal*. 2013;76:70–6. doi: 10.1016/j.bej.2013.04.004.

Електронний ресурс. – Режим доступу:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1369703X13000995?via%3>

[Dihub](#)

26. Zhou X, Zhou X, Xu Y. Improvement of fermentation performance of *Gluconobacter oxydans* by combination of enhanced oxygen mass transfer in compressed-oxygen-supplied sealed system and cell-recycle technique. *Bioresource Technology*. 2017;244:1137–41. doi: 10.1016/j.biortech.2017.08.107. Електронний ресурс. – Режим доступу: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28863996/>

27. Сидоров Ю.І., Влязло Р.Й., Новіков В.П. Процеси і апарати мікробіологічної та фармацевтичної промисловості. Технологічні розрахунки. Приклади і задачі. Основи проектування. Львів: «Інтелект-Захід», 2008. – 736с.

28. Біореактор. Електронний ресурс. – Режим доступу:  
<https://bionet.com/technology/f3-industrial-bioreactor/>

29. Наказ МОЗ України «Про затвердження методичних рекомендацій щодо виконання санітарно-гігієнічних вимог та проведення мікробіологічного контролю у виробництві нестерильних лікарських засобів» від 14.12.2001 №502.

30. Наказ МОЗ України. Електронний ресурс. – Режим доступу:  
<https://mozdocs.kiev.ua/view.php?id=2242>

31. Хлорантоін. Електронний ресурс. – Режим доступу:  
<https://farmakos.ua/ua/hlor.html>

32. Санокварт. Електронний ресурс. – Режим доступу:  
<https://famidez.ua/index.php/produksiya/dezinfektsiya/poverkhni/sanokvart>

33. Елинов Н.П. Общие закономерности строения и развития микробов – биологичний агентів біологически активных веществ. – М.: «Медицина», 1977. – 288с.
34. Samson R.A, Hadlok R, Stolk AC. "A taxonomic study of the *P. chrysogenum* series". –1977. – Vol. 169 – P. 169–175 с.
35. Astrup T, Müllertz S. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity ☆ *Archives of Biochemistry & Biophysics*. 1952;40:346–51. doi: 10.1016/0003-9861(52)90121-5. Електронний ресурс. – Режим доступу: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12997222/>
36. Методи контролю. Електронний ресурс – Режим доступу: <http://www.studfiles.ru/preview/5194479/page:11/>
37. Навчальний посібник для студентів вищих навчальних закладів III-IV рівня акредитації «Фармацевтична хімія. Аналіз препаратів біотехнологічного виробництва» / За загальною редакцією професора В.А. Георгіянц. – Харків: 2013. – 215 с.
38. О.В. Мацелюх, Н.А. Нідялкова, Л.Д. Варбанець. Очищення і фізико-хімічні властивості пептидази *Bacillus thuringiensis* імв в-7324 з еластазою і фібринолітичною активністю / ISSN 0201 — 8470. Укр. біохім. журн., 2012, т. 84, № 6. [http://ukrbiochemjournal.org/wp-content/uploads/2016/05/Matselyukh\\_84\\_6.pdf](http://ukrbiochemjournal.org/wp-content/uploads/2016/05/Matselyukh_84_6.pdf)
39. Cost-effective fibrinolytic enzyme production by *Bacillus subtilis* WR350 using medium supplemented with corn steep powder and sucrose. [Rui Wu](#), [Guiguang Chen](#), [Shihan Pan](#), [Jingjing Zeng](#), [Zhiqun Liang](#). Affiliations expand. PMID: 31048760. PMCID: [PMC6497689](#). DOI: [10.1038/s41598-019-43371-8](https://doi.org/10.1038/s41598-019-43371-8) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6497689/>
40. <https://uk.wikitechpro.com/905128-ammonium-sulfate-precipitation-RPUVFS>
41. <https://lektsii.org/1-64169.html>
42. <https://books.google.com.ua/books?id=V5X4CQAAQBAJ&pg=PA197&lpg=PA197&dq=фармацевтична+осаджувальна+центрифуга&source=bl&ots=dXL6ltvhZR&sig=ACfU3U0Aq9ep-T7pWKMzqVUHj->

