

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ**

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

«До захисту в ЕК»

Директор інституту(декан факультету)

Наталія ГРЕГІРЧАК

(підпис)

(ім'я та прізвище)

« » лютого 2024 р.

«До захисту допущено»

Завідувач кафедри

Віктор СТАБНІКОВ

(підпис)

(ім'я та прізвище)

« » лютого 2024 р.

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ МАГІСТРА**

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код та назва спеціальності)

освітньо-професійної програми Фармацевтична біотехнологія

на тему: Мікробні бета-глюкани з мукоадгезивними властивостями як складові
фармацевтичних препаратів

Виконав: здобувач 2 курсу, групи 2

ФЕЩЕНКО Маргарита Станіславівна

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Керівник КАРЛАШ Юрій Васильович

(прізвище, ім'я та по батькові повністю)

(підпис)

Консультанти

(прізвище та ініціали)

(підпис)

(прізвище та ініціали)

(підпис)

(прізвище та ініціали)

(підпис)

Рецензент

(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)

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

“ 30 ” жовтня 2023 року

ЗАВДАННЯ

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

ФЕЩЕНКО Маргарити Станіславівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Мікробні бета-глюкани з мукоадгезивними властивостями як
складові фармацевтичних препаратів

керівник роботи КАРЛАШ Юрій Васильович, к.т.н., доц.,
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від 06 листопада 2023 року № 913-кс

2. Строк подання здобувачем роботи 05.02.2024

3. Вихідні дані до роботи: субстанція – бета-глюкан з мукоадгезивними
властивостями; ТЕО – для лікування гінгівіту, населення Чернівецької області, 5 %
від потреби ринку;

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити): огляд
літератури з біотехнологічних аспектів одержання мукоадгезивних β -глюканів та
використання β -глюканів у фармацевтиці; ТЕО виробництва субстанції для ЛЗ;
обґрунтування післяферментаційних процесів; підбір технологічного обладнання з
вразуванням матеріальних потоків по стадіях; специфікація обладнання для
отримання субстанції; опис ТС; контроль виробництва субстанції; обґрунтування
вибору ТС для отримання ЛП; матбаланс на серію ЛП; специфікація обладнання для
отримання ЛП; опис ТС для отримання ЛП; опис ЛП на основі обраної субстанції
згідно АНД

5. Перелік графічного матеріалу: Апаратурні та технологічні схеми (АС) для
післяферментаційних процесів та для виробництва ЛП

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 30 жовтня 2023 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Формування завдання	01.11.2023 – 03.11.2023	
2	Пошук та аналіз наукової літератури	01.11.2023 – 15.11.2023	
3	Написання розділів літературного огляду	01.11.2023 – 15.11.2023	
4	Оформлення та внесення правок в літературний огляд	01.11.2023 – 15.11.2023	
5	Розрахунок ТЕО	16.11.2023 – 15.12.2023	
6	Написання обґрунтування післяферментаційних процесів та підбір обладнання	16.11.2023 – 15.12.2023	
7	Креслення АС та ТС для постферментаційних процесів та формування специфікації обладнання та опису ТС	16.11.2023 – 15.12.2023	
8	Підбір критеріїв та методів контролю субстанції	16.11.2023 – 15.12.2023	
9	Обґрунтування вибору ТС виробництва ЛП	16.12.2023 – 12.01.2024	
10	Вибір обладнання для виробництва ЛП, формування специфікації та креслення АС	16.12.2023 – 12.01.2024	
11	Формування технологічної схеми для виробництва ЛП та опису до неї	16.12.2023 – 12.01.2024	
12	Розробка АНД на ЛП	16.12.2023 – 12.01.2024	
13	Оформлення кваліфікаційної роботи	12.01.2024 – 20.01.2024	

Здобувач _____
(підпис)

Керівник роботи _____
(підпис)

Маргарита ФЕЩЕНКО _____
(ім'я та прізвище)

Юрій КАРЛАШ _____
(ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Роботу присвячено розробці лікарського засобу з мукоадгезивними властивостями на основі бактеріальної целюлози. Мукоадгезивні властивості передбачають прикріплення субстанції з такими властивостями до біологічних тканин, таких як слизові оболонки. Спираючись на те, що *Acetobacter senegalensis* MA1 синтезує близько 17 г/л бактеріальної целюлози, було розроблено препарат для лікування гінгівіту – захворювання ротової порожнини, яке представляє з себе запалення ясен, викликане мікроорганізмами місцевої біоти.

Наразі, бактеріальна целюлоза вивчається як новий біополімер з потенційним застосуванням у виробництві штучної шкіри, судинних трансплантатах, каркасів для тканинної інженерії, зубних імплантів, медичних прокладок, штучних кісток та хрящів, доставки ліків, білків і гормонів. При цьому, особливу увагу приліляють стоматологічній сфері, оскільки бактеріальні целюлози – доволі дешевий аналог існуючих матеріалів для пломб і потенційний засіб для лікування захворювань ротової порожнини.

Наразі, в Україні представлено дуже мало лікарських засобів з мукоадгезивними властивостями. В загальному, вони мають форми розчинів чи спреїв. Тому було запропоновано створити препарат у вигляді пластинок з хлоргексидином для лікування гінгівіту. За аналізом поточної літератури, в світі ще не існує таких лікарських засобів з такою лікувальною метою, а тому продукт буде унікальним не тільки для України, а й для всього світу. За виробничими розрахунками в рік буде створюватись близько 31 260 пластинок, що еквівалентно 40 кг бактеріальної целюлози.

Робота складається з вступу, 13 розділів та списку літератури, що містить 147 джерел. В роботі наведено 15 таблиць та 17 рисунків. Графічна частина містить технологічну та апаратурну схему, накреслені на аркушах формату А1.

Ключові слова: бактеріальна целюлоза, мукоадгезивні препарати, стоматологія, гінгівіт, оральні пластинки, *Acetobacter senegalensis* MA1.

ABSTRACT

The work is devoted to the development of a medicinal product with mucoadhesive properties based on bacterial cellulose. Mucoadhesive properties involve the attachment of a substance with such properties to biological tissues, such as mucous membranes. Based on the fact that *Acetobacter senegalensis* MA1 synthesizes about 17 g/l of bacterial cellulose, a drug was developed for the treatment of gingivitis - a disease of the oral cavity, which is an inflammation of the gums caused by microorganisms of the local biota.

Currently, bacterial cellulose is being studied as a new biopolymer with potential applications in the production of artificial skin, vascular grafts, scaffolds for tissue engineering, dental implants, medical pads, artificial bone and cartilage, and drug, protein, and hormone delivery. At the same time, special attention is paid to the dental field, since bacterial cellulose is a fairly cheap analogue of existing materials for fillings and a potential tool for the treatment of diseases of the oral cavity.

Currently, very few medicinal products with mucoadhesive properties are presented in Ukraine. In general, they have the form of solutions or sprays. Therefore, it was proposed to create a drug in the form of plates with chlorhexidine for the treatment of gingivitis. According to the analysis of the current literature, there are no such medicines with such a therapeutic purpose in the world, and therefore the product will be unique not only for Ukraine, but also for the whole world. According to production calculations, about 31,260 plates will be created per year, which is equivalent to 40 kg of bacterial cellulose.

The work consists of an introduction, 13 chapters and a bibliography containing 147 sources. The work contains 15 tables and 17 figures. The graphic part contains a technological and hardware diagram, drawn on sheets of A1 format.

Key words: bacterial cellulose, mucoadhesive drugs, stomatology, gingivitis, oral plaques, *Acetobacter senegalensis* MA1.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	7
РОЗДІЛ 1. БІОТЕХНОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ ОДЕРЖАННЯ МУКОАДГЕЗИВНИХ β -ГЛЮКАНІВ.....	11
147.1. Продуценти β -глюканів	12
147.2. Оптимізація поживного середовища та умов культивування для одержання β -глюканів.....	18
147.3. Відходи різних виробництв, які застосовуються для одержання β - глюканів.....	29
РОЗДІЛ 2. ВИКОРИСТАННЯ β -ГЛЮКАНІВ У ФАРМАЦЕВТИЦІ.....	35
2.1. Відомі препарати на основі β -глюканів.....	35
2.2. Можливе використання β -глюканів у фармацевтиці та медицині.....	37
ВИСНОВКИ ДО ЛІТОГЛЯДУ.....	41
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВА БАКТЕРІАЛЬНОЇ ЦЕЛЮЛОЗИ ДЛЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ	42
3.1. Аналіз фармакологічних властивостей цільового лікарського засобу на основі бактеріальної целюлози, галузей використання, потреби у лікарському засобів.....	42
3.1. Обґрунтування вибору форми випуску лікарського засобу на основі бактеріальної целюлози	46
3.1.1. Обґрунтування форми випуску лікарського засобу на основі бактеріальної целюлози	46
3.1.2. Обґрунтування вибору первинної і вторинної упаковки лікарського засобу на основі бактеріальної целюлози	48
3.2. Обґрунтування вибору біологічного агенту для одержання бактеріальної целюлози	49
3.3. Розрахунок потреби у бактеріальної целюлози для випуску лікарського засобу та розрахунок річної потреби у культуральній рідині для одержання розрахованої кількості бактеріальної целюлози	53

РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ	57
4.1. Обґрунтування відокремлення бактеріальної целюлози від біомаси та супернатанту	57
4.2. Обґрунтування стабілізації бактеріальної целюлози	59
4.3. Обґрунтування додаткового промивання бактеріальної целюлози.....	59
4.4. Обґрунтування методу сушіння бактеріальної целюлози	60
РОЗДІЛ 5. ПІДБІР ТЕХНОЛОГІЧНОГО ОБЛАДНАННЯ З ВРАХУВАННЯМ МАТЕРІАЛЬНИХ ПОТОКІВ ПО СТАДІЯХ.....	61
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ БАКТЕРІАЛЬНОЇ ЦЕЛЮЛОЗИ	63
РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНОГО ВИДІЛЕННЯ І ОЧИЩЕННЯ БАКТЕРІАЛЬНОЇ ЦЕЛЮЛОЗИ ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ.....	65
РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА БАКТЕРІАЛЬНОЇ ЦЕЛЮЛОЗИ ДЛЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ.	67
8.1. Визначення концентрації лужного розчину.....	67
8.2. Визначення ваги бактеріальної целюлози.....	68
8.3. Визначення вологості бактеріальної целюлози	68
8.4. Визначення ступеню регідратації бактеріальної целюлози	69
РОЗДІЛ 9. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОДЕРЖАННЯ ПЛАСТИНОК З БАКТЕРІАЛЬНОЇ ЦЕЛЮЛОЗИ З ХЛОРГЕКСИДИНОМ.....	70
9.1. Розрахунок річної потужності виробництва пластинок з бактеріальної целюлози з хлоргексидином.....	70
9.2. Обґрунтування вибору класів чистоти виробничих приміщень, підготовки персоналу, дезінфікуючих засобів, вентиляційного повітря.....	70
9.2.1. Вибір класу чистоти та вентиляційного повітря	70
9.2.2. Підготовка персоналу.....	76
9.2.3. Вибір дезінфікуючих засобів.....	78

9.3. Обґрунтування вибору підготовки первинної упаковки.....	81
9.4. Обґрунтування вибору підготовки води	81
9.5. Вибір технологічних стадій та операцій, обладнання.....	83
РОЗДІЛ 10. МАТБАЛАНС НА СЕРІЮ ОРУКОМУКОЗНОГО ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ НА ОСНОВІ БАКТЕРІАЛЬНОЇ ЦЕЛЮЛОЗИ	89
РОЗДІЛ 11. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ ОРУКОМУКОЗНОГО ПРЕПАРАТУ	92
РОЗДІЛ 12. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОТРИМАННЯ ОРУКОМУКОЗНОГО ПРЕПАРАТУ НА ОСНОВІ БАКТЕРІАЛЬНОЇ ЦЕЛЮЛОЗИ.....	96
РОЗДІЛ 13. ОПИС ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ НА ОСНОВІ БАКТЕРІАЛЬНОЇ ЦЕЛЮЛОЗИ ЗГІДНО АНД	100
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	109
ДОДАТКИ	

ВСТУП

Адгезивна речовина — це матеріал, який прикріплюється до іншої поверхні та протидіє роз'єднанню. Адгезія включає утворення привабливих зв'язків між двома субстратами, які протистоять роз'єднанню. Біоадгезія — це специфічний випадок адгезії, коли принаймні один із двох субстратів включає біологічну тканину. Крім того, якщо адгезивна поверхня субстрату є поверхнею слизової оболонки, біоадгезія називають мукоадгезією [1].

Безсумнівною перевагою сучасних мукоадгезивних лікарських препаратів є їх здатність до збільшеного часу контакту зі слизовою оболонкою за рахунок мукоадгезивних полімерів у їх складі. Такі лікарські засоби зручні для застосування в стоматології та офтальмології [2]. Мукоадгезія є корисною стратегією для систем доставки ліків, таких як таблетки, пластирі, гелі, ліпосоми, мікро/наночастинки, наносуспензії, мікроемульсії та колоїдні дисперсії. Крім збільшення часу контакту, мукоадгезивні властивості дають можливість препаратам краще проникати в місця нанесення, засоби отримують додатковий захист, що призводить до покращення доступності ліків [3].

Мукоадгезивна композиція містить один або кілька гідрофільних полімерів разом з лікарським засобом. Коли він контактує, наприклад, зі слиною, завдяки водянистій природі слини вона стає вологою, і препарат вивільняється з системи. Одночасно модифікована система доставки ліків (МСДЛ) прилипає до слизової за допомогою певної фізичної взаємодії. Функціонально слизова оболонка забезпечує захисний бар'єр, адгезивну функцію та ефект мастила. Успіх МСДЛ залежить від здатності полімеру/ів утримуватися на слизовому шарі та підтримувати вивільнення ліків [4].

Величезна кількість полімерів використовується для проектування та розробки МСДЛ, які класифікуються як катіонні, аніонні, неіонні, тіоловані

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.21 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Фещенко М.С.</i>			<i>ВСТУП</i>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Архівів</i>
<i>Перевір.</i>		<i>Карлаш Ю.В.</i>					7	109
<i>Реценз.</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						

полімери тощо. Серед хімічних груп, які мають мукоадгезію, найбільш поширеними є акрилатні полімери, похідні целюлози, хітозан, альгінати. Для розробки системи також застосовуються різні композитні матеріали, хімічно модифіковані полімери та комбінація двох або більше полімерів. Тож, наразі як мукоадгезивні речовини використовують синтетичні та напівсинтетичні сполуки [4].

Наразі, дослідження бактеріальної целюлози все більше привертають до себе увагу. Дані природні полімери ще не використовуються в якості мукоадгезивного агента для доставки ліків, але має на те велику перспективу. Аналіз літератури щодо синтезу бактеріальної целюлози як одну з переваг цієї речовини вказує, що її біосинтез можна здійснювати на різних відходах, які містять велику кількість глюкози. З них ідеальною сировиною для виробництва бактеріальної целюлози є тони відходів агропромисловості, харчової, пивоварної та цукрової промисловості, лігноцелюлозних біопереробних заводів, текстильних та целюлозних комбінатів [5,6].

Бактеріальна целюлоза має великий потенціал як біоматеріал для стоматологічного та орального застосування. В основному, бактеріальну целюлозу пропонують використовувати для регенерації тканин пульпи зуба, регенерації періодонту та перев'язування хірургічних ран слизової оболонки порожнини рота. Крім того, бактеріальна целюлоза була досліджена при лікуванні кореневих каналів зубів для видалення всіх залишків і висушування каналу. Наразі, бактеріальну целюлозу досліджують як біоматеріал для регенерації альвеолярної кістки. Пропонуються композитні матеріали, створені за мотивами біологічної тканини на основі бактеріальної целюлози [7].

На ринку України зараз представлено велику кількість препаратів, які мають мукоадгезивні властивості. По більшій частині до них відносяться очні препарати, защічні таблетки, а також нещодавно почали з'являтися мукоадгезивні гелі. Проте, відсутні препарати з мукоадгезивною дією для стоматології вітчизняного виробництва [8,9].

Важливою складовою загального здоров'я населення є здоров'я порожнини рота, незадовільний стан якого підтверджений глобальними світовими дослідженнями. Так, за даними за 2010-2019 роки поширеність усіх хвороб цієї локалізації зросла з 43 667 до 45 035 на 100 тис. населення світу. Зокрема, хвороб пародонту - з 12 036 до 14 053 на 100 тис. населення, раку губи та ротової порожнини - з 1542 до 1812 випадків на 100 тис. населення. Високими залишалися рівні ураженості населення карієсом – 26 338 на 100 тис. населення у 2010 році, 26 245 - у 2019 році [10].

Серед усіх захворювань пародонту 90-95% припадає на запальні, такі як гінгівіт і пародонтит. Гінгівіт - це запальний процес в тканинах ясенного краю, при якому уражаються тільки поверхневі тканини ясен. Пародонтит - це запальний процес, в який втягуються всі структури пародонту. Він характеризується руйнуванням зубодесневого з'єднання і прогресуючою деструкцією альвеолярних відростків щелепних кісток. Збудниками гінгівіту можуть стати і бактерії, які є компонентами природної мікрофлори ротової порожнини людини — *Veillonella parvula*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*. Збудниками пародонтиту, який є логічним продовженням гінгівіту, є *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *P. intermedia* та *Treponema denticola* [11,12].

Отже, враховуючи тенденцію поширення захворювань пародонту, є нагальна потреба у якісних лікарських засобах щодо лікування таких проявів. Як було зазначено вище, в Україні наразі мукоадгезивними властивостями володіють по більшій частині препарати для лікування очей. При цьому, відсутній вітчизняний препарат, який можна було б використовувати для стоматології. Сучасна стоматологія – це не дешева задоволення, по більшій частині обумовлена тим, що всі компоненти нормального лікування зубів та ротової порожнини є закордонними. При наявності українських аналогів, ціна на такі препарати була б нижчою за рахунок відсутності мита на данні засоби, а також менші затрати на доставку [13].

Тому, актуальністю теми є розробка лікарського препарату на основі бактеріальної целюлози, яку можна одержати на відходах різних промислових виробництв з метою лікування та профілактики різних захворювань парадонту.

Новизною теми є використання *Acetobacter senegalensis* MA1, яка для синтезу бактеріальної целюлози використовує відходи виробництва біодизелю – гліцерин та здатна синтезувати близько 17 г/л цього β -глюкану [14].

РОЗДІЛ 1

БІОТЕХНОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ ОДЕРЖАННЯ МУКОАДГЕЗИВНИХ β -ГЛЮКАНІВ

Адгезія включає утворення привабливих зв'язків між двома субстратами, які протистоять роз'єднанню. Біоадгезія — це специфічний випадок адгезії, коли принаймні один із двох субстратів включає біологічну тканину. Крім того, якщо адгезивна поверхня субстрату є поверхнею слизової оболонки, наприклад, слизової оболонки носу чи ротової порожнини, біоадгезія конкретно називається мукоадгезією [1].

Використання мукоадгезивних матеріалів для посиленої доставки терапевтичних засобів викликає інтерес протягом кількох років завдяки кільком важливим перевагам, що стосуються ефективності дозованих форм *in vitro* та *in vivo*. Мукоадгезивні композиції здатні забезпечувати локалізоване вивільнення ліків у бажаних областях, таких як носова порожнина, очі, рот, шлунок, кишечник і піхва, для підвищення їхньої клінічної ефективності. Використання мукоадгезивних матеріалів у композиціях може змінити проникність тканини слизової оболонки або мембран і, отже, сприяти адсорбції макромолекул, наприклад, пептидів. Крім того, взаємодія між мукоадгезивними композиціями та поверхнею слизової дає можливість подовжити час перебування лікарської форми в місці нанесення, тим самим зменшуючи частоту дозування та підвищуючи дотримання пацієнтом режиму [1].

Багато полісахаридів дійсно мають мукоадгезивні властивості, і їх використання для специфічної пероральної доставки ліків було виявлено багатьма дослідниками [15]. β -глюкани - це полісахариди, які є природними компонентами клітин грибів. Усі речовини цієї групи, які відомі на даний момент, володіють мукоадгезивними властивостями, що робить їх цікавою групою для подальших наукових досліджень [16]. Ці полісахариди можуть

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.21 КР ПЗ</i>		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.	Фещенко М.С.				РОЗДІЛ 1 БІОТЕХНОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ ОДЕРЖАННЯ МУКОАДГЕЗИВНИХ β - ГЛЮКАНІВ		
Перевір.	Карлаш Ю.В.						
Реценз.							
Н. Контр.							
Затверд.	Стабніков В.П.						
					Літ.	Арк.	Аркушів
						11	109
					<i>Кафедра БТМ</i>		

діяти як імуностимулятори, посилюючи функцію природних клітин-кілерів. β -глюкани також часто пов'язують з хітином, чиє похідне, хітозан, має імуномодулюючі властивості, що сприяє його використанню в дослідженнях, зосереджених на вакцинах, що вводяться через слизову оболонку [17,18].

1.1. Продуценти β -глюканів

β -Глюкани являють собою великий клас складних полісахаридів з біоактивними властивостями, включаючи імунну модуляцію. Природними джерелами цих сполук є дріжджі, овес, ячмінь, гриби та водорості. Дріжджі використовуються в багатьох процесах, включаючи бродіння, і їх часто викидають як відходи. Виробництво біомолекул з ресурсів відходів є тенденцією, що зростає в усьому світі, і постійно виявляються нові ресурси відходів. β - Глюкани, отримані з дріжджів, можуть сприяти захисту хазяїна від інфекцій, впливаючи на запальну та антибактеріальну активність нейтрофілів і макрофагів. β -Глюкани довгий час вважалися основним протираковим засобом терапії та були ліцензовані в Японії як імунна ад'ювантна терапія раку в 1980 році, і постійно з'являються нові механізми дії цих молекул [19].

β -Глюкан з дріжджів містить β -1,3 і β -1,6 глікозидний зв'язок і має високу біологічну активність, ніж глюкани рослинного походження. Вони комерційно виробляються з пекарських дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*. Зазвичай, β -глюкани з дріжджів представлені або целюлозою або карбоксиметил (КМ) глюканом - це модифікований дріжджовий глюкан з покращеною розчинністю у воді [20].

В дослідженні за 2016 рік *S. cerevisiae* культивували в YPG бульйонному середовищі для отримання бета-глюкану. Клітини збирали на стаціонарній фазі, промивали та руйнували за допомогою методу обробки ультразвуком. Отримані клітинні стінки використовували для приготування лужнорозчинного β -глюкану (глюкан-S1). У зв'язку з цим у лужно-кислотній екстракції використовували 2% гідроксид натрію (NaOH) і 3% оцтову кислоту відповідно. Результати показали, що сирий бета-глюкан, отриманий з культур *S. cerevisiae*, становив 6,89 г/л [21].

Штам *S. cerevisiae* KU200281 було виділено з огірка. Штам був високорезистентними до штучного шлункового та жовчного соку, а ще *S. cerevisiae* KU200281 показав високу мукоадгезійну здатність. Дріжджі показали здатність ДНК до захисту від активних форм кисню. Вміст β -глюкану, в *S. cerevisiae* KU200281 становив $9,43 \pm 1,55\%$ від абсолютно сухої біомаси дріжджів. Штам мав хороші антимікробні властивості та проявляв властивості пробіотику [22].

Хітин-глюкановий комплекс є цінним біоматеріалом, який можна витягти з клітинної стінки кількох дріжджів і грибів. *Komagataella (Pichia) pastoris* вирощували на гліцерині як єдиному джерелі вуглецю з періодичним культивуванням, щоб оцінити вплив рН (3,5–6,5) і температури (20–40°C). Вміст комплексу у біомасі не зазнав суттєвого впливу в межах перевірених діапазонів рН і температури. Тим не менш, концентрація 4,89 г/л за день досягала при температурі в межах 27–34°C і рН вище 6,0 або нижче 4,0 [23].

Бактеріальні глюкани викликають зростаючий інтерес у комерційному застосуванні в харчовому та фармацевтичному секторах. Протягом останніх десятиліть було зареєстровано ряд бактеріальних глюканів. До бактеріальних глюканів належать лінійний β -(1,3)-глюкан (курдлан) і лінійний β -(1,4)-глюкан (целюлоза), водорозчинний β -(1,3)-глюкан (салекан), β -(1,3)(1,6)-глюкани та лінійний змішаний зв'язок (1,3)(1,4)- β -глюкан (ML β -(1,3)(1,4)-глюкан) [24].

Курдлан в основному виробляється видами *Agrobacterium*, тоді як решта β -1,3 d-глюкану виробляється видами *Bradyrhizobium*. Курдлан демонструє унікальну поведінку гелеутворення та в'язкопружні властивості на основі концентрації та температури схоплювання [20].

Курдлан є екзополісахаридом, який має властивості адгезії через своє гелеутворення. Це вторинний метаболіт, синтезований *Alcaligenes faecalis* var. *muxogenes* і *Agrobacterium radiobacter* в умовах обмеження азоту з використанням глюкози або сахарози як джерела вуглецю. Штам *Agrobacterium* NX1126 був виділений із зразка ґрунту біля каналу в Усі. Для синтезу курдлану використовували α -лактозу як єдине джерело вуглецю для виробництва курдлану,

який отримав назву PLHX. Найбільше виробництво PLHX (21,4 г/л) було отримано при виснаженні азоту. PLHX складається в основному з глюкози з меншою кількістю галактози та аміногалактози [25].

Agrobacterium sp. CGMCC продемонстрував високу синтезувальну здатність щодо курдлану. З нього було створено мутантні штами, проте вони мали гіршу продукційну дію зазначеного полісахариду. Тривалість культивування для всіх штамів становила 96 годин. Відзначається, що для синтезу курдлану велику роль відіграє джерело вуглецю та азоту [26].

Agrobacterium sp. ZX09, відомі як бактерії, що синтезують салекан. З даного біологічного агенту намагались вивести надсинтезуючі мутанти на основі генної модифікації шляхом використання рекомбінантних штамів. Проте, створюючи експресію генів синтезу сукцинілтрансферази та пірувілтрансферази одержані мікроорганізми показували гірші результати синтезу салекану. З *Agrobacterium* sp. ZX09 вдається одержати близько 15 г/л глюкану. При цьому, потрібно відзначити, що за спектрофотометричним визначенням оптичної густини біомаси (OD_{600}), концентрація маси *Agrobacterium* sp. ZX09 була найнижчою, в порівнянні з отриманими рекомбінантами, що може свідчити, що кількість біомаси не відіграє такої важливої ролі, як це здається на перший погляд [27]. Повідомляється, що синтезувати салекан також можуть бактерії *Ensifer* sp. M14 [28].

Сукциноглюкан це теж екзополісахарид типу β -глюканів, який синтезується в загальному бактеріями. *Sinorhizobium meliloti* здатен синтезувати цю сполуку в різному спектрі рН, при цьому змінюються його молекулярна маса. При вирощуванні *S. meliloti* при рН 5,75 синтез сукциноглікану збільшувався, тоді як синтез галактоглюкану знижувався. Сукциноглікан, який було виділено з культур, вирощених при низькому рН, мав нижчий ступінь полімеризації (низькомолекулярна сполука) порівняно з тим, який був виділений з культур, вирощених при нейтральному рН. Молекулярна маса відповідає за чутливість даних бактерій, а отже – й на їх можливість існування. Хоча зміни рН не впливають на виробництво глікогену або циклічного $\beta(1-2)$ глюкану, було

виявлено, що нездатність виробляти циклічний $\beta(1-2)$ глюкан сприяла толерантності до рН за відсутності сукциноглікану [29].

Ізольовані бактерії з зразка сиру *R. radiobacter* CAS також можуть синтезувати сукциноглюкан. Цей полісахарид складається з глюкози та галактози в молярному співвідношенні 6,99:1. Цей глюкан має вплив у харчовій, косметичній та фармацевтичній промисловості як загусник, гелеутворювач, стабілізатор та емульгатор. Екстрагований екзополісахарид демонстрував псевдопластичну поведінку. Він демонструє типову природу розрідження при зсуві та може протистояти кільком термічним циклам, температурі, діапазону рН і електролітам, таким як одновалентні NaCl і KCl, і двовалентні катіони MgCl₂ і CaCl₂ у широкому діапазоні концентрацій [30].

Бактерії *Agrobacterium* sp. ZCC3656 характеризуються своєю можливістю до синтезу сукциногліканоподібного полісахариду. Штам культивували у середовищі M9, доповнених сахарозою як єдиним джерелом вуглецю. *Agrobacterium* sp. ZCC3656 показав найвищий вихід полісахариду - 21,1 г/л. Ріклін, таку назву одержав сукциногліканоподібний полісахарид, складається з глюкози, галактози, сукцинату та пірувату у співвідношенні 7,8:1,0:0,9:1,1 [31].

Бактеріальна целюлоза (БЦ) — гелеподібна речовина, синтезована грамнегативними бактеріями в рідкій цукровій матриці. Він має таку саму молекулярну формулу, як і рослинна целюлоза, але унікальні та складні тривимірні пористі сітчасті структури. Штам, що синтезує бактеріальну целюлозу (BC) (*Glucanacetobacter xylinus* ZНСJ618), був виділений з чайного гриба. Він характеризується високою стійкістю продукційній здатності $7,56 \pm 0,57$ г/л за статичних умов культивування та $8,31 \pm 0,79$ г/л при струшуванні. Бактеріальні целюлози в основному продукується шляхом культивування мікробів, таких як: *Acetobacter*, *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Sarine*, *Pseudomonas*, *Aerobacter*, *Achromobacter*, *Alcaligenes* і *Azotobacter* [32].

Включення добавок у культуральне середовище під час біосинтезу бактеріальної целюлози є традиційним методом виробництва нанокompatитів на основі целюлози. При спільному культивуванні *G. hansenii* з *Escherichia coli* у

статичних умовах для отримання плівок ВС з покращеними механічними властивостями. Збагачені манозою екзополісахариди, синтезовані *E. coli*, були включені в мережу бактеріальної целюлози і впливали на агрегацію спільно кристалізованих мікрофібрил без істотної зміни розмірів кристалів целюлози. Під час спільного культивування *G. hansenii* ATCC 23769 з *E. coli* ATCC 700728, синтезувалося близько $3,3 \pm 0,7$ мг/л екзополісахариду та 1,6 г/л бактеріальної целюлози у вигляді нанокомпозиту [33].

Відомі випадки використання експресійних систем для синтезу бактеріальних целюлоз. Експресія кластера біосинтетичних генів коланової кислоти, був індукований у *Enterobacter* sp. FY-07, який виробляє велику кількість гідрогелю бактеріальної целюлози в умовах аеробної та анаеробної ферментації. Було отримано модифіковані гідрогелі бактеріальної целюлози з різною кристалічністю, реологічними властивостями та водоутримувальністю шляхом культивування сконструйованого штаму *Enterobacter* sp. FY-07:tas за різних індукційних умов. Водоутримувальна здатність модифікованого гідрогелю бактеріальної целюлози була збільшена більше ніж у 1,7 рази порівняно з гідрогелем, що виробляється *Enterobacter* sp. FY-07, а також мережі модифікованого гідрогелю бактеріальної целюлози був ущільненим, але все ще прозорим. Ці результати свідчать про те, дана стратегія наділяє гідрогелі бактеріальної целюлози покращеними властивостями [34].

В табл.1.1. показано продуцентів різних β -глюканів, які синтезують ці речовини біотехнологічним шляхом.

Таблиця 1.1.

Продуценти β -глюканів

Біологічний агент	Середовище біосинтезу, г/л	Умови синтезу	Концентрація β -глюкану, г/л	Джерело
<i>S. cerevisiae</i> (без штаму)	Дріжджовий екстракт – 10, Пептон – 20, Глюкоза - 20	30 °С, 120 год, 150 об/хв	6,89	[21]
<i>S. cerevisiae</i> KU200281	Солодовий екстракт – 3, Дріжджовий екстракт – 3, Пептон – 5, Глюкоза - 10	25 °С, 48 год	1,89	[22]

<i>P. pastoris</i>	NaCl – 3,62, K ₂ HPO ₄ – 0,26, (NH ₄)Cl – 0,08, NaNO ₃ – 0,85, Na ₂ SO ₄ – 0,05, Лактат натрію – 1,12, Дріжджовий екстракт – 0,2, NaHCO ₃ (8%) – 52,5, Гліцерин - 40	30 °С, 72 год, 200 об/хв, рН 3,5	14,67	[23]
<i>Agrobacterium</i> HX1126	α-Лактоза - 50, Дріжджовий екстракт – 1,5, Пептон – 0,2, Яловичий екстракт – 0,1, (NH ₄) ₂ HPO ₄ - 1, Кукурудзяний екстракт - 10, MgSO ₄ ·7H ₂ O – 0,5, FeSO ₄ ·7H ₂ O – 0,2, MnSO ₄ ·H ₂ O – 0,02, ZnSO ₄ - 0,01	30 °С, 96 год, 180 об/хв, рН 6,4	21,4	[25]
<i>Agrobacterium</i> sp. CGMCC	Сахароза – 90, (NH ₄) ₂ HPO ₄ - 2, KH ₂ PO ₄ - 2, MgSO ₄ · 7H ₂ O - 1, Кукурудзяний екстракт - 4, СаСО ₃ - 2	30 °С, 96 год, 250 об/хв, рН 7	40	[26]
<i>Agrobacterium</i> sp. ZX09	Пептон – 17,5 Яловичий екстракт – 2, Крохмаль – 1,5, Дріжджовий екстракт – 5, Гематин – 0,015, Нікотинамід аденін динуклеотид – 0,015	28 °С, 26 год, рН 7,3±0,1	15	[27]
<i>S. meliloti</i> Rm1021	NH ₄ NO ₃ - 2,0, MgSO ₄ ·7H ₂ O - 0,2, K ₂ HPO ₄ - 2,0, Na ₂ HPO ₄ - 3,0, CaCl ₂ ·6H ₂ O - 0,01, MnSO ₄ ·2H ₂ O – 10, FeSO ₄ ·7H ₂ O – 0,01, NaCl – 30, Манітол – 2,73	30 °С, 72 год, рН 5,75	4,2	[29]
<i>R. radiobacter</i> CAS	MgSO ₄ - 0,2, CaCl ₂ – 0,02, KH ₂ PO ₄ - 1, K ₂ HPO ₄ – 1, NH ₄ NO ₃ - 1, FeCl ₃ – 0,05 Глюкоза - 10	30 °С, 120 год, рН 7	2,302	[30]

<i>Enterobacter</i> sp. FY-07::tac	Глюкоза - 25, KNO ₃ - 1, Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O - 10, MnCl ₂ - 0,2, MgSO ₄ ·7H ₂ O - 0,25, Na ₂ SO ₄ - 0,32	30 °C, 48 год, pH 7,2, 200 об/хв	-	[34]
<i>G. hansenii</i> ATCC 23769 з <i>E. coli</i> ATCC 700728	Глюкоза - 20, Пептон - 5, Дріжджовий екстракт - 5, Na ₂ HPO ₄ - 2,7, Лимонна кислота - 1,15	30 °C, 120 год, pH 5, статичні умови	1,6	[33]
<i>Agrobacterium</i> sp. ZCC3656	Сахароза - 20, NH ₄ Cl - 1, MgSO ₄ ·7H ₂ O - 4, (NH ₄) ₂ SO ₄ - 3,5, K ₂ HPO ₄ - 30, KH ₂ PO ₄ - 15, Лимонна кислота - 2, NaCl - 0,5, Розчин мікроелементів - 1,5 (г/л): FeSO ₄ ·7H ₂ O - 2,8, MnCl ₂ ·4H ₂ O - 0,2, CoSO ₄ ·7H ₂ O - 2,8, CaCl ₂ ·2H ₂ O - 1,5, CuCl ₂ ·2H ₂ O - 0,2, ZnSO ₄ ·7H ₂ O - 0,3	30 °C, 48 год, pH 7	22,1	[31]
<i>G. xylinus</i> ZHCJ618	Сахароза - 5, Яловичий екстракт - 1,5, Na ₂ HPO ₄ - 0,44, Лимонна кислота - 0,08, Етанол - 1	30 °C, 240 год, pH 6, 150 об/хв	8,31 ± 0,79	[32]

Примітка: «-» - ця позначка означає, що визначення показнику не відбувалось

1.2. Оптимізація поживного середовища та умов культивування для одержання β-глюканів

Ферментація є дуже універсальною технологічною технологією для виробництва продуктів з доданою вартістю, таких як мікробні біополімери, і оскільки параметри ферментації мають значний вплив на життєздатність та економічність біопроцесу, їх оптимізація має велике значення для розвитку процесу. Зокрема, на виробництво мікробного полісахариду значною мірою

впливають умови культивування, такі як рН, температура, концентрація кисню та перемішування, а також склад культурального середовища. Крім того, крім умов біосинтезу, хімічна структура, мономерний склад, фізико-хімічні та реологічні властивості кінцевого продукту також змінюються залежно від типу штаму. Це, у свою чергу, дозволяє промислово виробляти полісахариди з бажаними специфікаціями шляхом контролю умов ферментації, вибору прийнятної сировини та використання штамів-виробників високого рівня [35].

На вміст β -глюкану впливає ріст *S. cerevisiae* під час бродіння, а на ріст будь якого мікроорганізму впливає вміст поживного середовища. Було визначено вплив різних типів і концентрацій джерел вуглецю на ріст дріжджів, ріст грибів і вміст β -глюкану в *Rhizopus oligosporus* і *S. cerevisiae*. Першим фактором оптимізації середовища були типи джерел вуглецю, тапіока та пшеничне борошно, а другим фактором були концентрації джерела вуглецю: 0,0%, 2,5%, 5,0%, 7,5% і 10,0%. Результати показали, що додавання різних типів і концентрацій джерела вуглецю суттєво вплинуло на збільшення кількості дріжджів, кількості грибів, вмісту β -глюкану та рН. Ріст дріжджів, грибів і вміст β -глюкану збільшився разом із збільшенням концентрації джерела вуглецю. Кількість дріжджів, грибків і β -глюканів, доданому з тапіокою, була вищою порівняно з пшеничним борошном. Додавання 10% тапіоки дало найбільшу кількість дріжджів з 9,505 Log КУО/г і найвищий вміст β -глюкану з 0,707% на абсолютно суху біомасу [36].

Дріжджі *P. pastoris* культивували при різних рівнях розчиненого кисню (5, 15, 30 і 50% від насичення повітрям) для оцінки їх впливу на виробництво полісахаридного комплексу клітинної стінки хітин-глюкан. Зниження рівня DO з 50 до 15% не мало істотного впливу на ріст клітин, але перетворення субстрату в біомасу було покращено. За таких умов вміст комплексу у біомасі було покращено з 15 до 18 мас.%. Загальна концентрація комплексу хітин-глюкан становила 8,67 г/л на день [37].

Молочнокислі бактерії (LAB) також мають можливість синтезу утворення β -глюканів. *Pediococcus parvulus* було виділено із зразків їжі в Єгипті.

Оптимізацію росту ізоляту досліджували при різних температурах, рН і середовищах. Результати: Дослідження показало, що оптимальна температура становила 37°C, рН – 6, а найбільш селективним середовищем для росту було селективне середовище *Pediococcus* (PSM). Кінцева концентрація бета-глюкану становило 0,463 мг/л. Екстрагований β-глюкан з єгипетського *P. parvulus* мав різний терапевтичний ефект *in vitro*, включаючи антиоксидантні властивості, протимікробну дію, контроль раку та ефект зниження рівня холестерину [38].

Курдлан - це полісахарид, який складається з β-1,3-зв'язаних залишків глюкози. Виділена із зразків ґрунту бактерія-продуцент полісахариду була ідентифікована як *Pseudomonas* sp. QL212. Оптимальні умови культивування включали вік посівної культури 12 годин, температуру інкубації 30 °С, 10% інокулята та загальний об'єм рідини 75 мл у 250-мл колбі. Максимальний вихід курдлану близько 5,92 г/л був досягнутий з оптимальним середовищем, що складається з 30,11 г/л сахарози, 5,94 г/л дріжджового екстракту та початковим рН 8,03 [39].

Для підвищення синтезу курдлан, виробленого *Paenibacillus* sp. NBR-10, було оптимізовано різні умови культивування та композиції середовища. Виявлено, що максимальний вихід був отриманий при 35 °С, початковий рН 7 після 48 годин інкубації. Відзначається, що сахароза та дріжджовий екстракт були найкращими джерелами вуглецю та азоту відповідно. Загалом оптимізація різних параметрів призвела до синтезу 4,82 г/л курдлану. Одержаний курдлан володів мукоадгезивними властивостями [40].

Було визначено вплив джерела азоту на виробництво курдлану *Alcaligenes faecalis* ATCC 31749. Синтез курдлану та накопичення біомаси були більшими з сечовиною порівняно з іншими джерелами азоту. Найвище виробництво курдлану та накопичення біомаси *A. faecalis* ATCC 31749 становило 28,16 г/л і 9,58 г/л відповідно з сечовиною, тоді як з NH₄Cl було 15,17 г/л і 6,25 г/л відповідно . На оптимальний час бродіння для виробництва курдлан також впливало джерело азоту в середовищі [41].

Створено мутант на основі *Agrobacterium* sp. ATCC 31749 на основі індукції ультрафіолетом CGMCC 11546. Максимальний вихід курдлану $47,97 \pm 0,57$ г/л було отримано з мутанту при використанні оптимального середовища, температури при $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, швидкості перемішування - 280 об/хв, а також тривалості процесу - 96 годин. Одержаний гель проявляв мукоадгезивні властивості [42].

Bacillus cereus PR3 – це високпродуктивний ізолят курдлану, виділений з ризосфера бобових рослин. Статистичний аналіз показав, що крохмаль, NH_4NO_3 , K_2HPO_4 , Na_2SO_4 , KH_2PO_4 і CaCl_2 були значними складовими середовища. При оптимізованих концентраціях цих компонентів вдалося досягти 20,88 г/л курдлану [43]. *Paenibacillus polymyxa* ATCC 21830 також здатен до синтезу курдлану. При оптимізації умов синтезу, а також самого поживного середовища, було визначено, що важливими параметрами були температура ($50\text{ }^{\circ}\text{C}$), рН (7), час культивування (96 год), концентрація глюкози (100 г/л) та дріжджового екстракту (3 г/л) і швидкість перемішування (150 об/хв). Кінцева концентрація курдлану становила 6,89 г/л за оптимальних умов середовища [44].

Досліджували вплив шести цукрів, включаючи глюкозу, фруктозу, лактозу, мальтозу, сахарозу та ксилозу, як джерела вуглецю, на виробництво та властивості курдлану з використанням *Agrobacterium* sp. DH-2. Максимальна продукція (38,1 г/л і 37,4 г/л відповідно) і вихід (0,58 г курдлан/г сахарози і 0,53 г курдлан/г мальтози відповідно) курдлану були досягнуті сахарозою і мальтозою [45].

Сукциноглікани — гетерополісахариди, синтезовані бактеріями. Клітини *A. radiobacter* NBRC 12665 іммобілізували в матриці мочалової губки та використовували для отримання сукциноглікану. Оптимізацію синтезу β -глюкану виконували з використанням субстратів меляси цукрової тростини, сахарози, глюкози та лактози в концентраціях 2,5%, 5,0% та 7,5% протягом восьми днів. Найкращі результати були отримані при використанні патоки цукрової тростини (14,0 г/л) і лактози (12 г/л) у концентрації 7,5% з іммобілізованими клітинами. За оптимальних умов можна було повторно використовувати матрицю для

виробництва сукциноглікану протягом п'яти послідовних восьмиденних робочих циклів [46].

При оптимізації синтезу сукциноглюкану в *A. radiobacter* РТСС 1654 було визначено, що меляса є кращим субстратом для синтезу цього екзополісахариду, ніж сахароза. Найвища концентрація сукциноглюкану спостерігається на 103 годині культивування при швидкості перемішування 296,65 об/хв і становить 22,7 г/л. Збільшення сукциноглікану виробництва з використанням меляси як субстрату, ймовірно, пояснюється високою доступністю амінокислот і особливо глутамату в патоці. Крім того, патока цукрових буряків містить значну кількість органічних кислот, що може посилити виробництво сукциногліканової камеді. Крім того, бурякова патока містить значно більше азотистих сполук і, як очікується, задовольнить потреби організму в азоті більшою мірою, який також містить менше біотину [47].

З рисового лушпиння було зроблено гідролізат. Потім, для *R. radiobacter* АТСС4720 було виконано оптимізацію умов та середовища для культивування. Основним джерелом карбону виступав гідролізат рисового лушпиння, а азоту – дріжджовий екстракт. Швидкість мішалки має становити 100 об/хв, температура – 30 °С, а рівень рН=7,0 для оптимального синтезу екзополісахариду. При такому поєднанні, концентрація укзополісахариду становила 69,9 г/л [48].

Штам бактерій, що продукують целюлозу, був виділений із сокового гриба цитрусових. Виділений штам був ідентифікований як *Gluconacetobacter* sp. gel_SEA623-2. Умови культивування для виробництва бактеріальної целюлози за допомогою SEA623-2 перевіряли для подальшої оптимізації. Умови культивування були покращені шляхом зміни типу фруктового соку, рН, концентрації цукру та температури для максимального виробництва целюлози. SEA623-2 має високу продуктивність у середовищі обробки цитрусових, але не в інших фруктах. Оптимальна комбінація компонентів середовищ для виробництва бактеріальної целюлози така: 10% цитрусового соку, 10% сахарози, 1% оцтової кислоти та 1% етанолу при 30 °С, рН 3,5. Бактеріальна целюлоза, вироблена

SEA623-2, має м'які фізичні властивості, високу міцність на розрив і високу здатність утримувати воду [49].

Komagataeibacter sp. CGMCC 17276 було виділено з гниючого зеленого зизифуса. Оптимізацію процесу вели за складом та кількісним вмістом поживного середовища. Гліцерин виявився непоганим джерелом карбону для синтезу бактеріальної целюлози. Як джерела азоту виступали дріжджовий та кукурудзяний екстракт. Також, в середовищі були присутні й інші компоненти, такі як K_2HPO_4 , оцтова кислота, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, та етанол. За 4 дні при 30 °C біосинтезу вдається отримати 5,63 г/л бактеріальної целюлози [50].

Було оптимізовано культуральне середовище для виробництва целюлози з *Leifsonia soli*. П'ять важливих факторів, таких як мальтоза, рН, дні інкубації, соєва сироватка та хлорид кальцію, були оцінені за допомогою методології поверхні відповіді на основі ANOVA. Максимальне виробництво целюлози (5,97 г/л) було отримано, коли мальтоза 1 % (мас./об.) була доповнена 0,8 % (об./об.) соєвою сироваткою та 0,8 % (мас./об.) хлоридом кальцію при рН 6,5 протягом 7 днів інкубації [51].

Ще в одному дослідженні було оптимізовано виробництво бактеріальної целюлози *K. hansenii* ATCC 23769 у статичному культивуванні з використанням соку сизалю, залишків агропромислового виробництва, як субстрату. Було оцінено вплив початкової концентрації цукру, рН, добавки азоту та часу культивування. Найвище виробництво целюлози (3,38 г/л) було отримано через 10 днів культивування, використовуючи сік сизалю (рН 5) при 15 г/л цукру та 7,5 г/л екстракту дріжджів. Вихід целюлози у вибраних умовах культивування сизалю був у три рази вищим, ніж вихід у синтетичному середовищі, що вказує на те, що сік сизалю є придатним субстратом для виробництва бактеріальної целюлози [52].

Губка *Lufa aegyptiaca* використовували для іммобілізації клітин, щоб підвищити концентрацію продукції бактеріальної целюлози за допомогою *G. kombuchae*. Параметрами оптимізації перевіряли початковий рН, статичні умови/умови струшування, розмір інокулята, джерело азоту, співвідношення C/N, добавки (етанол і оцтова кислота). Максимальний синтез бактеріальної целюлози

був отриманий з використанням наступних умов: умови культивування - струшування; початковий рН – 5,5; джерело азоту – дріжджовий екстракт, С/Н – 40:1 і добавка – етанол (в концентрації 1,5%), кількість інокуляту – 5% [53].

Синтез бактеріальної целюлози з чистого та неочищеного гліцерину за допомогою *G. xylinus* КССМ 41431 було досягнуто в умовах статичної культури. Досліджено вплив неочищених інгібіторів, похідних від гліцерину (концентрація гліцерину, рН і концентрація солей). Значні інгібуючі ефекти при статичному культивуванні спостерігалися за таких умов: понад 40 г/л початкової концентрації гліцерину, рН 6 або 10 г/л концентрації солей. Покращення виробництва бактеріальної целюлози було досягнуто шляхом оптимізації складу культурального середовища. Найвища продуктивність бактеріальної целюлози з використанням чистого та неочищеного гліцерину становила 1,05 та 0,99 г/л/день відповідно [54].

Було розроблено функціональну та стабільну систему виробництва целюлози у генетично модифікованій *E. coli* шляхом рекомбінантної експресії як оперону синтази бактеріальної целюлози (*bcsABCD*), так і переднього оперона (*сtсах, сср Ах*). Виробництво бактеріальної целюлози було досягнуто в штаммах GM HMS174 (DE3) і в GM C41 (DE3) шляхом оптимізації температури культури (22 °С, 30 °С і 37 °С) і концентрації IPTG. Біосинтез. GM HMS174 (DE3) виробляв щільні волокна довжиною приблизно 1000–3000 мкм і діаметром 10–20 мкм, які були значно більшими, ніж волокна бактеріальної целюлози, які зазвичай виробляються *G. hansenii* [55].

Відомі дослідження синтезу бактеріальної целюлози з лігноцелюлози, шляхом культивування *G. xylinus* з використанням гідролізату міскантусу як середовища. Продуктивність целюлози була покращена за допомогою статистичної оптимізації основних параметрів культури, які були такими: температура, 29 °С; початковий рН 5,1; і концентрація альгінату натрію 0,09% (мас./об.). Фактичні значення синтезу в оптимальних умовах становили 14,88 г/л. Крім того, кількість бактеріальної целюлози з використанням гідролізатів

міскантусу було в 1,12 раза вище, ніж у контрольній групі (комерційна глюкоза) [56].

Було досліджено вплив температури інкубації на ріст *A. xylinum* 0416 і виробництво бактеріальної целюлози. Ферментацію *A. xylinum* 0416 проводили протягом 5 днів у статичному стані з використанням середовища Hestrin & Schramm (HS) з початковою концентрацією глюкози 4,0% і початковим рН 6,4. Температуру інкубації змінювали на рівні 5°C, 20°C, 25°C, 27°C, 28°C, 30°C, 35°C і 40°C відповідно. Результати показали, що 28°C була найкращою температурою інкубації для росту *A. xylinum* 0416 і виробляла найбільшу кількість бактеріальної целюлози із загальною висушеною вагою 0,3722 г/л. Тим часом при температурі інкубації 5°C і 40°C не було отримано значного росту *A. xylinum* 0416 і бактеріальної целюлози. Як висновок, температура інкубації відіграє важливу роль для даного біологічного агента з метою синтезу зазначеного β -глюкану [57].

Використовуючи фільтрат мулу Макгеоллі (MSF) і середовище Гестрін-Шрамма (HS) (г/л дистильованої води: глюкоза 10,0; пептон 5,0; дріжджовий екстракт 5,0; динатрій фосфат 2,7; лимонна кислота 1,15; рН 5,0), було складено два різні середовища, а саме модифіковане середовище HS (інгредієнти середовища HS, крім глюкози, розчиненої в MSF) та змішане модифіковане середовище HS (рівнооб'ємна суміш оригінального та модифікованого середовища HS). Продукування целюлози з *G. xylinus* вивчали з використанням двох вищезгаданих середовищ. Зберігаючи середовище HS як еталон, також вивчали вплив початкового рН, концентрації глюкози, етанолу та органічної кислоти на синтез целюлози. Підвищення початкового вмісту глюкози (до 25 г/л) покращує виробництво целюлози щодо її властивостей, але призводить до низького виходу самого продукту при наявності в середовищі вище 15 г/л глюкози. Додавання спирту (до 1% об./об.) або лимонної кислоти (до 20 мМ) збільшує продуктивність до чотирьох і двох разів відповідно. Як у модифікованому середовищі HS, так і в змішаному середовищі модифікованого HS, виробництво целюлози було в чотири-п'ять разів вище, ніж у вихідному середовищі HS. Навіть MSF сам по собі перевершив середовище HS [58].

В таблиці 1.2. показано зведені дані щодо оптимізації синтезу β -глюканів біотехнологічним шляхом.

Таблиця 1.2.

Оптимізація процесу біосинтезу β -глюканів

Біологічний агент	Параметр оптимізації	Оптимальне значення	Концентрація β -глюкану	Джерело
<i>S. cerevisiae</i>	Джерело вуглецю	Топіока	0,707% на абсолютно суху біомасу	[36]
	Кількість джерела вуглецю	10%		
<i>P. pastoris</i> DSM 70877	Рівень розчиненого кисню	15%	8,67 г/л	[37]
<i>P. parvulus</i>	Температура	37 °С	0,463 мг/л	[38]
	Рівень рН	рН=6		
<i>Paenibacillus</i> sp. NBR-10	Температура	35 °С	4,82 г/л	[40]
	Початковий рН	рН=7		
	Джерело вуглецю	Сахароза		
	Джерело азоту	Дріжджовий екстракт		
	Час культивування	48 год		
<i>Pseudomonas</i> sp. QL212	Вік посівної культури	12 год	5,92 г/л	[39]
	Температура	30 °С		
	Концентрація інокуляту	10%		
	Джерело вуглецю	Сахароза		
	Кількість джерела вуглецю	30,11 г/л		
	Джерело азоту	Дріжджовий екстракт		
	Кількість джерела азоту	5,94 г/л		
	Коефіцієнт заповнення	0,3		
<i>A. faecalis</i> ATCC 31749	Джерело азоту	Сечовина	28,16 г/л	[41]
	Час культивування	96 год		
<i>Agrobacterium</i> sp. CGMCC 11546	Оптимізоване поживне середовище	Сахароза – 60 г/л, Дріжджовий екстракт – 6 г/л, КН ₂ РO ₄ 2 - г/л, MgSO ₄ ·7H ₂ O - 0,4 г/л, CaCO ₃ 2 - г/л, FeSO ₄ ·7H ₂ O - 0,1 г/л, MnSO ₄ - 0,04 г/л, ZnCl ₂ - 0,02 г/л	47,97 ± 0,57 г/л	[42]
	Температура	30 °С		
	Час культивування	96 год		
	Швидкість перемішування	280 об/хв		

<i>B. cereus</i> PR3	Оптимізоване поживне середовище	Крохмаль – 100 г/л NH ₄ NO ₃ – 0,25 г/л K ₂ HPO ₄ – 1,5 г/л, Na ₂ SO ₄ – 4 г/л, KH ₂ PO ₄ – 2 г/л, CaCl ₂ - 1 г/л	20,88 г/л	[43]
<i>Agrobacterium</i> sp. DH-2	Джерело вуглецю	Сахароза	38,1 г/л	[45]
		Мальтоза	37,4 г/л	
<i>A. radiobacter</i> NBRC 12665	Джерело вуглецю	Патока цукрової тростини	14 г/л	[46]
		Лактоза	12 г/л	
	Кількість джерела вуглецю	7,5%	-	
<i>P. polymyxa</i> ATCC 21830	Джерело вуглецю	Глюкоза	6,89 г/л	[44]
	Кількість джерела вуглецю	100 г/л		
	Джерело азоту	Дріжджовий екстракт		
	Кількість джерела азоту	3 г/л		
	Температура	50 °С		
	Час культивування	96 год		
	Швидкість перемішування	150 об/хв		
	Початковий рН	рН=7		
<i>A. radiobacter</i> PTCC 1654	Джерело вуглецю	Меляса	22,7 г/л	[47]
	Кількість джерела вуглецю	8,5%		
	Швидкість перемішування	296,65 об/хв		
	Час культивування	103 год		
<i>R. radiobacter</i> ATCC4720	Оптимізоване поживне середовище	Рисовий гідролізат як основа, Дріжджовий екстракт – 9 г/л, KH ₂ PO ₄ – 0,5 г/л	69,9 г/л	[48]
	Температура	30 °С		
	Рівень рН	рН=7		
	Швидкість перемішування	100 об/хв		
<i>Komagataeibacter</i> sp. CGMCC 17276	Оптимізоване поживне середовище	Гліцерин – 40 г/л, Дріжджовий екстракт – 5 г/л, Кукурудзяний екстракт – 30 г/л, K ₂ HPO ₄ – 3 г/л, Оцтова кислота – 7 г/л, MgSO ₄ ·7H ₂ O – 10 г/л, Етанол – 3 г/л	5,63 г/л	[50]

<i>L. soli</i>	Оптимізоване поживне середовище	Мальтоза – 10 г/л, Соева сироватка – 8 г/л, CaCl ₂ – 8 г/л	5,97 г/л	[51]
	Рівень рН	рН=6,5		
	Час культивування	7 днів		
<i>K. hansenii</i> ATCC 23769	Оптимізоване поживне середовище	Сік сизалю, замість води, Глюкоза – 15 г/л, Дріжджовий екстракт – 7,5 г/л	3,38 г/л	[52]
	Рівень рН	рН=5		
	Час культивування	10 днів		
<i>G. kombuchae</i>	Джерело азоту	Дріжджовий екстракт	25 г/л	[53]
	Кількість джерела азоту	3 г/л		
	Початковий рН	рН=5,5		
	Кількість інокуляту	5%		
	Добавки	Етанол		
	Кількість добавки	15 г/л		
	Співвідношення С/Н	40:1		
<i>G. xylinus</i> KCCM 41431	Джерело вуглецю	Гліцерин	7,32 г/л	[54]
	Кількість джерела вуглецю	20 г/л		
	Джерело азоту	Дріжджовий екстракт та пептон		
	Кількість джерела азоту	9 та 9 г/л		
	Джерело фосфату	Na ₂ HPO ₄		
	Кількість фосфату	4 г/л		
	Початковий рН	рН=5,0		
	Добавки	Лимонна кислота		
	Кількість добавки	1,15 г/л		
Час культивування	7 днів			
<i>E. coli</i> GM HMS174 (DE3)	Температура культивування	22 °С	23,0 ± 0,02 мг/л	[55]
	Концентрація IPTG	0,025 mM		
<i>E. coli</i> GM C41 (DE3)	Температура культивування	30 °С	31,1 ± 0,03 мг/л	
	Концентрація IPTG	0,05 mM		
<i>G. xylinus</i> ATCC 53524	Температура культивування	29 °С	14,88 г/л	[56]
	Початковий рН	рН=5,1		
	Добавки	Альгінат натрію		
	Кількість добавки	0,9 г/л		
<i>A. xylinum</i> 0416	Температура	28 °С	0,3722 г/л	[57]

<i>G. xylinus</i> ATCC 10788	Джерело вуглецю	Фільтрат мулу Макгеоллі	1,69 г/л	[58]
	Кількість джерела вуглецю	30 г/л		
	Добавки	Етанол та лимонна кислота		
	Кількість добавки	10 г/л та 20 мМ		

1.3. Відходи різних виробництв, які застосовуються для одержання β-глюканів

Агропромислові відходи та лігноцелюлозна біомаса є багатими відновлюваними вуглецевими ресурсами в навколишньому середовищі. Дослідники виявляють зростаючий інтерес до використання відходів агрохарчової промисловості та лігноцелюлозної біомаси для виробництва речовин із доданою вартістю та біохімікатів. У цьому контексті відходи сільського господарства та харчової промисловості, а також лігноцелюлозна біомаса відомі як недорога сировина для виробництва глюканових полімерів [59].

Для синтезу β-глюкану за допомогою дріжджів, можна використовувати стічні води виробництва соку мальви. Результати показали, що у *S. cerevisiae* TISTR 5919 було виявлено значно вищий % виробництва β-глюкану (15,01 % мас./мас. відповідно), ніж у *S. cerevisiae* Angel® і *S. cerevisiae* TISTR 5020 (12,69±2,62% мас./мас. і 8,33±1,26% мас./мас. відповідно). Сок мальви змінював морфологічні ознаки *S. cerevisiae* TISTR 5919. Клітини мали аномальну форму та більш тонку клітинну стінку, ніж зазвичай. Також, середовище з соком мальви індукував процес брунькування клітин [60].