[Papg3WVQ&hl=ru&sa=X&ved=2ahUKEwj8rZjV74b0AhUDAxAIHdJ3C-cQ6AF6BAgQEAM#v=onepage&q=фармацевтична%20осаджувальна%20центрифуга&f=true](http://Papg3WVQ&hl=ru&sa=X&ved=2ahUKEwj8rZjV74b0AhUDAxAIHdJ3C-cQ6AF6BAgQEAM#v=onepage&q=фармацевтична%20осаджувальна%20центрифуга&f=true)

43. Біологічна хімія. Навчально-методичний посібник для самостійної аудиторної та позааудиторної підготовки до занять студентів III курсу фармацевтичного факультету спеціальності 7.12020101 "Фармація" та 7.12020104 «ТПКЗ». Змістовий модуль 1. Вступ до біохімії. Прості та складні білки. Ферменти склали: Александрова К.В. – д.х.н., професор Шкода О.С. – к.фарм.н., доцент Макоїд О.Б. – к.б.н., доцент Сінченко Д.М. – к.фарм.н., асистент Левіч С.В. – к.фарм.н., асистент Васильєв Д.А. – к.фарм.н., асистент. 2016. <https://blanki-ua.com.ua/other/18987/index.html>
44. <https://en.wikipedia.org/wiki/Sephadex>
45. <https://www.pharmacencyclopedia.com.ua/article/712/sushinnya>
46. Ткаченко С. Й., Співак О. Ю. Т44 Сушильні процеси та установки. Навчальний посібник. - Вінниця: ВНТУ, 2007. - 76 с. <http://tkachenko.vk.vntu.edu.ua/file/cda121b838067ae3ea7278d7f3afc556.pdf>
47. Устаткування асептичних і неасептичних виробництв лікарських засобів. Конспект лекцій для студентів спеціальності 133 "Галузеве машинобудування" спеціалізація «Обладнання фармацевтичних та біотехнологічних виробництв» / Уклад.: В.М. Поводзинський, В.Ю. Шибецький – К.: КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2017. – 251с. <https://kzref.org/konspekt-lekcij-dlya-studentiv-specialnosti-133-galuzeve-mash.html>
48. <http://kod.poltavalk.com.ua/ask/138-spetsialni-standarty/krovonosna-systema/264-0943-trombolitichna-terapiya#:~:text=Тромболітичні%20засоби%20також%20відомі%20як,неспецифічні%20засоби%20С%20такі%20як%20стрептокіназа>
49. Гридасов В. І., Винник О. В., Оридорога Л. М. Фармацевтичне товаровознавство. – Харків, 2002. – 171 с.

50. Медичне та фармацевтичне товарознавство: практикум. / Дем'яненко В. Г., Афанасьєва В. А., Проскочило А. В., Бреусова С. В. – К. : ВСВ —Медицина, 2010. – 296 с
51. Технологія ліків промислового виробництва: Підруч. Для ТЗ8 студ. вищ. фармац. навч. закл. і фармац. ф-тів вищ. мед. навч. закл. III—IV рівнів акредитації / В. І. Чуєшов, Л. М. Хохлова, О. О. Ляпунова та ін.; За ред. В. І. Чуєшова — Х.: Вид-во НФаУ; Золоті сторінки, 2003. — 720 с.
52. За ред. Д. І. Дмитрієвського. Технологія лікарських препаратів промислового виробництва . Вінниця: НОВА КНИГА- 2008, 280 с.
53. Тихонов А.І. Біофармація. Харків: “НФаУ” - 2003, 238 с.
54. Вироби медичні. Системи управління якістю. Вимоги щодо регулювання: ДСТУ ISO 13485:2005. Введено вперше; чинний від 01.10.2006. К.: Держспоживстандарт України. 2007:56 с.