Для синтезу β-глюкану з *S. cerevisiae* використовували відходи маніюки (*Manihot utillissima*) і маранти (*Maranta arunadinacea*) як основа поживного середовища. Найвища концентрація β-глюкану була отримана при використанні 3,99 г пептону для відходів маніюки з виходом 1,20% і при використанні 4,75 г пептону для відходів маранти з виходом 1,23%. Концентрація β-глюкану становила 1,77 г/л із середовища відходів маніюки та 1,91 г/л з відходів маранти.

Для порівняння, мутантні клітини в середовищі YPG продукували 6,56 г/л гранули β-глюкану, тоді як клітини дикого типу в аналогічному середовищі виробляли 1,84 г/л [61].

Candida utilis АТТС 9950 для синтезу β-глюкану здатна споживати картопляний сік, який залишається як відход овочево-перероблювальної фабрики. Це багате середовище містило в собі $22,9 \pm 0,8$ г/л загального органічного карбону. Щодо азоту, його кількість становила $2,0 \pm 0,1$ г/л. Культивування тривало 72 години з постійним перемішуванням (200 об/хв) при 28 °С. Концентрація β-глюкану становила 16,15 г/л [62].

Насичений пентозою гідролізат, отриманий у результаті попередньої обробки розведеною кислотою пустих грон олійної пальми, успішно споживали дріжджі *Cyberlindnera jadinii* і *P. jadinii*. *P. jadinii* виробляв 5,87 г/л біомаси, після 120 годин бродіння, із споживанням ксилози 71%. *C. jadinii* виробляв 10,50 г/л біомаси після 96 годин бродіння з максимальним споживанням ксилози 85%. β-глюкани, макромолекули з високою доданою вартістю, були додатково екстраговані з дріжджової біомаси, досягаючи виходу 3,1 і 3,0% від *P. jadinii* і *C. jadinii* відповідно [63].

Дріжджі можна можна культивувати на стічних водах тофу. Результати показали, що виділеними нативними дріжджами з рідких відходів тофу були *P. norvegensis* з виходом β-глюкану 6,59% до ваги сухої біомаси. *P. norvegensis* і його β-глюкан показали зону інгібування проти *A. flavus* $11,33 \pm 4,93$ і $7,33 \pm 3,51$ мм відповідно [64].

Мутантний штам бактерій *Agrobacterium* sp. ЕСР-1 може синтезувати курдлан на гідролізаті лугової трави з додаванням фосфату амонію. Концентрація солі в 0,45 г/л підвищувала синтез курдлану. Концентрація глюкану на 144 годині культивування при цьому становила близько 18 г/л. Варто відмітити, що концентрація біомаси при цьому була далеко не найвищою та становила всього 3,8 г/л. Найвища концентрація біомаси відмічається на 144 годині в присутності фосфату амонію в кількості 0,16 та 0,66 г/л. Кількість біомаси становила близько 4,3 г/л для кожної концентрації солей [65].

Штам *R. radiobacter* S10 виділений з кефіру міг використовувати молочну сироватку для синтезу екзополісахариду глюканової природи. Біосинтез проходив протягом 96 годин при 30 °С з швидкістю перемішування 200 об/хв. На 72 годині культивування відмічається найвищий синтез полісахариду в 2,8 г/л екзополісахариду. Фракція екзополісахариду складалася з галактози та глюкози в молярному співвідношенні 1,00:4,92 [66].

Волокнисті шлами паперово-целюлозного виробництва можна використовувати для синтезу бактеріальної целюлози. *Gluconacetobacter xylinus* ATCC 23770 може асимілювати ці відходи як після сульфатних так і після сульфідних процесів переробки. При цьому, за 7 діб при 30 °С синтезується 11 та 10 г/л целюлози відповідно [67].

Витрати на виробництво бактеріальну целюлозу дуже високі через використання досить дорогих поживних середовищ. Залишки виробництва оливкової олії було перевірено для синтезу бактеріальних целюлоз за допомогою *G. sacchari*. Сухий оливковий залишок був підданий водній екстракції при 40 і 100 °С (DOR40 і DOR100) і гідролізу H₂SO₄ 1M (DOR100H) для отримання насичених цукром водних екстрактів, які будуть використовуватися для виробництва целюлози. Виробництво целюлоз, отримане без звикання до будь-якого типу поживних речовин, становило 0,81 г/л для DOR40 та 0,85 г/л для DOR100 після 96 годин інкубації, що відповідало відповідно 32 та 34% виробництва, досягнутого звичайним культуральним середовищем HS (близько 2,5 г/л) [68].

Мікродорості — це одноклітинні фотосинтезуючі мікроорганізми, які, як відомо, мають високий вміст білка, крохмалю та олії. В одному з сучасних досліджень описували застосування біомаси *Chlorella vulgaris* як джерело глюкози для виробництва целюлози. Кислотний гідролізат крохмалю водоростей можна використовувати для заміни глюкози в ферментаційному середовищі *K. hansenii* для виробництва целюлози. Звичайну глюкозу використовували як контроль. Вихід Концентрація бактеріальної целюлози в поживному середовищі становив $1,104 \pm 0,002$ г/л і $1,202 \pm 0,005$ г/л з глюкози на основі водоростей і

глюкози відповідно. Одержана целюлоза на глюкозі з біомаси мала мінімальні відмінності від тої, що була одержана на звичайній глюкозі [69].

Щоб покращити використання відходів пивних дріжджів (ВПД) для виробництва бактеріальної целюлози за допомогою *G. hansenii* CGMCC 3917, було розроблено двоетапну попередню обробку. Обробка була наступною: обробка 0,1 М NaOH, високошвидкісний гомогенізатор, обробка ультразвуком і мікрохвильова обробка з подальшим гідролізом (121 °С, 20 хв) в умовах слабкої кислоти (рН 2). ВПД, оброблений ультразвуком протягом 40 хвилин, мав найвищий вихід цукру (29,19%), потім обробка NaOH (28,98%), високошвидкісний гомогенізатор (13,33%) і мікрохвилі (13,01%). Оброблені гідролізати ВПД безпосередньо постачалися як єдине джерело поживних речовин для виробництва целюлоз. Концентрація цукру в 3% гідролізатів ВПД, оброблених ультразвуком, дала найвищий вихід цільового продукту (7,02 г/л), майже в 6 разів, ніж у необроблених ВПД (1,21 г/л) [70].

Відомі випадки порівняння використання чистих відходів та гідролізату цих відходів для одержання бактеріальної целюлози. *G. xylinum* CGMCC No.2955 краще засвоює гідролізат стічних вод виробництва цукатів, ніж чисто стічні води цього ж виробництва. Об'ємний вихід бактеріальної целюлози в гідролізату становив 2,25 г/л, що в 1,5 рази більше, ніж у стічних водах зацукрованого зизифуса [71].

Для виробництва бактеріальної целюлози можна використовувати скисли соки банану та манго, а також сирну сироватку. Виробництво бактеріальної целюлози за допомогою *K. medellinensis* NBRC 3288 в концентрації 4,81 г/л було отримано на середовищі з зіпсованим соком банану, що було найвищим. Виробництво на середовищі з соком манго становило 1,95 г/л, а на сирні сироватці - 2,37 г/л. Для порівняння, використовували середовище HS, а концентрація становила 2,75 г/л. Вища продукція целюлози на банановому соці може бути пов'язана з високою концентрацією глюкози (36,9 г/л), оскільки, як відомо, глюкоза є будівельним блоком структури целюлози [72].

Таблиця 1.3. демонструє можливість використання різних відходів промисловості для синтезу різноманітних β -глюканів біотехнологічним шляхом.

Таблиця 1.3

Використання промислових відходів для біосинтезу β -глюканів

Біологічний агент	Відходи	Концентрація β -глюкану г/л	Джерело
<i>S. cerevisiae</i>	Відходи маніоки – 20 г/л	1,77	[61]
	Відходи маранти – 20 г/л	1,91	
<i>C. utilis</i> ATTC 9950	Картопляний сік як середовище	16,15	[62]
<i>P. jadinii</i>	Гідролізат пустих грон олійної пальми як середовище	0,18	[63]
<i>C. jadinii</i>		0,32	
<i>P. norvegensis</i> NYI	Стічні води тофу як середовище	3,67	[64]
<i>Agrobacterium</i> sp. ECP-1	Гідролізат лугової трави як середовище з додаванням фосфату амонію	18	[65]
<i>A. radiobacter</i> PTCC 1654	Меляса – 85 г/л	22,7	[47]
<i>R. radiobacter</i> ATCC4720	Гідролізат рисового лушпиння як основа середовища з подальшою оптимізацією	69,9	[48]
<i>R. radiobacter</i> S10	Молочна сироватка – 100 г/л	2,8	[66]
<i>G. xylinus</i> ATCC 23770	Гідролізат сульфатного волокнистого шламу як основа середовища	11	[67]
	Гідролізат сульфідного волокнистого шламу як основа середовища	10	
<i>G. sacchari</i>	Екстракт сухого залишку оливкової олії при 40 °C як середовище	0,81	[68]
	Екстракт сухого залишку оливкової олії при 100 °C як середовище	0,85	
<i>K. hansenii</i>	Глюкоза з водоростей <i>C. vulgaris</i> – 10 г/л	1,104 \pm 0,002	[69]

<i>G. hansenii</i> CGMCC 3917	Оброблені відходи пивного виробництва	7,02	[70]
<i>G. xylinum</i> CGMCC No.2955	Гідролізат стічних вод виробництва цукатів із зизифуса	2,25	[71]
<i>K. hansenii</i> ATCC 23769	Сік сизалю як основа	3,38	[52]
<i>G. xylinus</i> KCCM 41431	Неочищений гліцерин – 20 г/л	6,95	[54]
<i>K. medellinensis</i> NBRC 3288	Зіпсований банановий сік	4,81	[72]
	Зіпсований сік манго	1,95	
	Сирна сироватка	2,75	
<i>G. xylinus</i> ATCC 53524	Гідролізат міскантусу як середовище	14,88	[56]
<i>G. xylinus</i> ATCC 10788	Фільтрат мулу Макгеоллі – 30 г/л	1,69	[58]

РОЗДІЛ 2

ВИКОРИСТАННЯ β -ГЛЮКАНІВ У ФАРМАЦЕВТИЦІ

2.1. Відомі препарати на основі β -глюканів

Бактеріальна целюлоза BC-Nanoskin® зарекомендувала себе як новий біоматеріал і може використовуватися в кількох областях медицини, особливо для медичних пристроїв, головним чином у стоматології та ортопедії. Nanoskin® — це новий препарат, призначений для лікування уражень, діабетичних виразок стопи та складних хронічних уражень. Nanoskin® відповідає гострому медичному попиту на лікування (і профілактику) складних хронічних травм. Призначення: як платформа доставки ліків [73].

Основними цілями Nanoskin® є [73]:

- Поліпшення якості життя пацієнта
- Прискорення загоєння хронічних травм
- Зменшити витрати на охорону здоров'я

Мембрана Nanoskin® працює, сприяючи [73]:

- Ізоляцію оголених нервових закінчень, що призводить до негайного полегшення болю.
- Прямий контакт мембрани з шаром ураження сприяє розвитку нової шкіри.
- Підтримку відкритої зони вологого ураження під час регенераційного процесу, що забезпечує ефективний обмін кисню/азоту в їх зоні, таким чином запобігаючи зараженню патогенами.

Препарат є біосумісним і не викликає алергії. При його використанні відсутні побічних реакцій та больові відчуття. При пораненнях відмічається ідеальна оклюзія ушкодженої ділянки. Плівка є непроникний для зовнішніх рідин і забруднень. Вона має природний антибактеріальний бар'єр і живлення уражень. Відмічається швидке зменшення площі уражень на 95% [73].

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.21 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>	<i>Фещенко М.С.</i>				РОЗДІЛ 2 ВИКОРИСТАННЯ β- ГЛЮКАНІВ У ФАРМАЦЕВТИЦІ	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Перевір.</i>	<i>Карлаш Ю.В.</i>						35	109
<i>Реценз.</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>	<i>Стабніков В.П.</i>							

На основі мікрокристалічної целюлози наразі зареєстровано 3 препарати: PROSOLV® EASYtab, PROSOLV® SMCC та Emcocel 90M. Prosolv Easytab — це нещодавно представлена універсальна допоміжна речовина для доставки ліків. Варто зазначити, що PROSOLV® EASYtab та Emcocel 90M складається з суміші мікрокристалічної целюлози, а PROSOLV® SMCC - з мікрокристалічної целюлози, покритої кремнієм. Проте, PROSOLV® SMCC забезпечує порівнянну компактність, розчинність і стабільність до розчинення діючі речовини, ніж його аналогічні фізичні суміші PROSOLV® SMCC [74].

BioFill® і Bioprocess® (BioFill Produtos Biotecnológicos – Курітіба, PR, Бразилія; використовується як тимчасова шкіра для лікування опіків і виразок) і Gengiflex (BioFill Produtos Biotecnológicos; застосовується при захворюваннях пародонту) є прикладами бразильських комерційних продуктів на основі бактеріальної целюлози системи загоєння ран, які були запущені. Аналогами цих препаратів є NEXFILL, DERMAFILL і CUTICELL EPIGRAFT (Seven Indústria de Produtos Biotecnológicos Ltda – Лондріна, PR, Бразилія), Biocel (DMC Importação e Exportação de Equipamentos LTDA – São Carlos, SP, Бразилія), Bionext® (Bionext® Produtos Biotecnológicos Ltda – Сан-Паулу, Бразилія) і Membracel® (Vuelo Pharma – Курітіба, PR, Бразилія). Серед інших продуктів на основі бактеріальної целюлози в біомедицині, доступних у всьому світі, відносяться CelMat® Wound (BOWIL Biotech sp. - Польща), Bio-skinG (Coreleader Biotech Co. Ltd. - Новий Тайбей, Тайвань) і XCell (Xylos Corporation – США). Обов'язкові умови для застосування бактеріальної целюлози як ранової пов'язки включають: високу механічну міцність у вологому стані, паропроникність, добре прилягання до рани, низьку вартість, хорошу біосумісність, довговічність, прозорість і легкість у використанні [75].

Збільшення серцево-судинних захворювань також спонукало дослідників задуматися про необхідність заміни кровоносних судин. Наразі, як такий аналог, запатентовано трубки BASYC® (BACTERIAL SYNTHESIZED CELLULOSE). Окрім їх придатності для судинних каналів різного внутрішнього діаметра, дослідження показують, що трубки BASYC мають високу механічну міцність у вологому стані,

чудові властивості утримання води та можуть успішно використовуватися для заміни сонних артерій у щурів, свиней і овець [75].

Також, відомі препарати β -глюканів як харчові добавки. До них відносяться EcoActiva®, MacroGard®, M-glucan, Zymosan та VitaStim-Tatio (VST) (Gannam et al, 2015). Також, до цієї групи відносяться препарати Glucagel®, який містить розчинний ячмінний β -глюкан та PromOat®, розчинний β -глюкановий продукт, отриманий з висівок вівса [76,77].

2.2. Можливе використання β -глюканів у фармацевтиці та медицині

Серед різних типів клітковини β -глюкани викликають особливий інтерес завдяки добре задокументованим діям як модуляторів імунітету. Імуномодулююча діяльність включає протиінфекційний імунітет, протираковий імунітет і всі аспекти клітинних і гуморальних захисних реакцій. Крім того, β -глюкани є нутрицевтиками, здатними знижувати рівень холестерину [78].

Існує багато оглядів клінічних випробувань благотворного впливу на здоров'я перорального прийому препаратів β -глюкану. β -Глюкани використовувалися в кількох клінічних випробуваннях для перевірки їх загального впливу на здоров'я та з'ясування відповідальних механізмів. Наприклад, циклічні глюкани можна використовувати як перев'язувальний матеріал для ран. Крім того, було отримано прозорий аркуш для перев'язки шляхом утворення комплексу між β -глюканом і хітозаном. Листи β -глюканехітозанового комплексу продемонстрували терапевтичну ефективність, порівнянну або вищу, ніж комерційний продукт для перев'язування ран, шляхом оцінки ран, утворених на спинних поверхнях мишей. Встановлено, що часткові опіки у дітей можна ефективно лікувати β -глюканом з хорошими результатами, навіть у немовлят і дітей раннього віку. β -Глюкан помітно спростив догляд за ранами для пацієнта та сім'ї та, здавалося, значно зменшив біль після травми [79].

β -Глюкани заслуговують на розгляд як терапевтичні засоби при лікуванні опіків і загоєнні ран. В одному дослідженні досліджувався передбачуваний захисний ефект лікування β -глюканом на пошкодження віддалених органів, викликане опіком. Результати показали, що введення β -глюкану було

ефективним проти спричиненого опіком окисного пошкодження тканин у щурів. В іншому дослідженні було визначено ранозагоювальні ефекти мембран полі(молочної-ко-гліколевої кислоти), що містять β -глюкан. Результати показали, що мембрани прискорюють загоєння ран, покращуючи взаємодія, проліферація клітин і ангиогенез. Тому ці мембрани можуть бути корисними як заміник шкіри для покращення загоєння ран [79]. Було показано, що нерозчинний β -глюкан покращує загоєння венозних виразок і посилює епітеліальну гіперплазію, а також збільшує проліферацію плазмоцитів і фібробластів. Незважаючи на велику кількість опублікованих даних про вплив β -глюкану *in vitro* та *in vivo* на загоєння ран, на сьогоднішній день було проведено лише кілька клінічних досліджень на людях із застосуванням β -глюканів у лікуванні ран [80].

Крім того, β -глюкан був запропонований як сполучний агент для поєднання гранульованої кераміки в новий компактний і еластичний композит через незадовільну хірургічну зручність імплантованої гранульованої біокераміки. Дослідження полягало в тому, щоб підготувати двофазний гідроксиапатит/глюкановий композит еластичних властивостей, який би дозволив легко маніпулювати та добре адаптуватися до форми та розмірів навіть великих кісткових дефектів. Результати підтвердили, що гнучкий композит гідроксиапатит/глюкан має потенціал як кісткозамінний матеріал. Також, була виявлена активність поглинання радикалів карбоксиметильованого β -глюкану в експериментах *in vivo*. Спостерігалось значне зниження рівня плазматичних карбонілів. Через це, було припущено, що властивості карбоксиметильованого β -глюкану поглинати радикали можуть бути відповідальними за антиоксидантну активність у моделі ад'ювантного артрити [79].

Головною проблемою у вакцинології є розробка платформ і ад'ювантів, які ефективно сприяють захисній реакції Т-клітин і антитіл. β -Глюкан було використано як нову платформу вакцини. β -Глюкан може бути завантажений антигенами та імуномодуляторами таким чином, що «корисне навантаження» вивільняється після фагоцитозу. Вони продемонстрували надійні та тривалі

антигенспецифічні реакції Т-клітин і антитіл після імунізації мишей β -глюканом, «інкапсульованим» з антитілом [79].

Перші докази протипухлинної активності β -глюканів були опубліковані майже 40 років тому. З тих пір кілька досліджень довели потужну протиракову дію β -глюканів проти різних типів злоякісних новоутворень, включаючи рак легенів, молочної залози та шлунково-кишкового тракту. Ця багатообіцяюча клінічна ефективність завершилася схваленням лентинану як модифікатора біологічної відповіді для лікування раку в Японії та його клінічним використанням протягом понад 30 років [81].

Лентинан розглядається як допоміжна терапія до променевої/хіміотерапії для пацієнтів із діагностованими солідними пухлинами, що покращує рівень відповіді, однорічну виживаність, працездатність, якість життя та токсичність променевої/хіміотерапії. Лікування лентинаном у поєднанні з хіміотерапевтичними засобами сприяло подовженню тривалості життя та було пов'язане з покращенням імунної відповіді господаря [81].

Протипухлинні відповіді на β -глюкани відрізняються залежно від їх походження, структури та складу. Наприклад, зимозан, отримана з дріжджів суміш β -1,3-глюкану та білкових комплексів, викликає імунні відповіді шляхом збільшення кількості та функції макрофагів, одночасно активуючи систему комплементу. Лентинан викликає протипухлинну імунну відповідь, покращуючи активність лімфокін-активованих клітин-кілерів і активність НК-клітин. Частинці β -глюкану, отримані з дріжджів, сприяють протипухлинній імунній відповіді, запускаючи секрецію прозапальних цитокінів і стимулюючи активацію вроджених імунних ефекторних клітин [81].

β -Глюкани завдяки своїм зв'язкам 1,3 та 1,4 розпізнаються організмом як неперетравлювані харчові волокна та проявляють різну метаболічну активність, що позитивно впливає на серцево-судинну систему: було показано, що вони знижують рівень холестерину, тригліцеридів і аполіпропротеїну В у дорослих. Відмічається, що при використанні дієти, збагаченої β -глюканами вівса та ячменю знижується артеріальний тиск у пацієнтів з легкою або прикордонною

гіпертензією, а у людей з гіпертонією, які страждають ожирінням, знижується глікемічна та інсулінемічна відповіді [82].

Напій, збагачений 5 або 10 г β -глюканів з вівса знижував загальний рівень холестерину, постпрандіальну концентрацію глюкози та інсуліну в осіб з гіперхолестеринемією. Кілька досліджень показали зниження рівня глюкози в крові натщесерце та відсоток глікозильованого гемоглобіну у пацієнтів із цукровим діабетом 2-го типу після прийому харчових волокон або β -глюканів із злаків. Таким чином, використання β -глюканів дозволяє проводити профілактику серцево-судинних захворювань, а також цукрового діабету [82].

Нещодавно було досліджено потенційну імунну активацію β -глюканів у стоматології. У центрі уваги цього випробування було виявлення потенційної речовини, яка стимулювала б захисні імунні реакції та впливала на шляхи зростання, що сприяло б вирішенню хронічних уражень, що спостерігаються при захворюваннях пародонта. Результати показали, що тестові групи мали вищі середні показники зменшення глибини карієсу та зменшення запалення ясен порівняно з контрольною групою. Введений β -глюкан називався комерційними капсулами Imurrill, джерело невідоме [83].

Бактеріальна целюлоза має великий потенціал як біоматеріал для стоматологічного та орального застосування. Він використовувався в основному для регенерації тканин пульпи зуба, регенерації періодонту та перев'язування хірургічних ран слизової оболонки порожнини рота. Крім того, бактеріальна целюлоза може використовуватись при лікуванні кореневих каналів зубів для видалення всіх залишків і висушування каналу. Наразі існує дуже мала кількість досліджень використання бактеріальної целюлози в стоматології, проте всі відомі дослідження мають лише позитивний результат, а також демонструють екологічність, більшу ефективність та швидку дію порівняно з іншими матеріалами цієї галузі [7].

ВИСНОВКИ ДО ЛІТОГЛЯДУ

1. Мукоадгезивні препарати – це речовини, які діють на поверхню слизових оболонок. В загальному, ці субстанції виконують другорядну функцію, оскільки їх головна мета – доставка та часткова пролонгація дії активного фармацевтичного інгредієнту.

2. β -Глюкани – це екзополісахариди, які притаманні рослинній сировині, а також грибам та дріжджам. За наявними даними, усі β -глюкани володіють мукоадгезивними властивостями. Вони є безпечними для здоров'я людини, що є великою перевагою цих речовин.

3. β -Глюкани можна одержати з рослин, таких як вівсяні висівки та ячмінь, з макрогрибів, або ж шляхом біотехнології. Основними біологічними агентами для синтезу β -глюканів виступають дріжджі (в загальному, *S. cerevisiae*), а також бактерії (наприклад, *R. radiobacter* та *G. xylinus*). Нерідко використовують прийому генної інженерії з використанням рекомбінантних штамів кишкової палички.

4. Для біосинтезу β -глюканів використовують методи оптимізації. Потрібно відзначити важливість температури культивування, початкового рівня рН, а іноді й швидкості перемішування культурального середовища, а також джерела вуглецю, оскільки β -глюкани по більшій частині побудовані з глюкози. Нерідко для цих цілей використовують відходи агропромисловості. Така технологія виробництва дозволяє не лише синтезувати біологічно-активні речовини для подальшого застосування у промисловості, а й частково вирішити екологічні проблеми масштабних викидів вже непотрібних речовин.

5. Кількість препаратів β -глюканів дуже обмежена, оскільки вони використовуються як протиопікові препарати або дієтичні добавки. β -Глюкани є універсальними, оскільки можуть використовуватись як для лікування ран і опіків, так і для боротьби з онкологічними захворюваннями. Перспективним є використання цих речовин (особливо бактеріальної целюлози) у стоматології, оскільки вони є екологічними, ефективними та швидкодіючими, порівняно з наявними препаратами.

РОЗДІЛ 3

ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВА БАКТЕРІАЛЬНОЇ ЦЕЛЮЛОЗИ ДЛЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ

3.1. Аналіз фармакологічних властивостей цільового лікарського засобу на основі бактеріальної целюлози, галузей використання, потреби у лікарському засобі

Бактеріальна целюлоза (БЦ), що виробляється деякими бактеріями, являє собою цікавий новий біосумісний наноматеріал. З моменту свого відкриття БЦ продемонструвала величезний потенціал у широкому спектрі біомедичних застосувань, таких як штучна шкіра, штучні кровоносні судини та мікросудини, перев'язки ран тощо. БЦ можна легко маніпулювати для покращення її властивостей та/або функціональних можливостей, що призводить до створення кількох нанокомпозитів на основі цього компоненту. Прикладом можуть бути БЦ/колаген, БЦ/желатин, БЦ/фіброїн, БЦ/хітозан тощо [84].

Наноцелюлозні матеріали привертають значну увагу в дослідженнях біомедичних матеріалів, присвячених тканинній інженерії, клітинній і генній терапії, діагностиці і контрольованій доставці, головним чином пов'язаним з їх нано-функції та властивості, що впливають з них. Для БЦ також існує надвисока чистота та сітчаста морфологія, схожа на людський колаген як біоміметична функція, що полегшує застосування, наприклад, штучну шкіру, судинні трансплантати, каркаси для тканинної інженерії, зубні імплантати, медичні прокладки, штучні кістки та хрящі, доставка ліків, білків і гормонів. На ринку є лише невелика кількість комерційно доступних продуктів на основі БЦ, які застосовуються під час трансплантації шкіри, лікування виразки другого та третього ступеня, пролежнів, заміни твердої мозкової оболонки на висівки, відновлення тканин пародонту тощо [85].

БЦ — це мукоадгезивний, гнучкий і м'який матеріал, що робить його

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.21 КР ПЗ</i>					
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>						
<i>Розроб.</i>		<i>Феценко М.С.</i>			<i>РОЗДІЛ 3 ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВА БАКТЕРІАЛЬНОЇ ЦЕЛЮЛОЗИ ДЛЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ</i>					
<i>Перевір.</i>		<i>Карлаш Ю.В.</i>						<i>Лім.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Реценз.</i>									42	109
<i>Н. Контр.</i>								<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>								

хорошим кандидатом для стоматологічного застосування. БЦ можна використовувати як ранову пов'язку для піднебіння при трансплантатах слизової оболонки або як покриття для екстракційних лунок зубів, а також можна використовувати як тимчасовий імплантат у зубних лунках або як мембрану для керованої регенерації тканини [86].

У дентальній імплантації та протезній стоматології збереження залишкового об'єму альвеолярної кістки після втрати зуба має вирішальне значення, але воно часто порушується інфекціями, зовнішніми травмами та іншими пошкодженнями. Gengiflex® (продукт Biofill, Бразилія) використовується для лікування дефектів пародонту. Gengiflex® складається з двох шарів: внутрішня мембрана виготовлена з БЦ, що робить мембрану жорсткою, тоді як зовнішня мембрана хімічно модифікована з лужної целюлози [86].

Дослідження 2019 року продемонстрували переваги завантаженого доксицикліном гідратованого та ліофілізованого БК у стоматологічній терапії, такий як видалення зуба чи трансплантація слизової оболонки, де окислення перйодату досліджувалося в напрямку модифікованого профілю деградації. Крім того, нативний і окислений доксициклін-навантажений БЦ були протестовані для профілактики інфекцій [86].

В 2014 році було показано, що наявність нановусів БЦ прискорює процеси затвердіння мінеральних триоксидних заповнювачів цементів, що призводить до створення композитів, придатних для ендодонтичного застосування. Та ж група комбінувала порошок БЦ з порошком силікатного цементу для тривалого виживання клітин і сприяння клітинній проліферації *in vitro*, демонструючи його потенціал для застосування в стоматології [86].

У недавній роботі було поєднано БЦ з желатином для утворення асиметричних мембран. Мембрани зберігали свою морфологію в прямому контакті з мембраною, прилипали до пористої ділянки желатину, не прилипаючи до сторони БЦ з тонким покриттям желатину, показали корисні властивості для можливого застосування керована регенерація тканин, яка необхідна при лікуванні пародонту [86].

Захворювання пародонту охоплюють широкий спектр запальних станів, які впливають на опорні структури зубів (ясна, кістка та періодонтальні зв'язки), що може призвести до втрати зуба та сприяти системному запаленню. Хронічний періодонтит вражає переважно дорослих, але іноді агресивний періодонтит може виникати у дітей. Ініціація та розповсюдження пародонтозу відбувається через дисбактеріоз комменсальної мікробіоти ротової порожнини (зубного нальоту), який потім взаємодіє з імунним захистом хазяїна, що призводить до запалення та захворювання. Ця патофізіологічна ситуація зберігається під час нападів активності та спокою, доки уражений зуб не буде видалено або мікробна біоплівка не буде видалена терапевтичним шляхом і запалення не вщухне. Тяжкість захворювання пародонту залежить від факторів ризику навколишнього середовища та хазяїна, як модифікованих (наприклад, куріння), так і незмінних (наприклад, генетична сприйнятливість). Профілактика досягається шляхом щоденної самостійної гігієни порожнини рота та професійного видалення мікробної біоплівки раз на квартал або раз на два роки [87].

В табл.3.1. показано мікробіоту ротової порожнини яка вважається необхідною (здоровою) та яка викликає захворювання парадонту.

Таблиця 3.1

Найпоширеніші представники мікрофлори здорової ротової порожнини та при запальних станах парадонту [88]

Здорова порожнини	мікрофлора ротової порожнини	Патогени, що спричиняють захворювання пародонту
	<i>Rothia dentocariosa</i>	
	<i>Rothia aeria</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
	<i>Fusobacterium nucleatum ss. vincentii</i>	
	<i>Lautropia mirabilis</i>	
	<i>Actinomyces sp.</i>	<i>Desulfobulbus sp. HOT 041</i>
	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	<i>Treponema sp.</i>
	<i>Streptococcus sp.</i>	<i>Peptostreptococcaceae</i>
	<i>Prevotella oris</i>	
	<i>Fusobacterium nucleatum ss. animalis</i>	
	<i>Capnocytophaga sp.</i>	<i>Saccharibacteria</i>
	<i>Fusobacterium nucleatum ss. nucleatum</i>	
	<i>Bergeyella sp. HOT 322</i>	<i>Enterobacter sakazakii</i>

<i>Propionibacterium propionic urn</i>	<i>Mogibacterium timidum</i>
<i>Corynebacterium sp.</i>	<i>Fretibacterium sp.</i> HOT 360
<i>Veillonella parvula</i>	<i>Porphyromonas endodontalis</i>
<i>Neisseria sp.</i>	
<i>Leptotrichia sp.</i>	<i>Sneathia sanguinegens</i>
	<i>Staphylococcus aureus</i>

Рання фаза захворювання парадонту, умовно визначена як гінгівіт, характеризується помірним і самообмежувальним запаленням структур пародонта. Коли локальне запалення прогресує, хвороба розвивається до пародонтиту, який був визначений Міжнародним семінаром з класифікації захворювань пародонта 1999 року як мікробно-асоційоване та опосередковане господарем запалення, що призводить до втрати періодонтального прикріплення. Відповідно до патофізіологічної основи пародонтит можна класифікувати на три різні форми, тобто пародонтит, пародонтит, пов'язаний із системними захворюваннями, і некротичний пародонтит. Захворювання пародонту прогресивно розвивається, якщо його не лікувати, що спричиняє кілька місцевих ускладнень, таких як розвиток глибоких пародонтальних уражень, пародонтальної кістки та втрати зубів, аж до жувальної недостатності [89].

Нещодавно було висунуто гіпотезу, що деякі бактерії, відповідальні за пародонтит, можуть активно проникати в кровообіг із тканин пародонту, дислокуватися в багатьох органах і тканинах, таким чином підвищуючи ризик розвитку патологій, що характеризуються запальними/інфекційними компонентами. До них зазвичай належать різні типи злоякісних новоутворень (особливо рак травного тракту, підшлункової залози, передміхурової залози, молочної залози, матки, легенів, стравоходу та ротоглотки, а також лімфоми), серцево-судинні захворювання, венозна тромбоемболія, діабет, ревматичні розлади, а також деменція, які в сукупності представляють найпоширеніші у світі патології [89].

Таким чином, такий дедалі міцніший зв'язок між захворюваннями пародонту та патологіями людини має сприяти створенню ефективних медичних

заходів, спрямованих на запобігання розвитку пародонтиту, а також на пом'якшення його потенційного впливу на здоров'я людини та, зрештою, на обмеження його потенційно несприятливих клінічних, соціальних та економічних наслідків [89].

Глобальний ринок мікробної та бактеріальної целюлози оцінювався в 324,5 млн доларів США в 2019 році, і очікується, що він досягне 785,1 млн доларів США до кінця 2026 року, зростаючи на 13,3% протягом 2021-2026 років. В порівняння, ринок лише фармацевтичної целюлози, одержаної іншими шляхами, в 2021 році оцінювався в 401,1 млн доларів США. А загальний ринок целюлози на 2021 рік оцінювався в 5,85 мрд доларів США [90-92]. Можна хробити висновок про те, що БЦ вже має свій певний рівень в світовій економіці, але він все ще не дуже великий, порівнюючи зі звичайною целюлозою.

Очікується, що в майбутньому виробництво та споживання БЦ продовжать розвиватися з відносно високими темпами зростання. Щоб задовольнити великий і зростаючий попит, все більше і більше виробників будуть переходити в цю галузь. Це пов'язано як з виробництвом відходів великої промисловості, так і з збільшенням галузей застосування БЦ [90].

Тож, за цим аналізом можна стверджувати про нагальну потребу у створенні нового препарату на основі бактеріальної целюлози, оскільки ця субстанція ще не дуже поширена і обмежується кількістю виробників. Пропонується розробити препарат на основі бактеріальної целюлози з подальшим застосуванням для лікування захворювань парадонту.

3.2. Обґрунтування вибору форми випуску лікарського засобу на основі бактеріальної целюлози

3.2.1. Обґрунтування форми випуску лікарського засобу на основі бактеріальної целюлози

Мукоадгезивні лікарські препарати — защічні таблетки, інші тверді чи м'які ЛП, які містять один або більше АФІ, призначені для системної абсорбції через защічну слизову оболонку протягом пролонгованого часу, які готують пресуванням моно- або мультишарових таблеток. Зазвичай вони містять

гідрофільні полімери, які при зволоженні слиною утворюють еластичний гідрогель, що прилипає до західної оболонки [93].

Проте, бактеріальна целюлоза може являти собою мукоадгезивний препарат у вигляді пластинки. Наразі в світі не існує лікарських препаратів з подібною лікарською формою, але вченими, наразі, активно розглядається саме виробництво пластинок з використанням бактеріальної целюлози в стоматологічній справі [94].

Цікавою є розробка пластинок на основі бактеріальної целюлози, що просочені 2-% розчином хлоргексидину. Такий лікарський засіб може вирішити проблеми захворювань пародонту. Захворювання пародонту, так само як і карієс зубів, отримали дуже широке поширення. За даними ВООЗ, близько 95% дорослого населення планети та 80% дітей мають ті чи інші ознаки захворювання пародонту. Пародонт - це комплекс тканин, які оточують зуб і забезпечують його фіксацію в щелепних кістках. У цей комплекс включають ясна, періодонтальную зв'язку, що сполучає корінь зуба з кістковою лункою, кісткову тканину альвеолярних відростків і цемент кореня зуба. При різних захворюваннях пародонту в патологічний процес може залучатися будь-яка частина пародонтального комплексу або весь пародонт в цілому. Характер патологічного процесу також буває різним: дистрофічний, запальний або пухлинний [94,95].

Бактеріальна целюлоза наразі нерідко пропонується у вигляді протиопікових патчів [96]. Можна вважати, що запропонована лікарська форма дуже подібна до цього лікарського препарату, але має свої певні відмінності.



Рис.3.1. Приклад протиопікових патчів на основі бактеріальної целюлози [96]

Пластинки з бактеріальної целюлози більше подібні до пластинок, які покращують запах з рота [97]. Вони також будуть сухими та приліплюватись до ясен за рахунок своїх оромукозних властивостей.



Рис.3.2. Приклад пластинок для покращення запаху з ротової порожнини [97]

Лікарський засіб в такій формі буде дуже довго зберігатися, оскільки це сухі пластини з антисептиком, також дозволить точково вирішити проблеми запалення ротової порожнини та просто є доволі зручною формою для застосування, порівняно з мукоадгезивними гелями та защічними таблетками.

3.2.2. Обґрунтування вибору первинної і вторинної упаковки лікарського засобу на основі бактеріальної целюлози

Оскільки бактеріальна целюлоза гарно реагує з водою, необхідно передбачити первинну упаковку для вологозахисту. Для цього пропонується звернути увагу саме на полімерну упаковку.

Вимоги до полімерів [98]:

- біологічна безпечність, біологічна сумісність з контактуючими тканинами та індиферентність по відношенню до організму в цілому, володіти фізичною, хімічною і механічною стійкістю;

- не руйнуватися або піддаватися мінімальному руйнуванню в середовищі живого організму з виділенням мономерів та інших продуктів розпаду;
- висока чистота і однорідність матеріалу;
- можливість переробки у виробі без розкладу і виділення низькомолекулярних продуктів;
- відсутність подразнюючого, токсичного, канцерогенного впливу на живі організми, як самих полімерів, так і продуктів, присутніх в матеріалі або які утворюються в процесі його зберігання і експлуатації;
- здатність витримувати стерилізацію різними методами і засобами (у випадку стерильних лікарських засобів).

Для первинної упаковки пропонується використовувати поліетиленову упаковку, оскільки вона гарно зарекомендувала себе в якості вологостійкого та непроникного матеріалу. Також, ще однією з переваг такої плівки є її доступність та дешевизна, а також біосумісність з різноманітними лікарськими засобами [99]. Первинна упаковка матиме вигляд умовного запаяного з двох сторін мішечку, в якому будуть знаходитись пластинки з бактеріальною целюлозою. Для відокремлення пластинок пропонується використовувати паперові вкладки, що є дешевим та екологічним рішенням.

Щодо вторинної упаковки, пропонується обрати картонну коробку, за її зручність та екологічність.

Отже, як лікарська форма, пропонується виготовляти пластинки для ротової порожнини, просочені 2-% розчином хлоргексидину, первинна упаковка – поліетиленова плівка, яка буде захищати препарат від вологи, а вторинна – картонна коробка, через її практичність, універсальність та екологічність.

3.3. Обґрунтування вибору біологічного агенту для одержання бактеріальної целюлози

Відомо велику кількість біологічних агентів, які синтезують бактеріальну целюлозу. Варто відмітити, що саме дослідження з різними видами бактерій

Glucanacetobacter займають вагому частину робіт, які висвітлюють питання синтезу целюлози біотехнологічним шляхом.

Продуцент *G. medellensis* (штам не вказано) може утворювати близько 4,5 г/л бактеріальної целюлози. Особливістю технологічного рішення є підтримка низького рівня рН, в значенні 3,5. Проте, культивування відбувається протягом 8 діб, що каже про недоцільність застосування такого біологічного агента через його низький вихід кінцевого продукту. За літературним оглядом відомо, що бактерії цього роду показують набагато вищі та кращі результати [100].

Наприклад, *G. xylinus* CGMCC 2955 може продукувати 5,97 г/л бактеріальної целюлози. Час культивування, порівняно з минулим продуцентом, є вдвічі меншим та становить всього 24-30 години, тобто близько однієї доби. Найкращим субстратом для синтезу цільового продукту виявився гліцерин, що дозволяє здешевити поживне середовище і може виявитися економічно вигідним методом одержання целюлози з бактеріальних систем [101].

Роль гліцерину підтверджується й для інших продуцентів бактеріальної целюлози. Відзначається, що саме цей субстрат є найкращим індуктором синтезу нашого β -глюкану стосовно культури *Enterobacter hormaechei* subsp. *steigerwaltii* ZKE7. За 8 днів культивування на відході виробництва біодизелю можна одержати 18,5 г/л цільового продукту [102].

Ще в одній роботі висвітлюється важливість гліцерину для виробництва целюлози бактеріального походження. При оптимізації поживного середовища було визначено, що застосування гліцерину як субстрату для *Acetobacter senegalensis* MA1 за 30 днів культивування дозволяє одержати 469,83 г/л бактеріальної целюлози [14].

Тепер потрібно зробити порівняльну характеристику продуцентів бактеріальної целюлози для вибору найкращого біологічного агента. Такий аналіз виконано в таблиці 3.2.

Тож, за попередньою таблицею очевидний лідер по концентрації бактеріальної целюлози, а саме *A. senegalensis* MA1. Проте є параметри, які не дозволяють остаточно обрати цей біологічний агент. В першу чергу це

тривалість культивування – 30 днів. Також, треба врахувати певні відмінності поживних

Таблиця 3.2

Порівняння різних продуцентів бактеріальної целюлози

Біологічний агент	Склад поживного середовища, г/л	Режим культивування	Концентрація β-глюкану, г/л	Література
<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>steigerwaltii</i> ZKE7	Гліцерин – 90 Глюкоза – 30 Дріжджовий екстракт – 5,0 Пептон – 5 Na ₂ HPO ₄ – 2,7 Лимонна кислота – 1,15	192 год рН 7,0 35 °С 150 об/хв	18,5	[102]
<i>G. xylinus</i> CGMCC 2955	Гліцерин – 25 Дріжджовий екстракт – 7,5 Пептон – 10 Na ₂ HPO ₄ – 10	24-30 год рН 6 (не контролюється) 30 °С 160 об/хв	5,97	[101]
<i>A. senegalensis</i> MA1	Гліцерин – 50 Дріжджовий екстракт – 7,5 ПЕГ 6000 – 7,76 Пептон – 5 Na ₂ HPO ₄ – 2,7 Лимонна кислота – 1,15	720 год рН 6 33,5 °С 160 об/хв	469,83	[14]

середовищ, а й отже – вартість виробництва в цілому. Тому, пропонується порівняти вартість 1 літра поживного середовища для кожного біологічного агента.

Аналіз вартості поживних середовищ будемо проводити по доступному ринку компонентів поживного середовища, адже купувати готове в промислових масштабах – не рентабельно, а отже, недоречно. Прорахунок поживних середовищ представлено в таблиці 3.3.

Таблиця 3.3

Порівняння цін поживних середовищ

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації
<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>steigerwaltii</i> ZKE7	Гліцерин – 90	72	6,48	1
	Глюкоза – 30	30	0,9	2
	Дріжджовий екстракт – 5,0	1100	5,5	3
	Пептон – 5	1060	5,3	4
	Na ₂ HPO ₄ – 2,7	50	0,14	5
	Лимонна кислота – 1,15	85	0,1	6
Ціна ≈ 18,42 грн				

<i>G. xylinus</i> CGMCC 2955	Гліцерин – 25	72	1,8	1
	Дріжджовий екстракт – 7,5	1100	7,5	3
	Пептон – 10	1060	10,6	4
	Na ₂ HPO ₄ – 10	50	0,5	5
	Ціна ≈ 20,4 грн			
<i>A. senegalensis</i> MA1	Гліцерин – 50	72	3,6	1
	Дріжджовий екстракт – 7,5	1100	7,5	3
	ПЕГ 6000 – 7,76	72	0,56	7
	Пептон – 5	1060	5,3	4
	Na ₂ HPO ₄ – 2,7	50	0,14	5
	Лимонна кислота – 1,15	85	0,1	6
	Ціна ≈ 17,2 грн			

Примітка (ціни наведено станом на грудень 2023 року): 1 - <https://prom.ua/p1148674286-glitserin-250kg.html?&primelead=M141MzU>, 2 - <https://prom.ua/p144210781-glyukoza-pishevayamagnij-okismetionin.html>, 3 - <https://prom.ua/ua/p1086437845-ekstrakt-drozhzhej.html>, 4 - <https://prom.ua/p1122819431-pepton-fermentativnyj.html?&primelead=MC40>, 5 - <https://prom.ua/p262712020-natrij-fosfornokislyj-dvuzameschyonnyj.html?&primelead=Mw>, 6 - <https://prom.ua/p818429808-limonna-kislota-meshok.html?&primelead=MS44>, 7 - <https://prom-pg.com.ua/ua/p675999419-polietilenglikol-peg-400.html>

Проаналізувавши вартість кожного поживного середовища можна сказати, що вони знаходяться в одній ціновій категорії, відрізняючись лише на декілька гривень один від одного. Але, це не заважає визначити, що найдешевше середовище належить продуценту з найвищою концентрацією бактеріальної целюлози - *A. senegalensis* MA1. Проте, ця таблиця не висвітлює головного – остаточну умовну вартість целюлози, а також швидкість утвореного глюкану за 1 годину. Ці показники дозволять зробити остаточний вибір в сторону певного продуцента. Таке порівняння наведено в таблиці 3.4.

За остаточним порівнянням обираємо *A. senegalensis* MA1. Умовна вартість бактеріальної целюлози цього продуценту становить всього 4 копійки, а її швидкість утворення найвища. При цьому, найдорожчою целюлозою варто визнати *G. xylinus* CGMCC 2955, яка вартує 3,42 грн. Така ціна за 1 грам є дуже не вигідною, навіть якщо порівнювати зі звичайною целюлозою (1 г цієї сировини на ринку коштує близько 13 копійок). Бактеріальна целюлоза, яка утворюється *E. hormaechei*

Порівняння біологічних агентів за економічно важливими показниками

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища, грн	Концентрація целюлози, г/л	Умовна вартість 1 г целюлози, грн/г	Тривалість культивування, год	Кількість утвореної целюлози за годину, г/год
<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>steigerwaltii</i> ZKE7	18,42	18,5	0,99	192	0,096
<i>G. xylinus</i> CGMCC 2955	20,4	5,97	3,42	24-30*	0,221
<i>A. senegalensis</i> MA1	17,2	469,83	0,04	720	0,653

Примітка*: візьмемо середній показник для розрахунків – 27 годин

subsp. *steigerwaltii* ZKE7 також можна вважати не дуже дешевою, оскільки 1 г цієї субстанції коштує 0,99 грн. При цьому варто враховувати, що це не побутовий продукт, а субстанція для виробництва потенційного лікарського засобу, тому вона може стільки коштувати.

Найменше за 1 годину бактеріальної целюлози утворюється в *E. hormaechei* subsp. *steigerwaltii* ZKE7, майже 100 мг. Наступним в черзі йде дорога целюлоза від *G. xylinus* CGMCC 2955, яка за той же самий проміжок часу утворює близько 220 мг цього ж продукту. Обраний біологічний агент в той час синтезує 650 мг запропонованого β -глюкану.

Отже, для подальшої роботи обираємо штамп *A. senegalensis* MA1.

3.4. Розрахунок потреби у бактеріальній целюлозі для випуску лікарського засобу та розрахунок річної потреби у культуральній рідині для одержання розрахованої кількості бактеріальної целюлози

На вітчизняному ринку існує кілька оромукозальних препаратів, які використовують в стоматології. Їх різноманітність показана в табл.3.5.

Комерційні оромукозальні препарати для лікування захворювань парадонту

Назва	Виробник	Діюча речовина	Форма	Ціна, грн	Джерело
АТОНЗИЛ®	ТОВ "Славія 2000", м. Кіровоград, Україна	Мірамістин	Розчин оромукозний	-	[103]
ГЕКСАСПРЕЙ	Лабораторії Бушара Рекордаті, Франція	біклотимол	Спрей оромукозний	278 за 30 г	[104]
Лоросан	ПАТ «БІОЛІК», Україна	екстракт рідкий квітів соняшника		209,13 за 30 мл	[105]

Отже, з табл.3.5. видно, що на ринку України представлено всього 2 лікарські форми оромукозальних препаратів для лікування парадонтів, до яких відносяться розчини та спреї. Пластинок для лікування захворювань ротової порожнини в Україні немає.

Закордоном такі лікувальні пластинки лише розробляються, а тому виробництво такого препарату на теренах України буде унікальним не лише у нас, а й у всьому світі [106].

Пропонується виготовляти пластинки на основі БЦ з хлоргексидином, оскільки ця речовина активно використовується при лікуванні різних захворюваннях пародонту. Крім того, вже є дослідження такої взаємодії, які показують позитивні результати, порівняно зі звичайним розчином [107].

За світовою статистикою, кількість хвороб пародонту станом на 2019 рік становить 14 053 випадків на 100 тис. населення [10]. Населення Чернівецької області станом на 2022 рік 889,9 тис. [108]. Тоді, кількість випадків на цю область становитиме:

$$\frac{14\,053 \times 889,9}{100} \approx 125\,057 \text{ випадків}$$

Оскільки препарат новий, пропонується його використовувати для лікування лише гінгівіту. В структурі захворювань парадонту цей стан складає близько 50% [12]. Зважаючи на наявність великої кількості інших препаратів у вигляді різних лікарських форм на ринку, пропонується використання 5% ринку. Тоді, кількість випадків становитиме:

$$125\,057 \times 0,5 \times 0,05 \approx 3126 \text{ випадків}$$

В загальному гінгівіт лікують полосканням ротової порожнини 2 рази на день до зникнення симптоматики. Після цього, в рекомендаціях приписують ретельний догляд ротової порожнини шляхом чищення зубів та полоскання рота спеціальними ополіскувачами. Зазвичай, лікування триває 5 діб, а за необхідності курс продовжують [109,110].

Оскільки гінгівіт це в першу чергу захворювання ясен, будемо розраховувати пластинки на весь периметр ясен, хоча препарат можна також застосовувати локально. В середньому ширина ясен становить 3,4 мм, а їх довжина – 3 мм. В людей в загальному 28 зубів, оскільки деякі не мають зубів мудрості [111,112]. Тоді, в середньому довжина та ширина ясен становить:

$$h = 28 \times 3 = 84 \text{ мм}$$

$$l = 28 \times 3,4 = 95,2 \text{ мм}$$

При цьому треба враховувати, що ясна мають 2 сторони, верхню та нижню, тому потрібно передбачувати в 2 рази більше пластинок. Периметр пластинок, які треба виготовляти для 1 ротової порожнини становить:

$$84 \times 95,2 \times 2 \approx 16 \text{ см}^2$$

Таку кількість буде легко розділити на 2 зони ясен, стрічки по 8 см². Пропонується передбачити стрічки тільки на передні ясна, оскільки на внутрішні частини буде доволі складно прикеїти ці стрічки. Полоски потрібно буде наклеювати 1 раз протягом 5 діб [110], тоді, необхідна кількість пластинок на весь курс лікування для 1 людини становить:

$$5 \times 2 = 10 \text{ шт.}$$

Враховуючи це, можемо розрахувати відповідну кількість стрічок на розраховану кількість випадків:

$$3126 \times 10 = 31\,260 \text{ шт.}$$

Периметр цих стрічок становить:

$$31\,260 \times 8 = 250\,080 \text{ см}^2$$

Відомо, що на 1 см^2 припадає близько 160 мг бактеріальної целюлози [113].

Тоді, кількість бактеріальної целюлози, яка необхідна становить:

$$250\,080 * 160 \approx 40 \text{ кг}$$

Концентрація сухої целюлози в поживному середовищі становить 17 г/л [14]. Тоді, кількість культуральної рідини на рік становить:

$$\frac{40}{17} = 2,35 \text{ м}^3$$

З врахуванням того, що під час виділення будуть відбуватись втрати (близько 5%), кількість культуральної рідини на рік становить:

$$\frac{2,35}{1 - 0,05} = 2,47 \text{ м}^3$$

Приймаємо, що для отримання $2,47 \text{ м}^3$ культуральної рідини необхідно 330 робочих трудоднів ($T_{рд}$). Відповідно кількість культуральної рідини на добу (V_d) становитиме:

$$V_d = V_{кр} / T_{рд} = 2,47 / 330 \approx 7,5 \text{ л}$$

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

$$V_{крц} = K_1 \cdot V_d \cdot T_{цф} / 24 = 1,1 * 7,5 * 727 / 24 \approx 250 \text{ л,}$$

де $T_{цф}$ - цикл роботи ферментера, який включає: мийку та огляд – 1,5 год, перевірку на герметичність – 0,5 год, підігрів та стерилізацію апарату – 1,5 год, охолодження ферментеру – 1 год, завантаження поживного середовища – 1,5 год, засів культурою – 0,5 год, ферментацію – 720 год, та вивантаження – 0,5 год, і становить 727 години. K_1 – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій ($K_1 = 1,1$).

РОЗДІЛ 4

ОБГРУНТУВАННЯ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ

Для виділення та очищення бактеріальної целюлози використовується одна загальна схема. Ознайомитись з нею можна на рис.4.1.

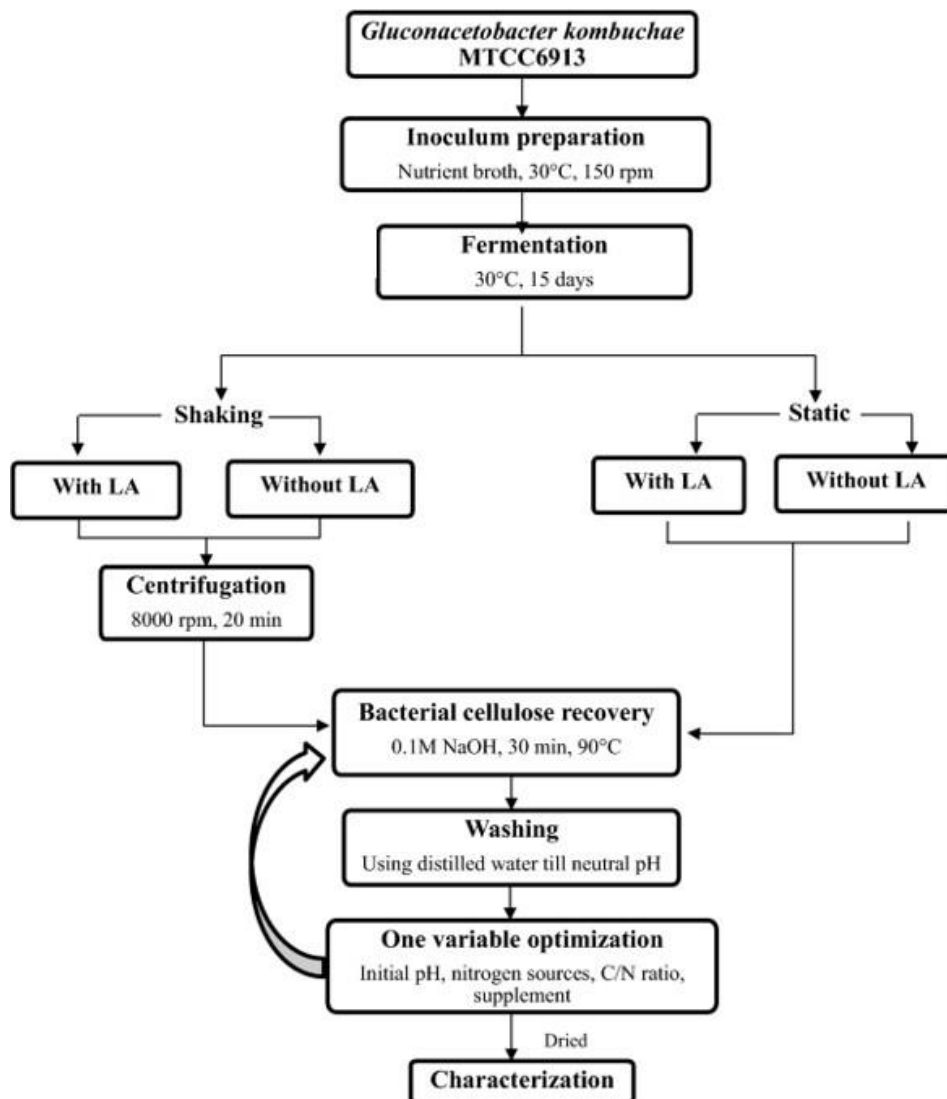


Рис.4.1. Один з прикладів виділення та очищення бактеріальної целюлози [52]

Тому, пропонується виконати обґрунтування саме за цією схемою.

4.1. Обґрунтування відокремлення бактеріальної целюлози від біомаси та супернатанту

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.21 КР ПЗ</i>			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Фещенко М.С.			РОЗДІЛ 4 ОБГРУНТУВАННЯ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ	Лім.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Карлаш Ю.В.					57	109
Реценз.						<i>Кафедра БТМ</i>		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

На сьогодні застосовуються такі методи відокремлення біомаси від культуральної рідини: фільтрація, флотація, центрифугування та сепарація [114].

Фільтрація - процес відділення твердої фази від рідкої здійснюється шляхом проходження суспензії через фільтруючий матеріал або через полімерну сітку з відповідним діаметром отворів. Переваги: є менш енергоємним. Недоліки: великі втрати біомаси і в нашому випадку бактеріальної целюлози за рахунок проходження частини клітин через пори фільтруючого матеріалу [114].

Флотація - виділення з рідких середовищ твердих часток або часток іншої рідини здійснюється за допомогою продування крізь неї газу. Переваги: економічність, висока продуктивність і можливість використання в безперервних процесах. Недоліки: великі втрати біомаси та бактеріальної целюлози [114].

Центрифугування - процес розділення суспензій на рідку і тверду фази здійснюється під дією відцентрових сил, при цьому суспензія проходить через фільтрувальну тканину або через металеву сітку з одночасним затриманням твердої фази. Переваги: можливість автоматизувати процес, спостерігаються менші втрати біомаси та бактеріальної целюлози порівняно з фільтрацією та флотацією. Недоліки: менша ефективність порівняно із сепаруванням [114].

Сепарування - процес розділення суспензій на рідку і тверду фази здійснюється під дією відцентрових сил, при цьому суспензія проходить через міжтарілчастий простір сепаратора. Переваги: можливість автоматизувати процес, спостерігаються менші втрати біомаси та бактеріальної целюлози порівняно із фільтрацією та флотацією, більша ефективність порівняно з центрифугуванням. Недоліки: порівняно вищий механічний вплив на клітини [114].

Бактеріальна целюлоза – унікальний продукт, який виділяється в супернатант, при цьому утворюючи склизьку масу. Через цю особливість, вибір між сепаратором та центрифугою схиляє до вибору саме останнього апарату, оскільки бактеріальна целюлоза може забитись в міжтарільчастий простір сепаратора, що веде зв собою високі втрати. Виділення бактеріальної целюлози з культуральної рідини зазвичай виконують за допомогою центрифуги, оскільки

через свої особливості, бактеріальна целюлоза збирається у вигляді зависі над рідкою фазою. Тому, вибір робимо саме щодо методу центрифугування [14].

4.2. Обґрунтування стабілізації бактеріальної целюлози

Наступною стадією виділення є стабілізація згустку бактеріальної целюлози. Стабілізація відбувається за допомогою розчину гідроксиду натрію. Дослідники відмічають, що саме цей луг відповідає за структуру бактеріальної целюлози (особливо за гладкість), а також за пористість готового продукту. Відмічається, що при концентрації 2-% і вище розчину гідроксиду натрію підвищується гладкість самої целюлози, а також знижується паро- та гідропроникність. Також, гідроксид натрію додатково очищає бактеріальну целюлозу від можливих алергенів, які можуть знаходитись в поживному середовищі. Також, концентрація гідроксиду натрію на пряму впливає на в'язкість бактеріальної целюлози [115,116].

Всі ці фактори говорять про важливість розчину лугу у стабілізації кінцевого продукту. Для одержання бактеріальної целюлози пропонується обрати 0,1М розчин натрію гідроксиду (як вказано в схемі на рис.4.1), що еквівалентно 0,4% розчину, тобто, при такій концентрації ступень паро- та гідропроникності залишатиметься доволі високим, що є важливо для мукоадгезивного препарату. Використовується висока температура для кращого змішування бактеріальної целюлози разом з розчином лугу [14,52].

4.3. Обґрунтування додаткового промивання бактеріальної целюлози

За загальною схемою наступною стадією є промивання бактеріальної целюлози. Оскільки препарат має бути мукоадгезивним, а також передбачається його майбутнє використання як пластинок проти парадантозу, варто додатково промити бактеріальну целюлозу від надлишкової кількості гідроксиду натрію, а також можливих залишків поживного середовища, в якому містяться алергени, а також від потенційно можливих залишків бактерій [52].

Тому, після того, як бактеріальна целюлоза стабілізується у розчині гідроксиду натрію, її необхідно відцентрифугувати та промити у дистильованій воді. При цьому, відмивання відбувається до тих пір, поки рН бактеріальної

целюлози не стане нейтральним. Тому, пропонується передбачити близько трьох повторностей промивки целюлози у воді, що передбачає її змішування з подальшим центрифугуванням [52].

4.4. Обґрунтування методу сушіння бактеріальної целюлози

Промиту бактеріальну целюлозу далі висушують при 70 °С протягом 12 годин. Це означає, що для висушування цієї речовини немає потреби у сублімаційній сушарці.

Найбільше розповсюдження отримали конвективні сушильні установки, які складаються з калорифера, в якому підігрівається повітря, та сушильної камери. У сушарках такого типу відтворюються жорсткі умови процесу. Це зумовлено тим, що все тепло, необхідне для випаровування вологи з матеріалу, підводиться одноразово, а повітря нагрівається відразу до відносно високої температури, яка є зазвичай гранично допустимою для матеріалу, що висушується. При перевищенні цієї температури можливе розкладання матеріалу або погіршення його якості. Останні твердження більше відносяться до контактних сушарок, які представляють собою шафи з нагрівними полицями, на які наносять відповідну субстанцію [117].

З врахуванням усіх особливостей, для сушіння пропонується обрати саме конвективне сушіння, через його переваги. Варто зазначити, що бактеріальні целюлоза висохне як велика пластина (по формі деко від сушильної шафи), тому для ліпшого зберігання їх необхідно буде розрізати.

РОЗДІЛ 5

ПІДБІР ТЕХНОЛОГІЧНОГО ОБЛАДНАННЯ З ВРАХУВАННЯМ МАТЕРІАЛЬНИХ ПОТОКІВ ПО СТАДІЯХ

Вихідні дані:

1. Об'єм культуральної рідини з однієї ферментації ($V_{кр}$) = 250 л;
 2. Концентрація біомаси *A. senegalensis* MA1 в культуральній рідині ($C_{біом}$) = 9 г/л;
 3. Втрати на стадіях виділення і очищення бактеріальної целюлози = 5 %;
- Початкова кількість сухої бактеріальної целюлози складає $17 \cdot 250 \approx 4,25$ кг, а кінцева її кількість, з урахуванням 5 %-ів втрат, має становити 4,038 кг. Розподіл втрат по усім стадіям виділення і очищення наведено в таблиці 5.1.

Таблиця 5.1

Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіям

№ п/п	Назва стадії (операції)	Матеріальні потоки на стадії	Кількість по стадіям			Необхідне обладнання
			Надійшло	Втрати (разом 5 %)	Вийшло	
1	2	3	4	5	6	7
ТП 2 Зберігання культуральної рідини						
1	ТП 2 Зберігання культуральної рідини	Культуральна рідина	250 л	-	250 л	Збірник культуральної рідини об'ємом 300 л
ТП 3 Центрифугування культуральної рідини						
2	ТП 3 Центрифугування культуральної рідини	Культуральна рідина	250 л	-	-	Проточна центрифуга
		Біомаса	2,25 кг	-	-	На утилізацію
		Супернатант	130,29 л	-	-	
		Волога бактеріальна целюлоза	117,46 кг	2%	115,11 кг	В збірник об'ємом 300 л

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.21 КР ПЗ</i>		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Фещенко М.С.			Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Карлаш Ю.В.				61	109
Реценз.					<i>Кафедра БТМ</i>		
Н. Контр.							
Затверд.		Стабніков В.П.					
					РОЗДІЛ 5 ПІДБІР ТЕХНОЛОГІЧНОГО ОБЛАДНАННЯ З ВРАХУВАННЯМ МАТЕРІАЛЬНИХ ПОТОКІВ ПО СТАДІЯХ		

ТП 4 Промивання бактеріальної целюлози за допомогою 0,1% розчину гідроксиду натрію						
3	ТП 4 Промивання бактеріальної целюлози за допомогою 0,1% розчину гідроксиду натрію	Волога бактеріальна целюлоза	115,11 кг	-	-	В збірнику об'ємом 300 л
		0,1% розчин гідроксиду натрію	230 л	-	-	
		Суспензія бактеріальної целюлози	-	-	345,11 л	На сушіння в конвективній сушарці об'ємом заповнення 350 л
ТП 5 Сушіння вологої бактеріальної целюлози в конвективній сушарці						
4	ТП 5 Сушіння вологої бактеріальної целюлози в конвективній сушарці	Суспензія бактеріальної целюлози	345,11 л	-	-	В конвективній сушарці об'ємом заповнення 350 л
		Пластини бактеріальної целюлози	4,163 кг	3%	4,038 кг	В металевих деках
ТП 6 Розрізання пластин бактеріальної целюлози						
5	ТП 6 Розрізання пластин бактеріальної целюлози	Пластини бактеріальної целюлози	4,038 кг	-	-	Розрізаються вручну
		Розрізані пластини бактеріальної целюлози	-	-	252 шт. (по 16 г)	В поліетиленову плівку на склад

РОЗДІЛ 6
СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ
БАКТЕРІАЛЬНОЇ ЦЕЛЮЛОЗИ

Специфікація апаратурного обладнання для одержання бактеріальної целюлози показано в табл.6.1

Таблиця 6.1.

Специфікація обладнання виробництва бактеріальної целюлози

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
3-1	Збірник для 0,1-% розчину гідроксиду натрію	1	Реактор з робочим об'ємом 300 л FMC-300. Виконано зі сталі нержавіючої SUS316L. Оснащений мішалкою та подвійною сорочкою. Китайський виробник «Guangzhou Fuluke Cosmetics Equipment Co., Ltd.» ¹
Д-2	Об'ємно-ваговий дозатор для води знесоленої	1	Об'ємний дозатор з вертикальною шнековою подачею. Максимальний об'єм дози – 60 л. Продуктивність до 20 доз/хв. Похибка дози 2%. Українське виробництво ²
3-2 3-6	Збірник для зберігання культуральної рідини Збірник для нейтралізації та промивання бактеріальної целюлози	2	Реактор з робочим об'ємом 300 л FMC-300. Виконано зі сталі нержавіючої SUS316L. Оснащений мішалкою та подвійною сорочкою. Китайський виробник «Guangzhou Fuluke Cosmetics Equipment Co., Ltd.» ¹
Н-3 Н-7 Н-8	Насос перистальтичний	3	Перистальтичний насос PTL17. Продуктивність від 65 л/год до 390 л/год (в безперервному режимі). Максимальна робоча температура 135 °С. Робочий тиск до 4 бар. Український виробник «Tapflo» ³
Ц-5	Центрифуга для відокремлення бактеріальної целюлози	1	Проточна центрифуга GF/GQ105 з продуктивністю 1600 л/год. Розмір 500x1000x1600 мм. Максимальна швидкість – 19 000 об/хв. Фактична ємність л/год (відповідно до вмісту твердої речовини) – 300-500 л/год. Матеріал - нержавіюча сталь 316L. Виробник «Liaoyang Hongji Machinery Co., Ltd.» ⁴
С-9	Сушильна шафа для одержання пластин бактеріальної целюлози	1	Лоткова сушарка GMP-3. Кількість лотків – 160 шт. Температурний режим – 50 – 300 °С. Полиці та лотки виготовлені з нержавіючої сталі SUS316L ⁵

НУХТ БТЕК 02.02.21 КР ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.		Феценко М.С.		
Перевір.		Карлаш Ю.В.		
Реценз.				
Н. Контр.				
Затверд.		Стабніков В.П.		
РОЗДІЛ 6 СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ БАКТЕРІАЛЬНОЇ ЦЕЛЮЛОЗИ			Лім.	Арк.
				63
			Кафедра БТМ	
			Аркушів	109

Примітка: 1 - https://ru.made-in-china.com/co_fuluke/product_Stainless-Steel-Mixing-Tank-10000-L-Reactor-for-Yogurt_ouhsigegg.html , 2 - <https://prom.ua/ua/p30279606-obemnyj-dozator-vertikalnoj.html>, 3 - <https://tapflo.ua/products/hose-pumps/seriya-ptl#tehnichni-dani>, 4 - <https://www.alibaba.com/product-detail/continuous-flow-centrifuge-60021532084.html> 5 - https://www.alibaba.com/product-detail/Energy-Saving-GMP-Industrial-Tray-Dryer_62033834695.html

РОЗДІЛ 7

ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНОГО ВИДІЛЕННЯ І ОЧИЩЕННЯ БАКТЕРІАЛЬНОЇ ЦЕЛЮЛОЗИ ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ

Для одержання бактеріальної целюлози потрібно передбачити 0,1% розчин гідроксиду натрію, який готується в допоміжних роботах. Після цього починається технологічний процес одержання бактеріальної целюлози.

ДР 1. Приготування 0,1% розчину гідроксиду натрію

На технічних вагах зважують 230 г гідроксиду натрію. Наважку переносять в реактор з робочим об'ємом 230 л (З-1). Після цього, до реактора за допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-2) доливають 229,8 л води знесоленої. Після цього, розчин перемішують близько 10 хв при 50 об/хв до повного розчинення.

ТП 2. Зберігання культуральної рідини

Культуральну рідину зберігають у З-3 при 4-8 °С для подальшого виготовлення бактеріальної целюлози.

ТП 3. Центрифугування культуральної рідини

Культуральну рідину зі З-3 за допомогою перистальтичного насосу (Н-4) подають на проточну центрифугу (Ц-5), де відцентрифугують при режимі швидкості ротора 8000 об/хв. Тривалість процесу становить 20 хв. Бактеріальна целюлоза буде знаходитись на поверхні супернатанту, тому її збирають вручну за допомогою друшляку і переносять до збірника (З-6). Біомасу та супернатант подають на утилізацію.

ТП 4. Промивання бактеріальної целюлози за допомогою 0,1% розчину гідроксиду натрію

До З-6 за допомогою перистальтичного насосу (Н-7) подають 230 л 0,1% розчину гідроксиду натрію від ДР 1. Після чого, збірник закривають, а до

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.21 КР ПЗ</i>					
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ док.м.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>						
<i>Розроб.</i>		<i>Феценко М.С.</i>			<i>РОЗДІЛ 7 ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНОГО ВИДІЛЕННЯ І ОЧИЩЕННЯ БАКТЕРІАЛЬНОЇ ЦЕЛЮЛОЗИ ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ</i>					
<i>Перевір.</i>		<i>Карлаш Ю.В.</i>						<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Реценз.</i>									65	109
<i>Н. Контр.</i>								<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>								

апарату подається гаряча вода. Встановлюється режим перемішування 50 об/хв, температурний режим в 90 °С. Тривалість процесу становить 30 хв. Значення рН має бути 7,0, що контролюється на датчику контролю, що передбачено в конструкції збірника.

ТП 5. Сушіння вологої бактеріальної целюлози в конвективній сушарці

За допомогою перистальтичного насосу (Н-8) нейтралізований розчин бактеріальної целюлози виливають в деко. Після цього, ці деко вручну ставлять у конвективну сушарку (С-9). Встановлюється температура 70 °С, а тривалість процесу становить до 72 годин.

ТП 6. Розрізання пластин бактеріальної целюлози

Після сушіння пластини бактеріальної целюлози дістають з деко та кладуть на стіл для розрізання. Загальна кількість пластин має становити 252 шт. Після цього, пластинки замотують в стрейч-плівку та передають на склад. Вага 1 пластинки має становити близько 16 г, а всієї партії – 4,038 кг. Вологість має становити 2%.

РОЗДІЛ 8

КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА БАКТЕРІАЛЬНОЇ ЦЕЛЮЛОЗИ ДЛЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ

8.1. Визначення концентрації лужного розчину

Для вимірювання концентрацій лугів та кислот найчастіше за все використовують концентратоміри. Функціонально промисловий концентратомір складається з двох блоків: вимірювального електрода та вторинного приладу, який здійснює функції індикації, регулювання та передачі даних. Конструктивно ці блоки можуть бути виконані в одному корпусі (компактне виконання) або мати рознесене виконання, коли електрод за допомогою спеціального кабелю підключається до вторинного приладу [118].



Рис.8.1. Концентратомір для лугу та кислоти SX5150 [119]

На рис.8.1. показано прилад, який може вимірювати концентрацію гідроксиду натрію. Даний прилад дозволяє визначити концентрацію лугу в відсотках, молях на літр, грамах на літр та грамах на сантиметр кубічний. Після аналізу, кількість гідроксиду натрію має становити 0,1% [119].

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.21 КР ПЗ</i>		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Фещенко М.С.			<i>РОЗДІЛ 8 КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА БАКТЕРІАЛЬНОЇ ЦЕЛЮЛОЗИ ДЛЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ</i>		
Перевір.		Карлаш Ю.В.					
Реценз.							
Н. Контр.							
Затверд.		Стабніков В.П.					
					Літ.	Арк.	Аркушів
						67	109
					<i>Кафедра БТМ</i>		

8.2. Визначення ваги бактеріальної целюлози

Вагу легко визначити за допомогою технічних вагів. Для такого завдання підійдуть лабораторні ваги ТВІ-1-0,01, які можуть зважувати до 1 кг з ціною поділки 0,01 г [120]. Після розрізання, 1 пластика бактеріальної целюлози має важити 16 г, а вся серія – 860,7 г.



Рис.8.2. Лабораторні технічні ваги ТВІ-1-0,01 [120]

8.3. Визначення вологості бактеріальної целюлози

Вологість визначають за допомогою аналізатора вологості. Найлегшим та найшвидшим варіантом є ваговий аналізатор [121]. Один з варіантів показано на рис.8.3.



Рис.8.3. Лабораторний аналізатор вологості METRINCO M105MA [121]

Методика ґрунтується на визначення ваги до сушіння зразка та після. Потім, вираховується різниця між першою і другою вагою та вираховується % вологості. Аналізатор METRINCO M105MA дозволяє визначити вологість до 0,1%. Мінімальна вага для визначення - 0,005 г. Максимальний нагрів до 199 °С. Після аналізу вологості зразка бактеріальної целюлози, його вологість має бути 2% [121].

8.4. Визначення ступеню регідратації бактеріальної целюлози

Після вимірювання вологості, той самий зразок занурюють в деіонізовану воду, доки маса повторно гідратованого зразка не залишалася постійною, тобто протягом приблизно 1 години, щоб обчислити коефіцієнт (КР) регідратації БЦ. Після цього часу вологу вагу набряклих мембран вимірювали після видалення надлишку поверхневої води шляхом обережного промокання фільтрувальним папером і при постійному тиску, отримуючи масу після її регідратації. Коефіцієнт регідратації БЦ по відношенню до його початкової маси води після сушіння в аналізаторі визначають за рівнянням [122]:

$$\text{КР} = (\text{регідратована маса} - \text{суха маса}) / (\text{волога маса} - \text{суха маса}) \times 100$$

КР має становити 98%.

РОЗДІЛ 9

ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОДЕРЖАННЯ ПЛАСТИНОК З БАКТЕРІАЛЬНОЇ ЦЕЛЮЛОЗИ З ХЛОРГЕКСИДИНОМ

9.1. Розрахунок річної потужності виробництва пластинок з бактеріальної целюлози з хлоргексидином

За один цикл одержується близько 4,038 кг сухої бактеріальної целюлози. За попередніми розрахунками відомо, що 1 пластинка містить 1,28 г бактеріальної целюлози. Отже, кількість пластинок на 1 серію становить:

$$\frac{4038}{1,28} \approx 3154 \text{ пластинок}$$

Річна потреба у бактеріальній целюлозі складає 40 кг. Тоді, річна потужність фармацевтичного виробництва складатиме:

$$\frac{40 * 1000}{1,28} \approx 31\,250 \text{ пластинок}$$

Знаючи річну потужність та кількість пластинок, яка припадає на 1 цикл розраховуємо кількість серій на рік:

$$\frac{31\,250}{3154} \approx 10 \text{ серій}$$

9.2. Обґрунтування вибору класів чистоти виробничих приміщень, підготовки персоналу, дезінфікуючих засобів, вентиляційного повітря

9.2.1. Вибір класу чистоти та вентиляційного повітря

Пластинки з бактеріальної целюлози з хлоргексидином відносяться до нестерильних препаратів, так як їх застосування проводиться місцево в ротовій порожнині. Для виробництва нестерильних препаратів не встановлені вимоги щодо класу чистоти. Проте зважаючи на подальше застосування та необхідність забезпечення певної мікробної чистоти продукції виробництво таких препаратів має проводитися в умовах забезпечення забруднюючих

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.21 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	РОЗДІЛ 9 ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОДЕРЖАННЯ ПЛАСТИНОК З БАКТЕРІАЛЬНОЇ ЦЕЛЮЛОЗИ	<i>Лім.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розроб.</i>		<i>Фещенко М.С.</i>						
<i>Перевір.</i>		<i>Карлаш Ю.В.</i>					70	109
<i>Реценз.</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						

факторів. Тому при виробництві пропонується використовувати вимоги встановлені для класу чистоти D, як найменшого за класифікацією належної виробничої практики. Клас чистоти D відповідає класу ISO 8. Чисті приміщення класифікуються згідно до стандарту EN ISO 14644-1 та/або ДСТУ ГОСТ ИСО 14644-1:2004 N. Максимально допустима кількість часток встановлена для класу D (ISO 8) в 1 м³ повітря складає 3 520 000 при розмірі часток однаковому чи більшому 0,5 мкм, та 29 000 при розмірі часток однаковому чи більшому 5 мкм в оснащеному стані [123].

Для реалізації необхідного класу чистоти необхідним є забезпечення необхідної швидкості повітрообміну в приміщенні, перепаду тиску, та ефективної системи фільтрації повітря [123].

Швидкість повітрообміну призводить до розрідження простору. Швидкість розрідження в термінах швидкості зміни повітря за годину визначається наступним рівнянням [123]:

$$v = g / (x - s), \text{ де}$$

s – концентрація частинок у припливному повітрі в частках на м³;

v – об'ємна витрата припливного повітря в перерахунку на швидкість повітрообміну за годину

g – внутрішня швидкість генерації в частинках на м³;

x – концентрація регламентованих частинок повітря в приміщенні або зворотнього повітря в частинках на м³.

Зазвичай для забезпечення класу чистоти D, де виробляється нестерильна продукція, мінімально рекомендованим значенням є 20 повітрообмінів за годину. Головним показником на який необхідно опиратися при встановленні повітрообміну є бажаний рівень вмісту частинок в приміщенні та створюваний надлишковий тиск [123].

За типом потоку повітря для класу чистоти D рекомендується використовувати неодноспрямований потік повітря (Рис.9.1), адже в приміщеннях де можливим є значне забруднення із зовнішнього джерела, що є характерним для даного класу приміщень, турбулентність утворювана різним підживлючим

повітрям посилює змішування низьких і високих концентрацій часток утворюючи однорідну концентрацію частинок, прийнятну для процесу [123].

Повітря зазвичай подається в простір одним із двох способів [123]:

Перший використовує припливні дифузори та фільтри HEPA. Фільтр HEPA може бути невід'ємною частиною припливного дифузора або він може бути розташований вище за течією в системі повітропроводу чи в повітрообробнику.

У другому методі припливне повітря попередньо фільтрується перед чистим приміщенням і вводиться в простір через робочі станції з фільтром HEPA.

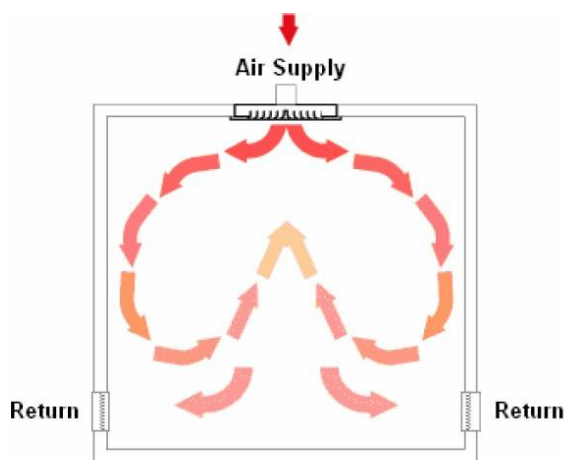


Рис.9.1. Схема непрямого потоку повітря [123]

Система повернення повітря є ще одним важливим компонентом системи розподілу повітря в чистих приміщеннях. Точки повернення повинні бути розташовані низько біля підлоги в стінах і розташовані настільки симетрично, наскільки дозволяє конструкція будівлі. Зворотні решітки мають бути настільки довгими, наскільки це зручно, щоб збільшити збір частинок пилу на більшій площі. Решітки зворотного повітря в основних стерильних зонах повинні бути розташовані так, щоб уникнути мертвих повітряних кишень. Розташовуючи зворотну решітку, слід уникати розміщення решітки біля дверного отвору в сусідню кімнату з нижчим тиском. Це робиться для запобігання створенню зони низького тиску біля дверей, таким чином запобігаючи витоку повітря з кімнати низького тиску в кімнату високого тиску під час відкривання дверей. На кожному стояку зворотного повітря повинні бути передбачені заслінки з ручним

керуванням для керування. Бажано керувати цими заслінками з нестерильних місць [123].

Для мінімізації забруднення в виробничих приміщеннях де відбуваються критичні операції необхідним є **забезпечення перепаду тиску**. Щоб досягти градієнта тиску, необхідно, щоб зони були розташовані так, щоб градієнт був односпрямованим, тобто кімната з найвищим тиском повинна бути розташована в одному кінці, а кімната з найнижчим тиском повинна бути розташована біля протилежного кінця. Цей тип планування може значною мірою спростити балансування системного тиску. Реалізовується градієнт тиску шляхом подачі більшої кількості повітря всередину приміщень з необхідним вищим тиском ніж в зовнішнє приміщення з забезпеченням меншого тиску [123].

Герметизація приміщення також запобігає проникненню забруднень з прилеглих приміщень. Герметичність чистих зон необхідна для запобігання забрудненню продуктів частинками та/або для захисту людей від контакту зі шкідливими речовинами фізичними засобами або вдиханням [123].

Рекомендований мінімальний надлишковий тиск між чистим приміщенням і будь-якою прилеглою зоною з нижчими вимогами до чистоти має становити 0,05 дюйма вод. ст., коли всі входи закриті. Під час роботи об'єкта, коли відкриваються двері, розрахункова різниця значно зменшується, але повітря має продовжувати надходити з простору з вищим тиском у приміщення з нижчим, навіть із зменшеною швидкістю потоку. Щоб підтримувати різницю у воді на рівні 0,05, слід підтримувати швидкість приблизно 4,7 м/с через усі отвори або витоки в кімнаті, такі як щілини навколо дверних отворів. Теоретично фактична необхідна швидкість менша, але на практиці доцільно використовувати 4,7 м/с. Кількість повітря, що повертається, впливає на тиск у приміщенні та залежатиме від процесу, що відбувається в чистому просторі. Для приміщення, де потрібен надлишковий тиск, об'єм зворотного повітря зазвичай на 15% менший, ніж загальний об'єм припливного повітря. Під час розрахунку кількості припливного повітря для різних приміщень слід враховувати технологічне обладнання, наприклад тунелі, які перетинають межі тиску в приміщенні, і відкриті двері,

якщо такі є. Особливо важливим є відпрацьоване повітря від обладнання та витяжок, які можуть бути ввімкнені або вимкнені в різний час протягом періодів зайнятості. Ці коливання необхідно динамічно компенсувати, щоб підтримувати тиск у приміщенні. Щоб підтримувати необхідний баланс, використовуються численні системи з використанням ручних і автоматичних заслінок, блоків керування постійним і змінним об'ємом повітря та складних пристроїв вимірювання потоку повітря. Ці компоненти поєднуються з системами керування та сенсорними пристроями для забезпечення підтримки тиску в приміщенні. Градієнти тиску контролюються манометрами з U-подібною трубкою або магнітоспіральними манометрами. Також можуть бути передбачені системи сигналізації та попередження, коли градієнти тиску порушені [123].

Повітря завжди тече з області високого тиску в область низького тиску. Тиск між двома кімнатами є різницею тиску «DP» [123].

В приміщеннях класу чистоти D, доцільно підтримувати мінімально 25 Па, для мінімізації потрапляння забруднення з атмосфери [123].

Для зменшення забруднення необхідним є [123]:

- швидке відкриття/закриття дверей в приміщеннях (щоб мінімізувати час забруднення). Обидві двері шлюзу не можна відкривати одночасно.
- інтенсивні повітрообміни (великий потік повітря або приміщення з малим об'ємом) для швидшого «відновлення».
- люди мають використовувати менший шлюз (швидший час відновлення = менше часу очікування в шлюзі)

Перепад тиску впливає на двері. Якщо сила надто велика (36 Па), двері можуть не зачинятися повністю або їх важко відкрити. Це особливо важливо для великих складних установок, де може знадобитися багато рівнів тиску. На багатьох підприємствах зараз використовуються розсувні двері, і важливо, щоб ущільнювачі були ретельно розроблені, щоб забезпечити мінімальний витік і належне утримання або тиск. Сигнали тривоги, які звучать для вказівки на втрату тиску, є цінними функціями та важливими при проектуванні критичних зон [123].

Організація потоків матеріалів та людей також має значний вплив на забезпечення необхідної чистоти. Вхід людей та матеріалів до чистого приміщення здійснюється через окремі шлюзи. Конструкція будівлі повинна бути «герметичною» з мінімумом неконтрольованих інфільтратів і протікань. Матеріали, які використовуються в приміщеннях, повинні мати тверде покриття [123].

Належна фільтрація повітря має вирішальне значення для контролю чистих приміщень. У запилених виробничих зонах, таких як подрібнення, гранулювання, нанесення покриттів, таблетування тощо, фільтри не тільки контролюють забруднення атмосфери, але й утримують тверді частки, що утворюються всередині. Атмосферний пил - це суміш сухих частинок, волокон, туману, диму, живих або мертвих організмів. Розмір частинок у повітрі коливається від 0,01 мікрон до 100 мікрон мікрон. Частинки розміром менше 2,5 мікрон вважаються дрібними, а частинки розміром понад 2,5 мікрон вважаються «грубими». Дрібні частки перебувають у повітрі довше і можуть осідати на вертикальних поверхнях. Грубі частинки, продукти механічного стирання, як у відділеннях подрібнення та гранулювання, мають менший час життя в повітрі та піддаються гравітаційному осіданню. Системи кондиціонування повітря у фармацевтичній промисловості мають обробляти як дрібні, так і грубі частки залежно від моделі виробництва, а режим фільтрації має бути відповідним. Повітряні фільтри вловлюють тверді матеріали [123].

Типи повітряних фільтрів (елементи системи вентиляції) [123]

- «грубий» або «чорновий» фільтр для захоплення значного відсотка загальної маси частинок (30%)
- «основний» фільтр для захоплення більшого відсотка маси, а також деяких «невагомих» дрібних частинок (85% - 95%)
- фільтр «тонкої очистки» або «викокоефективний повітряний фільтр» для видалення практично 100% ваги матеріалу та 99,97% або більше всіх частинок.

HEPA (високоєфективний повітряний фільтр) має ефективність видалення частинок розміром 0,3 мкм від 99,97% до 99,997%. Іншими словами, через такий фільтр може пройти лише менше 0,03% усіх частинок розміром 0,3 мікрона або більше. Його використання достатньо для забезпечення кінцевої фільтрації повітря для класу чистоти D [123].

Для продовження терміну служби фільтрів HEPA рекомендується використовувати **попередні фільтри** для фільтрації більшості частинок розміром понад 1 мікрон. Однак здатність цих фільтрів утримувати пил погана. Тому, якщо для застосування потрібна система фільтрації з хорошою пилоутримувальною здатністю, рекомендуються фільтри мішкового типу зі скловолоконною тканиною, щоб забезпечити ефективність у діапазоні від 85% (до 20 мікрон) до 99,97% (до 5 мікрон). Попередні фільтри доступні в різних розмірах з товщиною 6" і 12" і з перепадом тиску в діапазоні від 0,2 до 0,25 дюймів вод. ст. Попередні фільтри зазвичай встановлюються в окремій камері з дверцятами для доступу після виходу вентилятора припливного повітря на відповідному рівні. Для монтажу в таких пленах використовуються звичайні фланцеві фільтри. Має бути зручно очищати та замінювати ці фільтри, не порушуючи решту системи фільтрації [123].

Чорнові фільтри зазвичай встановлюються перед змійовиком охолодження в установці обробки повітря та на входах свіжого повітря. Ефективність цих фільтрів знаходиться в діапазоні 80% до 20 мікрон, і їх можна легко очистити шляхом миття. Фільтри з синтетичним середовищем, розташованим між шарами HDPE товщиною 2 дюйми, дуже підходять для таких застосувань [123].

9.2.2. Підготовка персоналу

Персонал має пройти підготовку перед допуском до роботи. Це включає в себе проходження медичного огляду, інструктажів та навчання. Після успішного підтвердження отриманих знань персонал має отримати допуск від керівництва до роботи на виробництві [124].

Навчання виробничого персоналу включає в себе [124]:

- Принципи та закони GMP

- Концепція забезпечення якості
- Робота з документацією (адміністрування СРП, форми, обробка документів, процедура затвердження, архівування, ведення записів відповідно до GMP)
- Санітарія (зони чистоти, процедури очищення/дезінфекції, процедури вентиляції, поводження з відкритими продуктами, особиста гігієна)
- Інформаційне забезпечення та безпека (Навчання відповідному програмному забезпеченню, авторизований доступ/присвоєння пароля, резервне копіювання даних/безпека даних)
- Маркування (маркування приміщень і складських місць, маркування робочого стану, стану очищення та обслуговування, поводження з відбракованими матеріалами, маркування статусу на контейнерах)
- Зміни та відхилення (сортування, оформлення та документація, причини відхилень, порядок звітування)
- Охорона праці (Захисний одяг, захист від шуму/пилу, транспортування важких вантажів, робочі станції для моніторингу, перевірки стану здоров'я).

Для персоналу мають бути складені детальні плани гігієни. Окрім вимог щодо захисного та робочого одягу, також необхідні правила поведінки для персоналу та відвідувачів. Ці кодекси поведінки мають бути закріплені у формі робочих та організаційних інструкцій [124].

Функція захисного одягу є дуже важливою для забезпечення гігієни та безпеки праці. Функція одягу як бар'єру для захисту продукту спрямована на те, щоб утримувати лусочки шкіри, власну бактеріальну флору тіла, частинки та вологість (піт) і запобігати їх проникненню, наскільки це можливо. Вибір певних кольорів для призначених областей означає, що можна досягти функції сигналу, наприклад, як попередження для обробки чутливих продуктів. Ці завдання необхідно враховувати під час відбору [124].

Одяг необхідно міняти регулярно через встановлені проміжки часу або навіть частіше, якщо він забруднений або пошкоджений. Чим вищий ступінь чистоти та чим більша ймовірність та інтенсивність забруднення (залежно від

виду діяльності), тим частіше необхідно міняти одяг (принаймні 1 раз на тиждень). Ці інтервали базуються на результатах моніторингу, які повинні надати зразки ношеного одягу та свіжого одягу для порівняння [124].

Між одягом чистої кімнати та особистою білизною рекомендується носити проміжний шар одягу. Це може допомогти досягти значного зменшення виділення частинок шкіри на одяг чистої кімнати, а потім у навколишнє середовище. Проміжний одяг повинен бути антистатичним і автоклавним [124].

Рекомендації щодо одягу для класу чистоти D: рекомендується використовувати захисний одяг, закриті манжети на зап'ястях, матеріал має бути бавовняна або змішана тканина (залежно від кількості допустимої кількості частинок або виділення частинок), не рекомендуються зовнішні кишені, змінювання одягу 1-2 рази на тиждень (частіше в разі забруднення), головний убір має бути з флісового матеріалу, що закриває все волосся, та змінюватися щодня, постійне носіння маски на обличчя та бороду, носіння гумових рукавичок, взуття має бути спеціальним виробничим, або чохли, уникання ювелірних прикрас, годинників та косметики [124].

Одяг має бути можливим з мінімальною кількістю забруднень. У чистих приміщеннях слід змінити робочий одяг перед повторним входом [124].

Має бути організована логічна та послідовна процедура переодягання персоналу [124].

9.2.3. Вибір дезінфікуючих засобів

Хімічні дезінфекційні засоби - це речовини або суміші речовин, які використовуються для знищення патогенних мікроорганізмів. Вони широко застосовуються в медичних закладах, громадських місцях, промисловості та побуті [125].

Хімічні дезінфекційні засоби класифікуються за різними ознаками [125].

- За механізмом дії:
 - Окислювачі - діють шляхом окислення мікроорганізмів. До них належать перекис водню, перманганат калію, озон.

- Детергенти - діють шляхом руйнування клітинних мембран мікроорганізмів. До них належать четвертинні амонієві сполуки (ЧАС), фенольні сполуки, спирти.

- Алкілізуючі агенти - діють шляхом об'єднання з білками мікроорганізмів. До них належать хлорні препарати, йодні препарати.

- За тривалістю дії:

- Санітарні дезінфікуючі засоби - діють протягом 30-60 хвилин. Вони використовуються для дезінфекції поверхонь, обладнання, білизни та ін.

- Стерилізуючі засоби - діють протягом 30-60 хвилин. Вони використовуються для стерилізації медичних інструментів, посуду та ін.

- За призначенням:

- Антисептики - застосовуються для обробки шкіри рук, слизових оболонок.

- Дезінфекційні засоби - застосовуються для дезінфекції поверхонь, обладнання, білизни та ін.

Ефективність хімічних дезінфікуючих засобів залежить від багатьох факторів, зокрема:

- Концентрації діючої речовини. Чим вища концентрація діючої речовини, тим більша ефективність дезінфекційного засобу.

- Час експозиції. Чим довше триває контакт дезінфекційного засобу з мікроорганізмами, тим більша ефективність дезінфекції.

- Температура. При підвищеній температурі ефективність дезінфекційних засобів зростає.

- Наявність органічних речовин. Органічні речовини (наприклад, жири, білки) можуть знижувати ефективність дезінфекційних засобів.

Для забезпечення ефективної дезінфекції необхідно дотримуватися наступних правил [125]:

- Використовувати дезінфікуючий засіб відповідно до інструкції виробника.

- Обробляти всі поверхні, на яких можуть знаходитися мікроорганізми.

- Залишати дезінфікуючий засіб на поверхні на час, зазначений в інструкції.

- Після дезінфекції ретельно промити оброблені поверхні водою.

Хімічні дезінфікуючі засоби можуть бути небезпечними для здоров'я людини, тому при їх використанні необхідно дотримуватися наступних правил безпеки [125]:

- Носити захисні рукавички, захисний одяг, окуляри та маску.

- Не допускати потрапляння дезінфікуючих засобів на шкіру, слизові оболонки та в очі.

- У разі потрапляння дезінфікуючого засобу на шкіру, слизові оболонки або в очі негайно промити їх великою кількістю води.

- Зберігати дезінфікуючі засоби в недоступному для дітей місці.

З врахуванням того, що виробництво працює весь рік, маємо обрати 3 різних препарати з різним механізмом дії. Пропонується розглянути хлорвмісні препарати, ЧАС препарати та препарати, що містять перекис водню. Порівняння різних препаратів показано в табл.9.1

Таблиця 9.1.

Вибір дезінфікуючих препаратів для створення орукомукозних пластинок на основі бактеріальної целюлози

Тип	Назва	Ціна за 1 л, грн	Концентрація робочого розчину, %	Ціна за 1 робочого розчину, грн	Джерело
Хлорвмісні	Жавілар плюс	369	0,1	0,037	[126]
	Клінідез	180	0,01	0,002	[127]
	Інцидін Про	489	0,1	0,049	[128]
ЧАС	МАКСИСАН	1260	0,04	0,051	[129]
	Дезекон	540	0,2	0,108	[130]
	ДЕЗЕФЕКТ	468	0,1	0,047	[131]
Що містять перекис водню	Бланідас-А Оксі 35	114,3	0,1	0,011	[132]
	DR OXY–STERIL 15	73,3	0,05	0,004	[133]
	ВІТОКСИД-НІТРО	245	0,5	0,123	[134]

Спираючись на табл.9.1., найвигіднішим серед хлорвмісних препаратів є Клінідез. З ЧАС – ДЕЗЕФЕКТ і з тих, що містять перекис водню - DR OXY–

STERIL 15. Пропонується обрати ці 3 засоби через їх дешевизну та економічність, що буде зменшувати кінцеву вартість лікарського засобу.

9.3. Обґрунтування вибору підготовки первинної упаковки

Первинна упаковка має забезпечувати цілісність продукту та його захист від механічних ушкоджень, впливу вологи, забруднення, мікробного навантаження. Окрім того упаковка має бути зручною для застосування. Зважаючи що форма ЛЗ представлена у вигляді пластинок, то доцільним є використання системи пакування, що складається з 2-х рівнів:

1-й рівень - поліетиленові стрічки на обох сторонах пластинки. Цей рівень пакування не захищає від сонячного світла, вологи, забруднення, проте необхідний для захисту цілісності продукту, що може бути порушена після діставання пластинки споживачем з 2-го рівню пакування. Додатково ця плівка спрощує нанесення пластинки на ясна – знявши шар на першій стороні, споживач може триматися за іншу сторону захищену пластинкою своїми пальцями, не руйнуючи пластинку. Після нанесення на ясна можна легко відділивши плівку з другої сторони.

2-й рівень пакування – алюмінієва комірка з запаяними кінцями для пакування. Цей шар володіє механічною стійкістю та забезпечує захист від зовнішніх умов, адже не пропускає світло, вологу, та інші забруднюючі фактори всередину.

9.4. Обґрунтування вибору підготовки води

Для нестерильних лікарських засобів для орального застосування у виробництві вимагається для застосування у виробництві води очищеної. Згідно СТ-Н МОЗУ 42-3.7:2013 «Вода очищена (water, purified; aqua purificata) Вода для приготування лікарських засобів, крім тих, які мають бути стерильними й апірогенними, якщо немає інших зазначень і дозволів компетентного уповноваженого органу.» [135].

Воду очищену одержують із води питної дистиляцією, іонним обміном, зворотним осмосом або будь-яким іншим підходящим способом [135].

Дистиляція – процес заснований на випаровуванні води з подальшою конденсацією отриманої пари. Цей метод є дороговартісним, хоч і дієвим. Дозволяє видаляти майже всі органічні та неорганічні домішки та одержувати воду дуже високої якості [136].

Позитивні сторони методу: висока ефективність

Негативні сторони методу: дороговартісність

Деіонізація – це іонообмінний процес, що заснований на здатності певних видів синтетичних смол до вибіркової (селективної) адсорбції катіонів або аніонів та вивільнення (обміну) інших іонів [136].

Катіоно-і аніонообмінні смоли використовують для очищення питної води шляхом видалення розчинених у ній іонів.

Позитивні сторони методу: відносно низька вартість, технологічна легкість реалізації.

Негативні сторони методу: даний метод не здатен знизити мікробіологічне навантаження води.

Зворотній осмос – цей метод очищає воду за рахунок примусового пропускання через напівпроникну мембрану у напрямку, зворотному до звичайної осмотичної дифузії. Зазвичай для цього використовують мембрани з розміром пор 0,1-1 нм, які затримують не тільки органічні сполуки, бактерії та віруси, але й 90-99% всіх іонів, що містяться у воді [136].

Позитивні сторони методу: високопродуктивне та енергоекономічне очищення, порівняно невелика вартість

Негативні сторони методу: Істотним недоліком зворотного осмосу є також явище концентраційної поляризації, яке полягає у значному збільшенні концентрації розчиненої речовини в тонкому примембранному шарі порівняно з концентрацією в об'ємі розчину. Недоліком цього процесу є потреба попереднього багатостадійного очищення розчинів від завислих, колоїдних часточок, мікроорганізмів, солей твердості та малорозчинних сполук.

Зважаючи на переваги та недоліки методів отримання води очищеної, найбільш ефективним та економічно доцільним для використання у виробництві пластинок з бактеріальної целюлози з хлоргексидином є метод зворотного осмосу.

Критичні параметри при зберіганні та розподілі води очищеної: температура; рух води та її швидкість; тиск; матеріали трубопроводів та ємності для зберігання [136].

Воду очищену зберігають у закритих ємностях, виготовлених із матеріалів, що забезпечують збереження води в межах вимог чинних нормативних документів та захищають її від сторонніх частинок та мікробіологічних забруднень [136].

Зберігання та транспортування "Води очищеної" відповідно до правил і принципів GMP здійснюється при температурі 20 °C і передбачає використання наступної схеми [136]:

- 1) циркуляційна петля із нержавіючої сталі AISI 316L або полімерних матеріалів (поліпропілен, PVDF);
- 2) накопичувальна ємність еліпсоїдного типу із нержавіючої сталі AISI 316 L або високоякісного полімерного матеріалу із системою душування, фільтром дихання 0,22 мкм;
- 3) УФ-лампи, що стерилізує фільтрацію;
- 4) насосна група з основного та резервного насоса для безперервної циркуляції води.

9.5. Вибір технологічних стадій та операцій, обладнання

До складу препарату будуть входити наступні компоненти: пластинки бактеріальної целюлози у якості мукоадгезивного носія та хлоргексидин як антисептичний агент (активний інгредієнт). У виробництві пропонується використовуватися хлоргексидин біглюконату у вигляді порошку, з чистотою 99%, адже це дозволяє забезпечити стабільність показників якості активного інгредієнту у процесі зберігання до його використання [137].

Отримання пластинок бактеріальної целюлози насичених 2 %-м розчином хлоргексидину біглюконату передбачає наступні стадії:

Стадія 1. Приготування пластинок бактеріальної целюлози.

Операція 1.1. Приготування 20% водного гелю бактеріальної целюлози.

Операція 1.2. Розлив 20% водного гелю бактеріальної целюлози по лоткам.

Операція 1.3. Висушування пластин бактеріальної целюлози.

Стадія 2. 2 %-го розчину хлоргексидину біглюконату

Стадія 3. Насичення пластинок бактеріальної целюлози 2 %-м розчином хлоргексидину біглюконату.

Стадія 4. Сушіння пластинок.

Стадія 5. Розрізання пластинок.

Стадія 6. Пакування, маркування та відвантажування на склад

Для розрахунку кількостей компонентів необхідних для реалізації стадій 1 та 2, необхідно провести наступні розрахунки.

Для насичення пластинок антисептиком передбачається приготування 2 %-го розчину хлоргексидину біглюконату. Площа 1 лотка (460 мм × 640 мм × 45 мм) [138] для насичування бактеріальної целюлози хлоргексидином складає 2944 см². Так як, 1 см² бактеріальної целюлози важить близько 160 мг, тоді на 1 лотку буде розміщено $2944 \times 0,160 = 471$ г бактеріальної целюлози. Бактеріальна целюлоза здатна поглинати до 99 % води, тому при вмісті вологи 0,5%, пластинка може насититися ще на 98,5 % водою. Відповідно 471 г бактеріальної целюлози може поглинути 464 мл води. Таким чином на 1 лоток для насичення антисептиком необхідно приготувати мінімально 464 мл 2-% розчину хлоргексидину біглюконату. Зважаючи на можливі втрати розчину, та необхідність додавання надлишкової кількості для покриття шару бактеріальної целюлози, необхідним є приготування на 10% розчину більше, що складає 510 мл розчину на 1 лоток. Відповідно для приготування 1 серії розміром 4,038 кг бактеріальної целюлози необхідним є її розміщення на 9 лотках (8 повних лотків та 1 неповний лоток). Для 9 лотків необхідно приготувати 4,59 кг 2-% розчину хлоргексидину біглюконату. Для цього необхідно 92 г хлоргексидину біглюконату, та близько 4,498 л води очищеної.

Виходячи з кількості лотків (9 шт), та кількості бактеріальної целюлози на 1 лотку (по 471 г). Можемо розрахувати норму вмісту в 1 лотці приготованого 20 %-го гелю бактеріальної целюлози для першого етапу. Зважаючи що висушена маса в 1 лотку має складати 471 г, тоді в стані 20 % водного гелю маса має скласти 2,355 кг. Аналогічно з 4,038 кг бактеріальної целюлози на 1 серію має вийти 20,19 кг 20-% розчину бактеріальної целюлози, для цього в свою чергу необхідним є додавання 16,152 л води очищеної.

Таким чином для приготування 1 серії, необхідним є наступні кількості компонентів (табл.9.2)

Таблиця 9.2.

Розрахунок кількості реагентів

Назва етапу	Компонент	Кількість для приготування напівпродукту	Кількість напівпродукту
Приготування 20%-го водного гелю бактеріальної целюлози	Бактеріальна целюлоза	4,038 кг	20,19 кг
	Вода очищена	16,152 л	
Приготування 2 % розчину хлоргексидину біглюконату	Хлоргексидин біглюконат	92 г	4,59 кг
	Вода очищена	4,498 л	

Відповідно для приготування 20,19 кг 20 %-го водного гелю бактеріальної целюлози, необхідний реактор-гомогенізатор, здатний привести гель бактеріальної целюлози в однорідну фракцію. Зокрема, для цього може бути використаний реактор – гомогенізатор лабораторний KFT 10 об'ємом 10 л [139].



Рис.9.2. Реактор – гомогенізатор лабораторний KFT 10 об'ємом 10 л [139]

Після цього, маємо висушити одержану масу, для того щоб сфермувати пластинки правильного розміру. Для цього можна використати вакуум-сушильну шафу YZG-1000, за якою були виконані розрахунки [138].



Рис.9.3. Вакуумна сушильна шафа YZG-1000 [138]

Далі, потрібно передбачити реактор-змішувач об'ємом 10 літрів для того, щоб можна було приготувати 2-% розчин хлоргексидину. Для цієї мети можна використати реактор LSR-10L, який оснащений мішалкою та виконаний зі сталі нержавіючої типу AISI 316L. Робочі температури - $-120\sim 260^{\circ}\text{C}$. Швидкість обертів - 0-460 об/хв [140].



Рис.9.4. Реактор-змішувач LSR-10L [140]

Після цього, одержаний розчин розливається по лоткам, де попередньо знаходяться висушені пластини бактеріальної целюлози. Після цього, бактеріальну целюлозу знову сушать в вакуум-сушильній шафі YZG-1000.

Після того, як пластинки висушуються, їх потрібно порізати. Для цього можна використати промисловий різак YC-1625L. Габарити обладнання - 2500×1600 мм [141].



Рис.9.5. Промисловий різак YC-1625L [141]

На такому ж самому різачу розрізаємо поліетиленову плівку, яка буде на 5 мм більша по краям за масу целюлозну пластинку. Отже, треба передбачити 2 різача.

Пластинки передаються на фасувальну машину, де апарат вкладає бактеріальну пластину на поліетиленову плівку, зверху також накриває поліетиленовою плівкою, та вкладає кожну пластинку в алюмінієвий пакет, після чого запаює його. З такою ціллю можна використати фасувальний апарат FRB- 770 І з додатковим роботизованим модулем (на замовлення) по вкладанню пластин на поліетиленові складові. Продуктивність цієї системи складатиме 5 запакованих пластин/хв [142].



Рис.9.6. Промисловий апарат по вкладанню та запайці алюмінієвих пакетів

[142]

Після цього, одержані алюмінієві пакети з пластинками фасують по коробкам. Для цього використовують автоматичну пакувальну машину RQ-ZH-260W. Продуктивність – 10 коробок/хв. Пакувати пропонується по 10 палстинок в одну коробку [143].



Рис.9.7. Автоматична пакувальна лінія RQ-ZH-260W [143]

Далі, одержаний лікарський препарат пакують в групову коробку. Для полегшення процесу пропонується використати автоматичну лінію групового пакування YMKZF01. Його продуктивність – 1-12 групових коробок/хв [144].

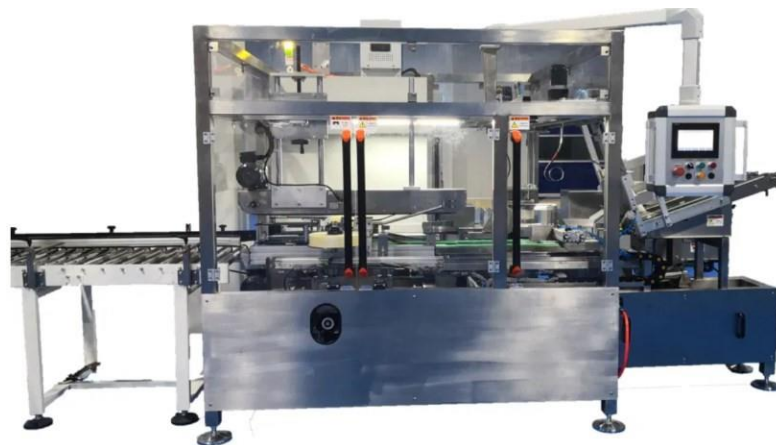


Рис.9.8. Машина групової упаковки YMKZF01 [144]

РОЗДІЛ 10

МАТБАЛАНС НА СЕРІЮ ОРУКОМУКОЗНОГО ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ НА ОСНОВІ БАКТЕРІАЛЬНОЇ ЦЕЛЮЛОЗИ

Варто передбачити втрати, які можуть відбуватись на технологічних стадіях створення лікарського засобу. Перш за все, втрати будуть при зважуванні бактеріальної целюлози, для епереведення її в гідрогель. Враховуючи похибку вагового дозатора, втрати на цій стадії складатимуть 0,5%. Також, втрати можуть з'явитися при переливанні целюлозного гелю до лотків для висушування, через перистальтичний насос, тому також вважатимемо, що тут буде 0,5% втрат. Також, втрати будуть при зважуванні хлоргексидину. Оскільки зважування уже на технічних вагах, похибка була б меншою, але тут ключову роль грає людський фактор, тому втрати на цій стадії також вважатимемо за 0,5%. Хлоргексидин також перекачується в лотки, тому і на цьому етапі буде 0,5% втрат. Останній момент втрат – це розрізання готових бактеріальних пластинок. Оскільки для цього використовується високоточний різак, то й втрати зводяться до мінімуму, тому будемо вважати, що їх кількість складає 1%.

Загальний відсоток втрат – 3%.

Таблиця 10.1.

Матеріальний баланс на серію орумукозного лікарського засобу

Надійшло		Використано	
Назва сировини, матеріалів та напівпродуктів	Кількість	Назва сировини, матеріалів та напівпродуктів	Кількість
1	2	3	4
Зважування бактеріальної целюлози, кг			
Бактеріальна целюлоза	4,038	Бактеріальна целюлоза	4,017
Всього:	4,038	Втрати (0,5%)	<u>0,021</u>
		Всього:	4,038

					НУХТ БТЕК 02.02.21 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Фещенко М.С.			РОЗДІЛ 10 МАТБАЛАНС НА СЕРІЮ ОРУКОМУКОЗНОГО ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ НА ОСНОВІ БАКТЕРІАЛЬНОЇ ЦЕЛЮЛОЗИ			
Перевір.		Карлаш Ю.В.						
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						
					Лім.	Арк.	Аркушів	
						89	109	
					Кафедра БТМ			

Формування гідрогелю бактеріальної целюлози, кг (л)			
Бактеріальна целюлоза	4,017	Гідрогель	20,085
Вода очищена	16,068		
Всього:	20,085	<u>Втрати (0%)</u>	<u>0</u>
		Всього:	20,085
Переливання гідрогелю, л			
Гідрогель	20,085	Гідрогель	19,985
Всього:	20,085	<u>Втрати (0,5%)</u>	<u>0,1</u>
		Всього:	20,085
Сушіння бактеріальної целюлози, кг			
Гідрогель	19,985 л	Суша бактеріальна целюлоза	4 кг
Волога	-15,985 л		
Всього:	4 кг	<u>Втрати (0%)</u>	<u>0</u>
		Всього:	4 кг
Зважування хлоргексидину, г			
Хлоргексидин	92	Хлоргексидин	91,54
Всього:	92	<u>Втрати (0,5%)</u>	<u>0,46</u>
		Всього:	92
Утворення розчину хлоргексидину, (г) л			
Хлоргексидин	91,54 г	Розчин хлоргексидину	4,57 л
Вода очищена	4,476 л		
Всього:	4,57 л	<u>Втрати (0%)</u>	<u>0</u>
		Всього:	4,57 л
Переливання розчину хлоргексидину, л			
Розчин хлоргексидину	4,57	Розчин хлоргексидину	4,547
Всього:	4,57	<u>Втрати (0,5%)</u>	<u>0,023</u>
		Всього:	4,57
Утворення гідрогелю бактеріальної целюлози з розчином хлоргексидину, л			
Суша бактеріальна целюлоза	4 кг	Гідрогель хлоргексидином	8,547 л
Розчин хлоргексидину	4,547 л		
Всього:	8,547 л	<u>Втрати (0%)</u>	<u>0</u>
		Всього:	8,547 л

Сушіння пластин з хлоргекседином			
Гідрогель	8,547 л	Пластини з	4 кг
Волога	- 4,547 л	хлоргекседином	
Всього:	4 кг	<u>Втрати (0%)</u>	<u>0</u>
		Всього:	4 кг
Розрізання пластин			
Пластини хлоргекседином з	4 кг	Пластини хлоргекседином з	3,96 кг
Всього:	4 кг	<u>Втрати (1%)</u>	<u>0,04</u>
		Всього:	4 кг
Готові пластинки по 1,28 г кожна	3094 шт.	Готові пластинки	3094 шт.
Всього:	3094 шт.	<u>Втрати (0%)</u>	<u>0</u>
		Всього:	3094 шт.

РОЗДІЛ 11

СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ ОРУКОМУКОЗНОГО ПРЕПАРАТУ

Специфікація апаратурного обладнання для одержання пластинок на основі бактеріальної целюлози представлена в табл.11.1.

Таблиця 11.1.

Специфікація обладнання виробництва бактеріальної целюлози

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
ПЗ-1	Повітрозабірник	1	Повітрозабірник зі стаді нержавіючої висотою 20 метрів. На вході оснащений металевою оцинкованою сіткою.
Ф-2	Фільтр грубої очистки	1	Панельний фільтр грубої очистки. Клас – G4. Металева оцинкована рама. Продуктивність – 778 м ³ /год. Максимальна робоча температура – 80 °С. Український виробник «ООО "АФФ+"» ¹
В-3	Вентилятор повітря	1	Промисловий вентилятор ВР 287-46. Продуктивність – від 5,7 м ³ /год. Тиск – 2300 - 1670 Па. Габаритні розміри вентилятора (мм) - 914 X 838 X 987. Український виробник «Горизонт» ²
К-4	Калорифер	1	Канальний Електричний Повіронагрівач ССК С-EVN-80-50-60. Продуктивність – 22 м ³ /год. Габаритні розміри (мм) - 500 X 800 X 500. Українське виробництво ³
П-5	Парозволожувач	1	Парозволожувач повітря канальний FANREKO AD100C. Продуктивність – 20 м ³ /год. Максимальний ступінь вологості – 90%. Мінімальний ступінь вологості – 50%. Габаритні розміри (мм) - 720 X 1025 X 650. Український виробник «Fanreko» ⁴
Ф-6	Фільтр тонкого очищення	1	Карманний фільтр тонкого очищення. Клас – F7. Фільтрувальний матеріал – поліпропілен. Максимальна робоча температура – 80 °С. Український виробник «ООО "АФФ+"» ⁵
Ф-7	Фільтр надочищення	1	Панельний HEPA фільтр. Клас – H11. Фільтрувальний матеріал – вологостійке скловолокно. Український виробник «Селтон» ⁶

НУХТ БТЕК 02.02.21 КР ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.		Фещенко М.С.		
Перевір.		Карлаш Ю.В.		
Реценз.				
Н. Контр.				
Затверд.		Стабніков В.П.		
РОЗДІЛ 11 СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ ОРУКОМУКОЗНОГО ПРЕПАРАТУ				
		Лім.	Арк.	Аркушів
			92	109
Кафедра БТМ				

Д-8 Д-18 Д-22	Об'ємно-ваговий дозатор	3	Регулювання потоку рідини від 20 л/годину до 10000 л/год. Робочий тиск від 0.01 до 1.0 МПа. Український виробник «Агротех» ⁷
Ф-9	Піщаний фільтр	1	Фільтр високої продуктивності механічної фільтрації мішочного типу ВФН-1. Продуктивність – 20 м ³ /год. Корпус виконано сталь нержавіюча 316. Виробництво Південної Кореї ⁸
Ф-10	Фільтр вугільний	1	Промисловий вугільний фільтр Ecosoft FK 4272 GL2. Продуктивність – 20-22 м ³ /год. Робочий тиск – 3-8 атм. Український виробник «Ecosoft» ⁹
З-11 З-15	Збірник	2	Реактор об'ємом 1 м ³ LNT-1000. Виконаний зі сталі нержавіючої SUS316L. Швидкість мішалки – 0-3400 об/хв. Оснащений подвійною сорочкою та датчиками температури, рН, перемішування. Китайський виробник «LENO» ¹⁰
Н-12 Н-16	Насос відцентровий	1	Насос Sprut MRS 3. Продуктивність – 5 м ³ /год. Насос Sprut MRS 3 має корпус із чавуну та нержавіючої сталі, вал із нержавіючої сталі. Український виробник «Склад» ¹¹
Ф-13	Фільтр натрій-катионітний	1	Фільтр ФІПа І-0,5-0,6 Na. Продуктивність – до 10 м ³ /год. Робочий тиск – 0,6 МПа. Український виробник «ООО"Котлоенергосервис М.Ю.В."» ¹²
У-14	Установка зворотнього осмосу	1	Зворотній осмос RO-1.00. Продуктивність 1-1,2 м ³ /год. Оснащений 4 мембранами. Японське виробництво ¹³
Д-17	Дозатор сухих речовин	1	Ваговий дозатор ФС-75. Продуктивність – до 50 кг. Точність – до 1 г. Український виробник «ТехноМашСтрой» ¹⁴
З-19	Збірник для утворення гідрогелю	1	Реактор – гомогенізатор лабораторний KFT 10 об'ємом 10 л. Має перемішуючий пристрій зі швидкістю до 12000 об/хв. Оснащений подвійною сорочкою та датчиками температури, рН, перемішування. Український виробник «ООО"Фарм-Контакт"» ¹⁵
Н-20 Н-24	Насос перистальтичний	2	Перистальтичний насос MP-3086.9. Продуктивність до 78 л/год. Оберти 86/хв. Робочий тиск до 1,4 бар. Італійський виробник «DEBEM» ¹⁶
С-21 С-25	Вакуум-сушильна установка	2	Вакуумна сушильна шафа YZG-1000. Виконана зі сталі нержавіючої SUS316L. Має 9 лотків. Китайський виробник «HYWELL» ¹⁷

З-23	Збірник	1	Збірник об'ємом 10 л LSR-10L. Оснащений мішалкою та виконаний зі сталі нержавіючої типу AISI 316L. Робочі температури - 120~260°C. Швидкість обертів - 0-460 об/хв. Китайський виробник «LABOAO» ¹⁸
P-26 P-27	Промисловий різак	2	Промисловий різак YC-1625L. Габарити обладнання - 2500×1600 мм. Продуктивність 20 шт/хв. Китайський виробник «YUCHON» ¹⁹
ПА-28	Промисловий апарат по вкладанню та запайці алюмінієвих пакетів	1	Фасувальний апарат FRB-770 І з додатковим роботизованим модулем (на замовлення) по вкладанню пластин. Продуктивність – 5 пластин/хв. Український виробник «Пакадо» ²⁰
П-29	Автоматична пакувальна лінія	1	Автоматична пакувальна лінія RQ-ZH-260W. Продуктивність – 10 коробок/хв. Габарити (мм): 4300X1100X1550. Китайський виробник «Rich Packing» ²¹
Г-30	Машина групової упаковки	1	Машина групової упаковки YMKZF01. Продуктивність – 1-12 групових коробок/хв. Габарити обладнання – 2700X1800X1800 мм. Китайський виробник «Ketchview» ²²

Примітка: 1 - https://aff.com.ua/panelnyi-filtr-acf-33522548-g4?gclid=CjwKCAiA-vOsBhAAEiwAIWR0TRWbPcwsuxkrzW9f7Wew1Lkx9rgxeqQVhnfCKUXbhkvpnzW9DPwH_hoC5wUQAvD_BwE, 2 - <https://www.vent.com.ua/vr-287-46-5-vc-14-46-5-nzh-ehldv-1501500/>, 3 - <https://bt.rozetka.com.ua/ua/362106963/p362106963/characteristics/>, 4 - https://megateh.com.ua/ua/p906838993-osushitel-vozduha-kanalnyj.html?source=merchant_center&gclid=CjwKCAiA-vOsBhAAEiwAIWR0TeODwP6-o8kMzF6-8sRuDBbGICL5ub8Vjp1vX8hWXbIPtLS6sOi9xRoCdFgQAvD_BwE, 5 - https://aff.com.ua/karmannyi-filtr-apf-585295360-5k-f7?gclid=CjwKCAiA-vOsBhAAEiwAIWR0TeENvotn2qHij2TYzZOOqKTBr0zymDvnEUuapquH7rrUc1SS08QTRoCGpIQAvD_BwE, 6 - https://prom.ua/ua/p577126535-filtr-hepa-n14.html?utm_source=google_product&utm_medium=cpc&utm_content=pla&utm_campaign=KT_cpc_1&gad_source=1&gclid=CjwKCAiA-vOsBhAAEiwAIWR0TZWhNdg0POy29W3vyEohI_hT0JrRurZCDf0xaL7bMh8wqXHsPRJ-hoCKR4QAvD_BwE, 7 - <https://agro-teh.com.ua/ua/p370230625-regulyator-rashoda-vody.html>, 8 - <https://bt.rozetka.com.ua/ua/365476173/p365476173/characteristics/>, 9 - http://xn--80adg3b.com.ua/ecosoft_fk-4272-gl2.html, 10 - <https://russian.alibaba.com/product-detail/LENO-62011807723.html?spm=a2700.7724857.0.0.2679b9347m5QIF>, 11 - <https://sklad1000.com.ua/ua/p1158999878-sprut-mrs-750.html>, 12 - <https://kotloenergo.in.ua/ua/p996200991-filtry-natrij-kationitnye.html>, 13 - <https://ukravateh.com.ua/ua/p531928790-ustanovka-obratnogo-osmosa.html>, 14 - <https://prom.ua/p1252568887-vesovoj-doзатор.html?&primelead=NC41>, 15 - https://www.farmcontact.com.ua/index.php?route=service/service&service_category_id=88&service_id=87, 16 - https://www.debem.com.ua/nasos/peristalticheskie_nasosy/mp-3/, 17 - <https://www.hywellco.com/vacuum-shelf-dryer.html>, 18 - <https://www.laboao.com/products/stainless-steel-reactor/10l-jacketed-stainless-steel-chemical-reactor>, 19 - <https://yuchencut.en.made-in-china.com/product/QOHAFaTMYqkj/China-Industrial-Shape-Cutter-for-Fabric-Fabric-Machine-Cutter-Scarf-Shape.html>, 20 - https://pakado.kiev.ua/ua/p1696369419-konvejernyj-zapajschik-postoyannogo.html?source=merchant_center&utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_term=&utm_content=g&google_ad=652898482520&utm_campaign=%D0%A2%D0%BE%D1%80%D0%B3%D0%BE%D0%B2%D0%B0%20%D0%92%D1%81%D1%96%20%D1%82%D0%BE%D0%B2%D0%B0%D1%80%D0%B8&gad_source=1&gclid=CjwKCAiA-

[yOsBhAAEiwAIWR0Tc7uBAUskL83gbQ6b_b3HBhOUllyiv28eJa6pjCIzzDdGOTWS0NLVxoCGbUQAvD_BwE, 21 - https://rqpfmm.en.made-in-china.com/product/BdltngCvgmAu/China-Automatic-High-Speed-Medicine-Cartoning-Machine-Cartoner-for-Pharma.html,](https://rqpfmm.en.made-in-china.com/product/BdltngCvgmAu/China-Automatic-High-Speed-Medicine-Cartoning-Machine-Cartoner-for-Pharma.html) 22 - <https://ketchview.en.made-in-china.com/product/KZqAXtBvMhWP/China-Automatic-Box-Case-Carton-Packer-Machine-for-Medicine.html>

РОЗДІЛ 12
ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОТРИМАННЯ
ОРУКОМУКОЗНОГО ПРЕПАРАТУ НА ОСНОВІ БАКТЕРІАЛЬНОЇ
ЦЕЛЮЛОЗИ

ДР 1. Підготовка вентиляційного повітря

ДР 1.1. Забір атмосферного повітря

Атмосферне повітря забирається за допомогою труби (ПЗ-1), розташованої на висоті 20 метрів. Тиск повітря в трубі становить 0,01-0,03 атмосфери.

ДР 1.2. Перший ступінь очищення повітря

Фільтри грубого очищення (Ф-2) - це перший ступінь очищення повітря. Вони затримують пил, краплі вологи та деякі мікроорганізми. Коефіцієнт проскоку твердих частинок становить не більше 10%. Повітря, що надходить ззовні, за допомогою вентилятора (В-3) подається на електрокалорифер (К-4). Там воно нагрівається. Якщо потрібно охолодити повітря, то теплообмінник в приточном каналі працює як випарник. Він забирає теплоту у повітря, і воно охолоджується. Теплообмінник-конденсатор при цьому охолоджується. Якщо потрібно нагріти повітря, то теплообмінник в приточном каналі працює як конденсатор. Він віддає теплоту повітрю, і воно нагрівається. Температура має становити 24 °С Нагріте або охоложене повітря надходить на парозволожувач (П-5). Там воно зволожується до ступеня $W=60\%$.

ДР 1.3. Другий ступінь очищення повітря

Після зволоження повітря на парозволожувачі (П-5) воно надходить на фільтр тонкої очистки (Ф-6). Фільтр має велику активну фільтруючу поверхню, яка затримує частинки розміром до 0,1 мікрона. Фільтри тонкого очищення (Ф-6) використовуються для другого ступеня очищення повітря (доочищення). Вони видаляють до 99,97% всіх часток розміром від 0,1 до 0,3 мікрона. Через

					НУХТ БТЕК 02.02.21 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Фещенко М.С.			РОЗДІЛ 12 ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОТРИМАННЯ ОРУКОМУКОЗНОГО ПРЕПАРАТУ НА ОСНОВІ БАКТЕРІАЛЬНОЇ ЦЕЛЮЛОЗИ	Лім.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Карлаш Ю.В.					96	109
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

високу щільність фільтра повітря проходить з великою швидкістю (15-35 м/с). Тому система повинна мати велику площу поверхні, щоб забезпечити достатній потік повітря.

ДР 1.4. Третій ступінь очищення повітря

Відповідно до апаратурної схеми, повітря подається до фільтра типу НЕРА у класі чистоти D (Ф-7). Фільтр затримує 99,97% частинок розміром до 0,3 мікрона.

ДР 2. Одержання води очищеної

Воду одержуємо з метою миття технологічного обладнання, тому маємо передбачити доволі великий об'єм.

ДР 2.1. Механічна фільтрація

Очищення водопровідної води (1600 л) від механічних домішок здійснюється на піщаних фільтрах (Ф-9). За допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-8) на піщаний фільтр (Ф-9) подається 1600 л води водопровідної. Піщані фільтри є одним з найпоширеніших методів очищення води від механічних домішок. Вони складаються з шару піску, який затримує частинки розміром понад 5 мкм.

ДР 2.2. Глибинна фільтрація

Після очищення водопровідної води від більших механічних домішок на піщаних фільтрах (Ф-9) вона проходить додаткове очищення на вугільних фільтрах (Ф-10). Вугільні фільтри мають більш дрібну структуру, ніж піщані, і можуть затримувати частинки розміром 1-3 мкм.

ДР 2.3. Пом'якшення води

Пом'якшення води здійснюється діалізом. Вода подається до збірнику (З- 11). Встановлюється температура кипіння – 100 °С, тривалість кип'ятіння – 1 година. Після цього, не чекаючи охолодження, до води додають 204 г оксиду кальцію та 132 г харчової соди. Суміш перемішують протягом 30 хвилин, після чого, за допомогою відцентрового насосу (Н-12) вода пом'якшена подається на натрій-катіонітний фільтр (Ф-13) для додаткового видалення нерозчинних осадів.

ДР 2.4. Зворотній осмос для видалення зайвих солей

Профільтрована вода потрапляє до установки зворотнього осмосу (ЗО-14). Вода проходить напівпроникні мембрани, звільняючись від зайвих солей. Тривалість фільтрування – 1 година. Одержана вода подається до збірника (З-15). Коли вода буде необхідна, вона подається до обладнання за допомогою перистальтичного насосу (Н-16).

ДР 3. Підготовка бактеріальної целюлози

ДР 3.1. Утворення гідрогелю з бактеріальної целюлози

На ваговому дозаторі (Д-17) зважують 4,035 кг бактеріальної целюлози та подають до збірника (З-19). За допомогою дозатора рідини (Д-18) до збірника подають воду очищену від ДР 2.4. в кількості 16,152 л. Вмикається мішалка та відбувається перемішування до повної гомогенізації та утворення гідрогелю. Тривалість операції – 2 години. Після цього, гідрогель розливають в металеві лотки за допомогою перистальтичного насосу (Н-20) по 2,24 л гідрогелю та передаються на наступну стадію.

ДР 3.2. Сушіння пластин з бактеріальної целюлози

Лотки завантажують до сушильної шафи (С-21) та сушать при температурі 70 °С протягом 24 годин. Після повного висихання, лотки з бактеріальною целюлозою передають на наступну технологічну стадію (ДР 4).

ДР 4. Приготування 2-% розчину хлоргексидину біглюконату

За допомогою дозатора (Д-22) до збірника (З-23) подається вода очищена. На технічних вагах зважують 92 г хлоргексидину біглюконату. Вміст збірника перемішують за допомогою мішалки. Після чого, за допомогою перистальтичного насосу (Н-24) до лотків з бактеріальною целюлозою, виливають вміст реактору, по 510 мл розчину біглюконату. Тримають для просочення добу.

ТП 5. Одержання орукомукозних пластинок з бактеріальної целюлози

ТП 5.1. Сушіння бактеріальної целюлози з хлоргексидином

Лотки завантажують до сушильної шафи (С-25) та сушать при температурі 70 °С протягом 24 годин. Після повного висихання, лотки з бактеріальною целюлозою, оброблених хлоргексидином, передають на наступну технологічну стадію.

ТП 5.2. Розрізання бактеріальної целюлози та поліетиленових плівок

До промислового різача (Р-26) подають пластини обробленої бактеріальної целюлози, де її розрізають по габаритам $84 \pm 0,2$ мм x $95,2 \pm 0,2$ мм. Тривалість процесу – 3 години.

Паралельно, до іншого промислового різача (Р-27) подається поліетиленова плівка, де її розрізають по габаритам $89 \pm 0,2$ мм x $100,2 \pm 0,2$ мм. Тривалість процесу – 3 години.

ТП 5.3. Пакування пластинок в попередню упаковку

Одержані пластинки від ТП 5.2. подаються на конвеєр ПА-28. В окремий бункер завантажуються порізні поліетиленові плівки від ТП 5.2. Автомат кладе бактеріальну пластинку на плівку, а також накриває її плівкою. Після цього, конструкцію автомат вкладає в невеликий алюмінієвий пакет (попередньо промарковані, містять інформацію про назву препарату, вміст діючих речовин, терміну придатності та номеру партії), який потім запаює. Тривалість процесу – 11 годин. Після цього, пакети з пластинками подаються по конвеєру на наступну стадію.

ПМФ 6. Маркування, пакування, фасування

ПМФ 6.1. Пакування алюмінієвих пакетів в коробки

Автомат (П-29) складає картонні заготовки в готові коробки. Після чого, вкладає по 10 запаяних пластинок в коробку разом з інструкцією. Тривалість процесу – 1 година.

ПМФ 6.7. Пакування лікарського препарату в групову тару

До автомату групової тари (Г-30) конвеєром подають готовий лікарський препарат. В кожену коробку вкладається по 20 коробок готового лікарського препарату. Тривалість процесу – 20 хв. Після цього, на кожену коробку наноситься інформація про назву препарату, його серію та терміну придатності. Одержані коробки передаються на склад та зберігаються при температурі не вище 25 °С.

РОЗДІЛ 13

ОПИС ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ НА ОСНОВІ БАКТЕРІАЛЬНОЇ ЦЕЛЮЛОЗИ ЗГІДНО АНД

Ця аналітично нормативна документація поширюється на лікарський засіб, який являє собою пластинки з бактеріальної целюлози просочені 2% розчином хлоргексидину біглюконату.

Склад: 1 пластинка містить 1,26 мл 2%-го розчину хлоргексидину біглюконату (що еквівалентно близько 0,025 мг в сухій формі) та 1,28 г бактеріальної целюлози.

Призначення. Лікування захворювань пародонту.

Форма випуску. По 10 штук в алюмінієвій упаковці, розділені поліетиленовими вкладками.

Специфікація на лікарський засіб наведена в табл.13.1

МЕТОДИ КОНТРОЛЮ

1. Опис. Візуальне визначення.

Пластинки від світло-жовтого до коричневого кольору, прямокутної форми.

2. Прозорість. Візуальне визначення.

Непрозорі пластинки

3. Геометричні розміри.

Вимірювання проводять за допомоги штангенциркулю та лінійки.

Пластинки мають відповідати заданим межам:

Ширина – $84 \pm 0,2$ мм (від 83,8 мм до 84,2 мм)

Довжина – $95,2 \pm 0,2$ мм (від 95,0 мм до 95,7 мм)

Товщина – $1 \pm 0,1$ мм (від 0,9 мм до 1,1 мм)

4. рН

Вимірювання проводять потенціометрично використовуючи рН-метр

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.21 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Фещенко М.С.</i>			РОЗДІЛ 13 ОПИС ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ НА ОСНОВІ БАКТЕРІАЛЬНОЇ ЦЕЛЮЛОЗИ ЗГІДНО АНД	<i>Лім.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Перевір.</i>		<i>Карлаш Ю.В.</i>					100	109
<i>Реценз.</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						

СПЕЦИФІКАЦІЯ

Найменування показників контролю	Допустимі межі	Методи контролю
1	2	3
Опис	Пластинки від світло-жовтого до коричневого кольору, прямокутної форми	За п. 1 АНД, візуально
Прозорість	Непрозорі пластинки	За п. 2 АНД, візуально
Геометричні розміри	Ширина – $84 \pm 0,2$ мм (від 83,8 мм до 84,2 мм) Довжина – $95,2 \pm 0,2$ мм (від 95,0 мм до 95,7 мм) Товщина – $1 \pm 0,1$ мм (від 0,9 мм до 1,1 мм)	За п. 3 АНД.
pH	Від 5,5 до 7,0	За п. 4 АНД.
Середня маса	$16 \pm 0,8$ г (від 15,2 г до 16,8 г)	За п. 5 АНД.
Втрата в масі при висушуванні (Вологість)	Втрата в масі при висушуванні має складати від $2 \pm 0,2$ % (від 1,8 до 2,2 %)	За п. 6 АНД.
Кількісне визначення	Вміст хлоргексидину біглюконату в одній пластинці має знаходитися в межах від 0,02375 мг до 0,02525 мг	За п. 7 АНД.
Ступінь регідрації	Коефіцієнт регідрації (КР) пластинки з бактеріальної целюлози має становити не менше 98 %	За п. 8 АНД.
Мікробіологічна чистота	ТАМС (загальне число аеробних організмів) – не більше 10^2 КУО/мл ТУМС (загальне число дріжджових та плісневих грибів) – не більше 10^1 КУО/мл Відсутність <i>Staphylococcus aureus</i> в 1 мл Відсутність <i>Pseudomonas aeruginosa</i> в 1 мл	За п. 9 АНД, ДФУ/ЄФ 2.6.12, 2.6.13, 5.1.4.

(див. рис.13.1). Перед основним вимірюванням проводять калібрування буферними розчинами з $pH_1=4,01$, $pH_2=7,01$ та $pH_3=10,01$.



pH зразку має бути в межах 5,5 – 7,0.

Рис. 13.1. pH-метр PH800 [145]

5. Середня маса

Вагу легко визначити за допомогою технічних вагів. Для такого завдання підійдуть лабораторні ваги ТВІ-1-0,01, які можуть зважувати до 1 кг з ціною поділки 0,01 г [120].

Вага пластинки має бути $1,28 \pm 0,2$ г.

6. Втрата в масі при висушуванні (вологість)

Визначення вологості бактеріальної целюлози

Вологість визначають за допомогою аналізатора вологості. Найлегшим та найшвидшим варіантом є ваговий аналізатор [146].

Методика ґрунтується на визначення ваги до сушіння зразка та після. Потім, вираховується різниця між першою і другою вагою та вираховується % вологості. Аналізатор METRINCO M105MA дозволяє визначити втрату в масі при висушуванні до 0,1%. Мінімальна вага для визначення - 0,005 г. Максимальний нагрів до 199 °С. Втрата в масі при висушуванні має складати від $2 \pm 0,2$ % (від 1,8 до 2,2 %) [146]

7. Кількісне визначення

Ідентифікацію здійснюють спектрофотометричним методом за довжини хвилі 253 нм, використовуючи однокомпонентний однохвильовий аналіз (спектрометр, див рис.13.3)

Із цією метою готують 2 основних розчини: випробуваний розчин та розчин стандартного зразка. Як компенсаційний розчин використовують розчин з пластинок без хлоргексидину біглюконату аналогічно випробовуваному.

Для приготування випробовуваного розчину через 0,13 г пластинок (точна наважка) поміщають в мірну колбу на 50 мл, додають 20 мл води очищеної Р. та перемішують протягом 1 години. Після того пластинки фідфільтрують через марлю. Об'єм профільтрованого розчину довають до 50 мл водою очищеною Р. 5 мл одержаного розчину переносять у мірну колбу на 20 мл і доводять об'єм водою очищеною до мітки.

Для приготування розчину стандартного зразку близько 50 мл хлоргексидину біглюконату у перерахунку на суху речовину вміщують у мірну колбу на 100 мл і розчиняють у 50 мл води очищеної Р. Об'єм доводять до 100 мл водою очищеною Р. 2 мл одержаного розчину переносять у мірну колбу на 100 мл і доводять об'єм водою очищеною Р до мітки.

Кількісне визначення хлоргексидину біглюконату виконували спектрофотометрично за довжини хвилі 263 нм у кюветі з шаром завтовшки 10 мм. Паралельно вимірювали оптичну густину розчину стандартного зразка. Як розчин порівняння використовували компенсаційний розчин. Вміст хлоргексидину біглюконату розраховували за формулою:

$$X = \frac{A \cdot m \cdot P}{A_0 \cdot 4\,000},$$

де, А – оптична густина випробовуваного розчину, нм;

A_0 – оптична густина розчину стандартного зразка хлоргексидину біглюконату, нм;

m – маса наважки стандартного зразка хлоргексидину біглюконату, мг;

P – масова частка хлоргексидину біглоконату у стандартному зразку, %.



Рис.13.3. Спектрометр UV-2800 [147]

8. Ступінь регідратації

Після аналізу п.6 втрати в масі при висушуванні, зразок занурюють в деіонізовану воду, доки маса повторно гідратованого зразка не залишалася постійною, тобто протягом приблизно 1 години, щоб обчислити коефіцієнт (КР) регідратації зразку. Після цього часу вологу вагу набряклих мембран вимірювали після видалення надлишку поверхневої води шляхом обережного промокання фільтрувальним папером і при постійному тиску, отримуючи масу після її регідратації. Коефіцієнт регідратації по відношенню до його початкової маси води після сушіння в аналізаторі визначають за рівнянням [122]:

$$КР = (регідратована маса - суха маса) / (волога маса - суха маса) \times 100$$

КР має становити не менше 98%.

9. Мікробіологічна чистота

Випробування виконують згідно вимог ДФУ/ЄФ (2.6.12, 2.6.13, 5.1.4).

Підготовка зразку: Пластинку звільняють від захисного покриття та переносять у відповідний об'єм води, що містить інактиватор (лецитин). Енергійно струшують не менше 30 хв.

Для визначення загального числа аеробних мікроорганізмів по 1 мл отриманого зразку 3 висівають на 2 чашки Петри і додають від 15 мл до 20 мл соєво-казеїнового агару температурою не вище 45 °С.

Після застигання агару чашки інкубують при температурі від 30 °С до 35 °С протягом 5 діб.

Для визначення загального числа дріжджових і плісневих грибів по 1 мл отриманого зразку 2 висівають на 2 чашки Петрі і додають від 15 мл до 20 мл Сабуро-декстрозного агару температурою не вище 45° С.

Після застигання агару чашки інкубують при температурі від 20 °С до 25° С протягом 7 діб.

Виконують негативний контроль.

Підрахунок числа КУО в 1 г виконується згідно формули:

$$\sum k \times x / n, \text{ де:}$$

$\sum k$ – кількість колоній на чашках;

n – кількість чашок, що використовується при контролі (для ТАМС – 2, для ТУМС - 2);

x – показник розведення (для ТАМС – 50, для ТУМС - 20)

При відсутності колоній на чашках результати визначають:

в 1 г ТАМС < 10² КУО; ТУМС < 10¹ КУО.

2. Випробування для визначення *Staphylococcus aureus*

Об'єм підготовленого зразку, що відповідає 1 пластинці, пропускають через стерильний мембранний фільтр. При необхідності мембранний фільтр відмивають, використовуючи підходящу кількість промивної води. Мембранний фільтр поміщають в 100 мл соєво-казеїнового бульйону. Інкубують при температурі від 30 °С до 35 °С від 18 до 24 год.

Проводять пересівання на поверхню манітно-сольового агару та інкубують при температурі від 30 °С до 35 °С від 18 до 72 год.

Зростання жовтих або білих колоній грампозитивних коків оточених жовтою зоною (що свідчить про ферментацію маніту), свідчить про можливу наявність *S. aureus* в лікарському засобі, що необхідно підтвердити тестами ідентифікації, наприклад тестом на плазмокоагулазу. *S.aureus* дає позитивну реакцію на плазмокоагулазу.

Лікарський засіб витримує випробування, якщо на поверхні манітно-сольового агару відсутнє зростання колоній, наведених вище, або тести ідентифікації не підтвердили наявність *S. aureus*.

2. Випробування для визначення *Pseudomonas aeruginosa*

Об'єм підготовленого зразку, що відповідає 1 пластинці, пропускають через стерильний мембранний фільтр. При необхідності мембранний фільтр відмивають, використовуючи підходящу кількість промивної води. Мембранний фільтр поміщають в 100 мл соєво-казеїнового бульйону. Інкують при температурі від 30 °С до 35 °С від 18 до 24 год.

Проводять пересівання на поверхню центримідного агару та інкують при температурі від 30 °С до 35 °С від 18 до 72 год.

Зростання колоній свідчить про можливу наявність *P. aeruginosa* в лікарському засобі, що необхідно підтвердити тестами ідентифікації.

Лікарський засіб витримує випробування, якщо на поверхні центримідного агару відсутнє зростання колоній або тести ідентифікації дали негативний результат.

Пакування.

По 10 штук в полімерній упаковці розділені паперовими вкладками.

По 1 полімерній упаковці разом з інструкцією по використанню вкладають у пачку.

Маркування.

На пачці має бути зазначене торгове найменування, склад, спосіб застосування, термін придатності, спосіб застосування, штрих-код, виробник.

Транспортування.

При температурі від 2°С до 8°С у спеціалізованому транспорті.

Зберігання.

Зберігати у недоступному для дітей місці при температурі не вище 25 °С.

Термін придатності.

3 роки. Зберігати не більше одного місяця після першого відкриття полімерної упановки.

Фармакотерапевтична група. Антисептичні та дезінфікуючі засоби.

Код АТС D08A C 02.

Хлоргексидину диглюконат є катіонним бігуанідом. Хлоргексидин блокує аміногрупи клітинних білків. Проникає у внутрішньоклітинні мембрани бактеріальних клітин, осідає на цитоплазмі і змінює функцію мембрани, перешкоджаючи споживанню кисню, що спричиняє зниження рівня АТФ і загибель клітин. Руйнує ДНК і порушує синтез ДНК у мікро організмів. Забезпечує тривалу персистентну антимікробну активність, що перешкоджає розмноженню мікро організмів як мінімум протягом 6 годин після застосування препарату. У присутності крові й інших органічних субстанцій антимікробна активність хлоргексидину диглюконату не знижується.

Через інтактну шкіру не проникає.

Протипоказання. Підвищена чутливість до хлоргексидину. Схильність до алергічних реакцій і алергічних захворювань, дерматити, вірусні захворювання шкіри. Не застосовують дітям до 12 років.

Здатність впливати на швидкість реакції при керуванні авто транспортом або роботі з іншими механізмами. Не впливає.

Діти. Не застосовують дітям до 12 років.

Спосіб застосування та дози. Препарат тільки для зовнішнього та місцевого застосування. При мікротравмах шкіру навколо рани обробляють розчином, після чого на рану накладають серветку, змочену розчином і фіксують її пов'язкою або пластиром.

Передозування. Випадки передозування при зовнішньому застосуванні не відомі.

При помилковому прийомі внутрішньо великої кількості речовини (300мг хлоргексидину, що відповідає 0,5 л 0,05% розчину) настає смерть з ознаками печінково-ниркової недостатності.

При попаданні внутрішньо препарат практично не адсорбується, слід промити шлунок з використанням молока, желатину або сирого яйця.

Побічні ефекти. Препарат, як правило, переноситься добре, проте в окремих випадках, при підвищеній індивідуальній чутливості можливі сухість та свербіж шкіри, дерматити, фото сенсibiliзація.

У разі появи будь-яких небажаних явищ необхідно звернутися до лікаря!

Взаємодія з іншими лікарськими засобами та інші види взаємодій. Для уникнення небезпеки розвитку дерматиту одночасно застосовувати хлоргексидин і препарати йоду не бажано.

Хлоргексидину диглюконат є катіонною речовиною та несумісний з милом та іншими аніонними речовинами (колоїди, гуміарабік, карбоксим етилцелюлоза). Сумісний з препаратами, які містять катіонну групу (бензалконію хлорид, цетримонію бромід).

Етанол посилює дію препарату.

У концентрації 0,05 % хлоргексидину диглюконат несумісний з боратами, карбонатами, хлоридами, цитратами, фосфатами, сульфатами, так як утворюються важкорозчинні осадки.

Термін придатності. 3 роки. *Препарат не можна застосовувати після закінчення терміну придатності, зазначеного на упаковці.*

Умови зберігання. При температурі не вище 25° С в оригінальній упаковці, в недоступному для дітей місці.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Yu T., Andrews G. P., Jones D. S. Mucoadhesion and characterization of mucoadhesive properties. *Mucosal Delivery of Biopharmaceuticals: Biology, Challenges and Strategies*. 2014: 35-58.
2. Романовська І. І., Левицький А. П., Декіна С. С., Овсепян А. М. Мукоадгезивний гель з іммобілізованими лізоцимом і кверцетином. *Мікробіологія і біотехнологія*. 2015, 3(31): 30-40. [https://doi.org/10.18524/2307-4663.2015.3\(31\).53650](https://doi.org/10.18524/2307-4663.2015.3(31).53650)
3. Bassi da Silva J., Ferreira S. B. D. S., de Freitas O., Bruschi M. L. A critical review about methodologies for the analysis of mucoadhesive properties of drug delivery systems. *Drug development and industrial pharmacy*. 2017, 43(7): 1053-1070. <https://doi.org/10.1080/03639045.2017.1294600>
4. Chatterjee B., Amalina N., Sengupta P., Mandal U. K. Mucoadhesive polymers and their mode of action: A recent update. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2017, 7(5): 195-203. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2017.70533>
5. Abeer M. M., Mohd Amin M. C. I., Martin C. A review of bacterial cellulose-based drug delivery systems: their biochemistry, current approaches and future prospects. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2014, 66(8): 1047-1061. <https://doi.org/10.1111/jphp.12234>
6. Hussain Z., Sajjad W., Khan T., Wahid F. Production of bacterial cellulose from industrial wastes: a review. *Cellulose*. 2019, 26: 2895-2911. <https://doi.org/10.1007/s10570-019-02307-1>
7. Cañas-Gutiérrez A., Osorio M., Molina-Ramírez C., Arboleda-Toro D., Castro-Herazo C. Bacterial cellulose: a biomaterial with high potential in dental and oral applications. *Cellulose*. 2020, 27: 9737-9754. <https://doi.org/10.1007/s10570-020-03456-4>
8. Оромукозні лікарські препарати. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/5844/oromukozni-likarski-preparati-rraeparationes-buccales>

9. Біoadгезивний гель PERIO-AID PROTECT: показання, активна дія. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://kristar.ua/info/dentaid/perio-aid-bioadhesive-gel-indications-and-action/>
10. Круть А. Г., Горачук В. В. Стан здоров'я порожнини рота населення окремих регіонів України. *Вісник Вінницького національного медичного університету*. 2022, 26 (2), [https://doi.org/10.31393/reports-vnmedical-2022-26\(2\)-22](https://doi.org/10.31393/reports-vnmedical-2022-26(2)-22)
11. Захворювання пародонту та міри їх профілактики. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://medcryonika.com.ua/ukr/publics/scientific_articles/zabolevania_paradonta.html
12. ГІНГІВІТ. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://stomatidine.com.ua/main-menu/gingivit/#:~:text=%D0%97%D0%B1%D1%83%D0%B4%D0%BD%D0%B8%D0%BA%D0%B0%D0%BC%D0%B8%20%D0%B3%D1%96%D0%BD%D0%B3%D1%96%D0%B2%D1%96%D1%82%D1%83%20%D0%BC%D0%BE%D0%B6%D1%83%D1%82%D1%8C%20%D1%81%D1%82%D0%B0%D1%82%D0%B8%20%D1%96,%2C%20Fusobacterium%20nucleatum%2C%20Prevotella%20intermedia.>
13. ЧОМУ ЛІКУВАТИ ЗУБИ ТАК ДОРОГО І ЯКІ ДОДАТКОВІ ВИТРАТИ ВАРТО ПЕРЕДБАЧИТИ. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.5.ua/dv/info/294367>
14. Aswini K., Gopal N. O., Uthandi S. Optimized culture conditions for bacterial cellulose production by *Acetobacter senegalensis* MA1. *BMC biotechnology*. 2020, 20(1): 1-16. doi: [10.1186/s12896-020-00639-6](https://doi.org/10.1186/s12896-020-00639-6)
15. Chatur P., Shah U., Gani A., Ahmad M., Gani A., Khan Z. Dietary Gums. *Food biopolymers: Structural, functional and nutraceutical properties*. 2021: 187-208. https://doi.org/10.1007/978-3-030-27061-2_8#DOI
16. Esquivel S. V., Bhatt H. N., Diwan R., Habib A., Lee W. Y., Khatun Z., Nurunnabi M. β -Glucan and Fatty Acid Based Mucoadhesive Carrier for Gastrointestinal Tract Specific Local and Sustained Drug Delivery. *Biomolecules*. 2023, 13(5): 768. <https://doi.org/10.3390/biom13050768>

17. Dedloff M. R., Effler C. S., Holban A. M., Gestal M. C. Use of biopolymers in mucosally-administered vaccinations for respiratory disease. *Materials*. 2019, 12(15): 2445. <https://doi.org/10.3390/ma12152445>
18. Kumar R., Islam T., Nurunnabi M. Mucoadhesive carriers for oral drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 2022, 351: 504-559. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.09.024>
19. Thomas S., Rezoagli E., Abidin I. Z., Major I., Murray P., Murphy E. J. β -Glucans from yeast—Immunomodulators from novel waste resources. *Applied Sciences*. 2022, 12(10): 5208. <https://doi.org/10.3390/app12105208>
20. Sajna K. V., Gottumukkala L. D., Sukumaran R. K., Pandey A. White biotechnology in cosmetics. In *Industrial biorefineries & white biotechnology*. Elsevier. 2015. P. 607-652. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63453-5.00020-3>
21. Dhewantara F. X. Cholesterol-lowering effect of beta glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae* in rats. *Scientia pharmaceutica*. 2016, 84(1): 153-165. <https://doi.org/10.3797/scipharm.ISP.2015.07>
22. Hong J. Y., Son S. H., Hong S. P., Yi S. H., Kang S. H., Lee N. K., Paik H. D. Production of β -glucan, glutathione, and glutathione derivatives by probiotic *Saccharomyces cerevisiae* isolated from cucumber jangajji. *LWT*. 2019, 100: 114-118. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.10.048>
23. Chagas B., Farinha I., Galinha C. F., Freitas F., Reis M. A. Chitin–glucan complex production by *Komagataella (Pichia) pastoris*: Impact of cultivation pH and temperature on polymer content and composition. *New biotechnology*. 2014, 31(5): 468-474. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2014.06.005>
24. Xu L., Zhang J. Bacterial glucans: Production, properties, and applications. *Applied microbiology and biotechnology*. 2016, 100(21): 9023-9036. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7836-6>
25. Liu Y., Gu Q., Ofosu F. K., Yu X. Isolation and characterization of curdlan produced by *Agrobacterium* HX1126 using α -lactose as substrate. *International journal of biological macromolecules*. 2015, 81: 498-503. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.08.045>

26. Gao H., Zhang W., Zhang J., Huang Y., Zhang J., Tian J., et al. Methionine biosynthesis pathway genes affect curd lan biosynthesis of *Agrobacterium* sp. CGMCC 11546 via energy regeneration. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2021, 185: 821-831. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.06.189>
27. Xu L., Cheng R., Li J., Wang Y., Zhu B., Ma S., et al. Identification of substituent groups and related genes involved in salean biosynthesis in *Agrobacterium* sp. ZX09. *Applied microbiology and biotechnology*. 2017, 101(2): 585-598. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7814-z>
28. DiCenzo G. C., Debiec K., Krzysztoforski J., Uhrynowski W., Mengoni A., Fagorzi C., et al. Genomic and biotechnological characterization of the heavy-metal resistant, arsenic-oxidizing bacterium *Ensifer* sp. M14. *Genes*. 2018, 9(8): 379. <https://doi.org/10.3390/genes9080379>
29. Hawkins J. P., Geddes B. A., Oresnik I. J. Succinoglycan production contributes to acidic pH tolerance in *Sinorhizobium meliloti* Rm1021. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2017, 30(12): 1009-1019. <https://doi.org/10.1094/MPMI-07-17-0176-R>
30. Andhare P., Delattre C., Pierre G., Michaud P., Pathak H. Characterization and rheological behaviour analysis of the succinoglycan produced by *Rhizobium radiobacter* strain CAS from curd sample. *Food Hydrocolloids*. 2017, 64: 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.10.008>
31. Cheng R., Wang L., Li J., Fu R., Wang S., Zhang J. *In vitro* and *in vivo* anti-inflammatory activity of a succinoglycan Riclin from *Agrobacterium* sp. ZCC3656. *Journal of applied microbiology*. 2019, 127(6): 1716-1726. <https://doi.org/10.1111/jam.14447>
32. Zhang W., Wang X., Qi X., Ren L., Qiang T. Isolation and identification of a bacterial cellulose synthesizing strain from kombucha in different conditions: *Gluconacetobacter xylinus* ZHCJ618. *Food science and biotechnology*. 2018, 27: 705-713. <https://doi.org/10.1007/s10068-018-0303-7>
33. Liu K., Catchmark J. M. Enhanced mechanical properties of bacterial cellulose nanocomposites produced by co-culturing *Gluconacetobacter hansenii* and

- Escherichia coli* under static conditions. *Carbohydrate polymers*. 2019, 219: 12-20. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.04.071>
34. Liu D., Cao Y., Qu R., Gao G., Chen S., Zhang Y., et al. Production of bacterial cellulose hydrogels with tailored crystallinity from *Enterobacter* sp. FY-07 by the controlled expression of colanic acid synthetic genes. *Carbohydrate polymers*. 2019, 207: 563-570. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.12.014>
35. Öner E. T. Microbial production of extracellular polysaccharides from biomass. *Pretreatment techniques for biofuels and biorefineries*. 2013: 35-56. https://doi.org/10.1007/978-3-642-32735-3_2
36. Rizal S., Murhadi M., Kustyawati M. E., Hasanudin U. Growth optimization of *Saccharomyces cerevisiae* and *Rhizopus oligosporus* during fermentation to produce tempeh with high β -glucan content. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*. 2020, 21(6). <https://doi.org/10.13057/biodiv/d210639>
37. Farinha I., Baptista S., Reis M. A., Freitas F. Influence of Dissolved Oxygen Level on Chitin–Glucan Complex and Mannans Production by the Yeast *Pichia pastoris*. *Life*. 2022, 12(2): 161. <https://doi.org/10.3390/life12020161>
38. Abd El Ghany K., Hamouda R., Mahrous H., Abd Elhafez E., Ahmed F. A. H., Hamza H. A. Description of isolated LAB producing β -glucan from Egyptian sources and evaluation of its therapeutic effect. *International Journal of Pharmacology*. 2016, 12(8): 801-811. <https://doi.org/10.3923/ijp.2016.801.811>
39. Yang M., Zhu Y., Li Y., Bao J., Fan X., Qu Y., et al. Production and optimization of curdlan produced by *Pseudomonas* sp. QL212. *International journal of biological macromolecules*. 2016, 89: 25-34. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.04.027>
40. El-Sayed M. H., Arafat H. H., Elsehemy I. A., Basha M. Optimization, purification and physicochemical characterization of curdlan produced by *Paenibacillus* sp. strain NBR-10. *Biosciences Biotechnology Research Asia*. 2016, 13(2): 901-909. <http://dx.doi.org/10.13005/bbra/2113>

41. Jiang L. Effect of nitrogen source on curdlan production by *Alcaligenes faecalis* ATCC 31749. *International journal of biological macromolecules*. 2013, 52: 218-220. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.10.010>
42. Gao H., Xie F., Zhang W., Tian J., Zou C., Jia C., et al. Characterization and improvement of curdlan produced by a high-yield mutant of *Agrobacterium* sp. ATCC 31749 based on whole-genome analysis. *Carbohydrate polymers*. 2020, 245: 116486. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116486>
43. Prakash S., Rajeswari K., Divya P., Ferlin M., Rajeshwari C. T., Vanavil B. Optimization and production of curdlan gum using *Bacillus cereus* pr3 isolated from rhizosphere of leguminous plant. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*. 2018, 48(5): 408-418. <https://doi.org/10.1080/10826068.2018.1451886>
44. Rafigh S. M., Yazdi A. V., Vossoughi M., Safekordi A. A., Ardjmand M. Optimization of culture medium and modeling of curdlan production from *Paenibacillus polymyxa* by RSM and ANN. *International journal of biological macromolecules*. 2014, 70: 463-473. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.07.034>
45. Wan J., Wang Y., Jiang D., Gao H., Yang G., Yang X. Effects of carbon sources on production and properties of curdlan using *Agrobacterium* sp. DH-2. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*. 2020, 50(9): 857-864. <https://doi.org/10.1080/10826068.2020.1777423>
46. Ruiz S. P., Martinez C. O., Noce A. S., Sampaio A. R., Baesso M. L., Matioli G. Biosynthesis of succinoglycan by *Agrobacterium radiobacter* NBRC 12665 immobilized on loofa sponge and cultivated in sugar cane molasses. Structural and rheological characterization of biopolymer. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2015, 122: 15-28. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.08.016>
47. Bakhtiyari M., Moosavi-Nasab M., Askari H. Optimization of succinoglycan hydrocolloid production by *Agrobacterium radiobacter* grown in sugar beet molasses and investigation of its physicochemical characteristics. *Food Hydrocolloids*. 2015, 45: 18-29. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.11.002>
48. Pedroso G. B., Silva L. O., Araujo R. B., Saldanha L. F., Denardi L., Martins A. F. An innovative approach for the biotechnological production of

succinoglycan from rice husks. *Industrial Crops and Products*. 2019, 137: 615-627.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.05.052>

49. Kim S. S., Lee S. Y., Park K. J., Park S. M., An H. J., Hyun J. M., Choi Y. H. *Gluconacetobacter* sp. gel_SEA623-2, bacterial cellulose producing bacterium isolated from citrus fruit juice. *Saudi journal of biological sciences*. 2017, 24(2): 314-319. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.09.031>

50. Lu T., Gao H., Liao B., Wu J., Zhang W., Huang J., et al. Characterization and optimization of production of bacterial cellulose from strain CGMCC 17276 based on whole-genome analysis. *Carbohydrate Polymers*. 2020, 232: 115788. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115788>

51. Rastogi A., Banerjee R. Statistical optimization of bacterial cellulose production by *Leifsonia soli* and its physico-chemical characterization. *Process Biochemistry*. 2020, 91: 297-302. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.12.021>

52. Lima H. L. S., Nascimento E. S., Andrade F. K., Brígida A. I. S., Borges M. D. F., Cassales A. R., et al. Bacterial cellulose production by *Komagataeibacter hansenii* ATCC 23769 using sisal juice-an agroindustry waste. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 2017, 34: 671-680. <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20170343s20150514>

53. Rahman S. S. A., Vaishnavi T., Vidyasri G. S., Sathya K., Priyanka P., Venkatachalam P., Karuppiah S. Production of bacterial cellulose using *Gluconacetobacter kombuchae* immobilized on *Luffa aegyptiaca* support. *Scientific Reports*. 2021, 11(1): 1-15. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82596-4>

54. Jin Y. H., Lee T., Kim J. R., Choi Y. E., Park C. Improved production of bacterial cellulose from waste glycerol through investigation of inhibitory effects of crude glycerol-derived compounds by *Gluconacetobacter xylinus*. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 2019, 75: 158-163. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2019.03.017>

55. Buldum G., Bismarck A., Mantalaris A. Recombinant biosynthesis of bacterial cellulose in genetically modified *Escherichia coli*. *Bioprocess and biosystems engineering*. 2018, 41: 265-279. <https://doi.org/10.1007/s00449-017-1864-1>

56. Son J., Lee K. H., Lee T., Kim H. S., Shin W. H., Oh J. M., et al. Enhanced production of bacterial cellulose from *Miscanthus* as Sustainable feedstock through statistical optimization of culture conditions. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2022, 19(2): 866. <https://doi.org/10.3390/ijerph19020866>
57. Zahan K. A., Nordin K., Mustapha M., Mohd Zairi M. N. Effect of incubation temperature on growth of *Acetobacter xylinum* 0416 and bacterial cellulose production. In *Applied Mechanics and Materials*. Trans Tech Publications Ltd. 2015. P. 3-8. <http://dx.doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMM.815.3>
58. Hyun J. Y., Mahanty B., Kim C. G. Utilization of Makgeolli sludge filtrate (MSF) as low-cost substrate for bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus*. *Applied biochemistry and biotechnology*. 2014, 172: 3748-3760. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-0810-9>
59. Abdeshahian P., Ascencio J. J., Philippini R. R., Antunes F. A. F., de Carvalho A. S., Abdeshahian M., et al. Valorization of lignocellulosic biomass and agri-food processing wastes for production of glucan polymer. *Waste and Biomass Valorization*. 2021, 12: 2915-2931. <https://doi.org/10.1007/s12649-020-01267-z>
60. Mongkontanawat N., Wasikadilok N., Phuangborisut S., Chanawanno T., Khunphutthiraphi T. β -Glucan production of *Saccharomyces cerevisiae* by using malva nut juice production wastewater. *International Food Research Journal*. 2018, 25(2): 499-503.
61. Gozan M. A., Sefriana F., Yemirta Y., Darmawan M. A. Effect of enzymatic hydrolysis and nitrogen on *Saccharomyces cerevisiae* β -glucan production from *Manihot utilissima* and *Maranta arunadinacea* waste. *E-Journal Menara Perkebunan*. 2023, 91(1): 14-24. <https://doi.org/10.22302/iribb.jur.mp.v91i1.508>
62. Bzducha-Wróbel A., Koczoń P., Błażej S., Kozera J., Kieliszek M. Valorization of deproteinated potato juice water into β -glucan preparation of *C. utilis* origin: comparative study of preparations obtained by two isolation methods. *Waste and biomass valorization*. 2020, 11: 3257-3271. <https://doi.org/10.1007/s12649-019-00641-w>

63. Guarnizo A. F. C., Woiciechowski A. L., Nosedá M. D., Torres L. A. Z., Zandona Filho A., Ramos L. P., et al. Pentose-rich hydrolysate from oil palm empty fruit bunches for β -glucan production using *Pichia jadinii* and *Cyberlindnera jadinii*. *Bioresource Technology*. 2021, 320: 124212. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124212>
64. Utama G. L., Suraloka M. P. A., Rialita T., Balia R. L. Antifungal and Aflatoxin-Reducing Activity of β -Glucan Isolated from *Pichia norvegensis* Grown on Tofu Wastewater. *Foods*. 2021, 10(11): 2619. <https://doi.org/10.3390/foods10112619>
65. West T. P., Peterson J. L. Production of the polysaccharide curdlan by an *Agrobacterium* strain grown on a plant biomass hydrolysate. *Canadian journal of microbiology*. 2014, 60(1): 53-56. <http://dx.doi.org/10.1139/cjm-2013-0714>
66. Zhou F., Wu Z., Chen C., Han J., Ai L., Guo B. Exopolysaccharides produced by *Rhizobium radiobacter* S10 in whey and their rheological properties. *Food Hydrocolloids*. 2014, 36: 362-368. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.08.016>
67. Cavka A., Guo X., Tang S. J., Winstrand S., Jönsson L. J., Hong F. Production of bacterial cellulose and enzyme from waste fiber sludge. *Biotechnology for biofuels*. 2013, 6: 1-10. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-25>
68. Gomes F. P., Silva N. H., Trovatti E., Serafim L. S., Duarte M. F., Silvestre A. J., et al. Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter sacchari* using dry olive mill residue. *Biomass and Bioenergy*. 2013, 55: 205-211. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.02.004>
69. Uzyol H. K., Saçan M. T. Bacterial cellulose production by *Komagataeibacter hansenii* using algae-based glucose. *Environmental Science and Pollution Research*. 2017, 24: 11154-11162. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7049-7>
70. Lin D., Lopez-Sanchez P., Li R., Li Z. Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* CGMCC 3917 using only waste beer yeast as nutrient source. *Bioresource Technology*. 2014, 151: 113-119. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.10.052>
71. Li Z., Wang L., Hua J., Jia S., Zhang J., Liu H. Production of nano bacterial cellulose from waste water of candied jujube-processing industry using

Acetobacter xylinum. *Carbohydrate Polymers*. 2015, 120: 115-119.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.11.061>

72. Molina-Ramírez C., Castro C., Zuluaga R., Gañán P. Physical characterization of bacterial cellulose produced by *Komagataeibacter medellinensis* using food supply chain waste and agricultural by-products as alternative low-cost feedstocks. *Journal of Polymers and the Environment*. 2018, 26: 830-837.
<https://doi.org/10.1007/s10924-017-0993-6>

73. Basmaji P., De Olyveira G. M., Kanjou M., Reichert H. Bacterial Cellulose for Several Medicine Areas: Future Insights. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*. 2021, 13(1): 1-23. <https://doi.org/10.4236/jbnb.2022.131001>

74. Aljaberi A., Ardakani A., Khdair A., Abdel-Rahim S. A., Meqdadi E., Ayyash M., Al-Zoubi N. Tableting functionality evaluation of Prosolv Easytab in comparison to physical mixtures of its individual components. *J. Drug Deliv. Sci. Technol*. 2013, 23: 499-504. [https://doi.org/10.1016/S1773-2247\(13\)50072-4](https://doi.org/10.1016/S1773-2247(13)50072-4)

75. Marestoni L. D., Barud H. D. S., Gomes R. J., Catarino R. P. F., Hata N. N. Y., Ressutte J. B., Spinosa W. A. Commercial and potential applications of bacterial cellulose in Brazil: ten years review. *Polímeros*. 2021, 30. <http://dx.doi.org/10.1590/0104-1428.09420>

76. Sims I. M., Ryan J. L., Kim S. H. Inávitro fermentation of prebiotic oligosaccharides by *Bifidobacterium lactis* HN019 and *Lactobacillus* spp. *Anaerobe*. 2014, 25: 11-17. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.11.001>

77. Schaaf S., Schwab R., Gúsgen C., Willms A. Prophylactic onlay mesh implantation during definitive fascial closure after open abdomen therapy (PROMOAT): absorbable or non-absorbable? Methodical description and results of a feasibility study. *Frontiers in Surgery*. 2020, 7: 578565.
<https://doi.org/10.3389/fsurg.2020.578565>

78. Sima P., Vannucci L., Vetvicka V. β -glucans and cholesterol. *International journal of molecular medicine*. 2018, 41(4): 1799-1808.
<https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3411>

79. Zhu F., Du B., Xu B. A critical review on production and industrial applications of beta-glucans. *Food Hydrocolloids*. 2016, 52: 275-288. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.07.003>
80. Majtan J., Jesenak M. β -Glucans: multi-functional modulator of wound healing. *Molecules*. 2018, 23(4): 806. <https://doi.org/10.3390/molecules23040806>
81. Caseiro C., Dias J. N. R., de Andrade Fontes C. M. G., Bule P. From cancer therapy to winemaking: The molecular structure and applications of β -glucans and β -1,3-glucanases. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022, 23(6): 3156. <https://doi.org/10.3390/ijms23063156>
82. Cerletti C., Esposito S., Iacoviello L. Edible mushrooms and beta-glucans: Impact on human health. *Nutrients*. 2021, 13(7): 2195. <https://doi.org/10.3390/nu13072195>
83. Murphy E. J., Rezoagli E., Major I., Rowan N. J., Laffey J. G. β -glucan metabolic and immunomodulatory properties and potential for clinical application. *Journal of Fungi*. 2020, 6(4): 356. <https://doi.org/10.3390/jof6040356>
84. de Oliveira Barud H. G., da Silva R. R., da Silva Barud H., Tercjak A., Gutierrez J., Lustrri W. R., et al. A multipurpose natural and renewable polymer in medical applications: Bacterial cellulose. *Carbohydrate Polymers*. 2016, 153: 406-420. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.07.059>
85. Gorgieva S., Trček J. Bacterial cellulose: Production, modification and perspectives in biomedical applications. *Nanomaterials*. 2019, 9(10): 1352. <https://doi.org/10.3390/nano9101352>
86. Gorgieva S. Bacterial cellulose as a versatile platform for research and development of biomedical materials. *Processes*. 2020, 8(5): 624. <https://doi.org/10.3390/pr8050624>
87. Kinane D. F., Stathopoulou P. G., Papapanou P. N. Periodontal diseases. *Nature reviews Disease primers*. 2017, 3(1): 1-14. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.38>
88. Curtis M. A., Diaz P. I., Van Dyke T. E. The role of the microbiota in periodontal disease. *Periodontology* 2000. 2020, 83(1): 14-25. <https://doi.org/10.1111/prd.12296>

89. Nocini R., Lippi G., Mattiuzzi C. Periodontal disease: the portrait of an epidemic. *J Public Health Emerg.* 2020, 4(10).
<http://dx.doi.org/10.21037/jphe.2020.03.01>
90. Global Microbial and Bacterial Cellulose Market Analysis of New Report 2023-2030. [Електронний ресурс]. Режим доступу:
<https://www.marketwatch.com/press-release/global-microbial-and-bacterial-cellulose-market-analysis-of-new-report-2023-2030-2023-05-10>
91. Microcrystalline Cellulose (MCC) Market by Source Type (Wood-Based, Non-wood based), by Drying Process (Bulk Drying, Spray Drying), by Application (Pharmaceutical, Food and Beverage, Cosmetics and Personal Care, Others): Global Opportunity Analysis and Industry Forecast, 2021-2031. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.alliedmarketresearch.com/microcrystalline-cellulose-market>
92. Global Cellulose Ether & Derivatives Market Size/Share Estimated to Surpass USD 12.79 Billion By 2030, With 9.5% CAGR Rise: Polaris Market Research. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.globenewswire.com/news-release/2023/02/15/2608842/0/en/Global-Cellulose-Ether-Derivatives-Market-Size-Share-Estimated-to-Surpass-USD-12-79-Billion-By-2030-With-9-5-CAGR-Rise-Polaris-Market-Research.html>
93. Оромукозні лікарські препарати. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/5844/oromukozni-likarski-preparati-rraeparationes-buccales>
94. Inoue B. S., Streit S., dos Santos Schneider A. L., Meier M. M. Bioactive bacterial cellulose membrane with prolonged release of chlorhexidine for dental medical application. *International Journal of Biological Macromolecules.* 2020, 148: 1098-1108. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.036>
95. Захворювання пародонту та міри їх профілактики. [Електронний ресурс]. Режим доступу:
https://medcryonika.com.ua/ukr/publics/scientific_articles/zabolevania_paradonta.html

96. [Blanco Parte F. G., Santoso S. P., Chou C. C., Verma V., Wang H. T., Ismadji S., Cheng K. C. Current progress on the production, modification, and applications of bacterial cellulose. *Critical reviews in biotechnology*. 2020, 40\(3\): 397-414. <https://doi.org/10.1080/07388551.2020.1713721>](#)
97. [Listerine Cool Mint Pocketpaks Breath Strips Kills Bad Breath Germs, 24-Strip Pack, 3 Pack. \[Електронний ресурс\]. Режим доступу: <https://www.amazon.com/Listerine-Pocketpaks-Breath-Strips-24-Strip/dp/B000QXH4PK>](#)
98. [ПОЛІМЕРИ. \[Електронний ресурс\]. Режим доступу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/884/polimeri>](#)
99. [Плівка Поліетиленова. \[Електронний ресурс\]. Режим доступу: <https://ecosintez.com.ua/polyetylenovaya-plenka/>](#)
100. [Castro C., Zuluaga R., Álvarez C., Putaux J. L., Caro G., Rojas O. J., et al. Bacterial cellulose produced by a new acid-resistant strain of *Gluconacetobacter* genus. *Carbohydrate polymers*. 2012, 89\(4\): 1033-1037. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.03.045>](#)
101. [Zhong C., Zhang G. C., Liu M., Zheng X. T., Han P. P., Jia S. R. Metabolic flux analysis of *Gluconacetobacter xylinus* for bacterial cellulose production. *Applied microbiology and biotechnology*. 2013, 97\(14\): 6189-6199. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4908-8>](#)
102. [Bagewadi Z. K., Dsouza V., Mulla S. I., Deshpande S. H., Muddapur U. M., Yaraguppi D. A., et al. Structural and functional characterization of bacterial cellulose from *Enterobacter hormaechei* subsp. *steigerwaltii* strain ZKE7. *Cellulose*. 2020, 27\(16\): 9181-9199. <https://doi.org/10.1007/s10570-020-03412-2>](#)
103. [АТОНЗИЛ. \[Електронний ресурс\]. Режим доступу: <https://mozdocs.kiev.ua/likiview.php?id=48715>](#)
104. [ГЕКСАСПРЕЙ. \[Електронний ресурс\]. Режим доступу: <https://mozdocs.kiev.ua/likiview.php?id=42671>](#)

105. Лоросан спрей оромукозний розчин у флаконі 30 мл з насосм-дозатором з розпилювачем. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://apteka911.ua/ua/shop/lorosan-sprey-oromukozn-fl-30ml-p119941>

106. ORAL THIN FILMS – Misconceptions, Advantages & Limitations About an Emerging Drug Delivery System. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://drug-dev.com/oral-thin-films-misconceptions-advantages-limitations-about-an-emerging-drug-delivery-system/>.

107. Inoue B. S., Streit S., dos Santos Schneider A. L., Meier M. M. Bioactive bacterial cellulose membrane with prolonged release of chlorhexidine for dental medical application. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020, 148: 1098-1108. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.036>

108. Украина. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://datacommons.org/place/country/UKR/?utm_medium=explore&mprop=count&opt=Person&hl=ru

109. Хлоргексидин-Віола 100 мл у флаконі. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://violapharm.com/produktsiya/zahvoryuvannya-shkiry-i-rany/antyseptychnyy-zasib/hlorgeksidin-viola-100-ml-u-flakoni/>

110. Стоматидин® (Stomatidin). [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://compendium.com.ua/info/133006/stomatidin-sup-sup-/>

111. What is a periodontal (gum) chart? [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://lakeviewdentist.com/blog/general-dentistry/periodontal-gum-chart/>

112. Adesola U. K., Okhiabigie A. P., Adeola A., Omowunmi A. P., Ayodeji T. O. Evaluation of the attached gingival width and sulcus depth in an adult nigerian population—A pilot study. *J Int Acad Periodontol*. 2018, 20(03): 78-85.

113. Silva N. H., Rodrigues A. F., Almeida I. F., Costa P. C., Rosado C., Neto C. P., et al. Bacterial cellulose membranes as transdermal delivery systems for diclofenac: *in vitro* dissolution and permeation studies. *Carbohydrate polymers*. 2014, 106: 264-269. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.02.014>

114. [Черепанський В. В., Грегірчак Н. М. Особливості технологічного процесу виробництва пробіотичного препарату на основі лактобацил. Наукові праці НУХТ. 2020, 26\(2\): 45-59.](#)
115. [Kamal A. S. M., Mison M. I., Fadil F. The effect of sodium hydroxide concentration on yield and properties of Bacterial Cellulose membranes. In IOP Conference Series: Materials Science and Engineering. 2020, 732 \(1\): 012064.
https://doi.org/10.1088/1757-899X/732/1/012064](#)
116. [Rachtanapun P., Jantrawut P., Klunklin W., Jantanasakulwong K., Phimolsiripol Y., Leksawasdi N., et al. Carboxymethyl bacterial cellulose from nata de coco: Effects of NaOH. Polymers. 2021, 13\(3\): 348.
http://dx.doi.org/10.3390/polym13030348](#)
117. [Сушіння.](#) [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/712/sushinnya>
118. [Концентратоміри.](#) [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.svaltera.ua/catalog/765/>
119. [Лабораторний вимірювач концентрації кислоти або лугу SX5150.](#) [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://spectrolab.com.ua/ua/p1125890906-laboratoryj-izmeritel-kontsentratsii.html>
120. [Електронні лабораторні ваги ТВІ-1-0,01.](#) [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://ukrvesi.com.ua/ua/p335362263-elektronnye-laboratornye-vesy.html>
121. [Лабораторний аналізатор вологості METRINCO M105MA.](#) [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://simvolt.ua/laboratory-analzator-vologost-metrinco-m105ma.html/>
122. [Aswini K., Gopal N. O., Uthandi S. Optimized culture conditions for bacterial cellulose production by *Acetobacter senegalensis* MA1. BMC biotechnology. 2020, 20\(1\): 1-16. doi: 10.1186/s12896-020-00639-6](#)
123. [HVAC Design for Pharmaceutical Facilities - CED Engineering.](#) [Електронний ресурс]. Режим доступу:

<https://www.cedengineering.com/userfiles/M05-006%20-%20HVAC%20Design%20for%20Pharmaceutical%20Facilities%20-%20US.pdf>

124. Personnel. General requirements for personnel. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://gmpua.com/Personnel/index_en.html

125. Ефективні рішення для дезінфекції. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://interdez.com.ua/application/medicina-dezinfekciya>

126. Жавілар плюс (300 таблеток) - хлорвмісний дезінфікуючий засіб. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://lavnamarket.com.ua/ua/p1198425375-zhavilar-plyus-300.html>

127. Клінідез. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://ua.medsolve.com.ua/meditsinskim-uchrezhdeniyam/dezinfektsiya/klinidez-300-tabletok-v-banke-1-kg-s-01-0222.html>

128. Інцидін Про. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://dezplus.com.ua/catalogue/disinfection/pre-sterilized-cleansing/Incidin_Pro.html

129. МАКСИСАН. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://interdez.com.ua/ru/product/maksisan-unvcpd>

130. ДЕЗЕКОН. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://interdez.com.ua/ru/product/dezinficiruyuschee-sredstvo-desekon-om-baltiachemi-kiev>

131. ДЕЗЕФЕКТ. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://interdez.com.ua/ru/product/dezefekt-unvcpd>

132. ДЕЗИНФЕКТАНТ БЛАНИДАС-А ОКСИ 35, 30Л. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.5sec-pro.com.ua/ru/blandas-a-oks-35-30l-35kg.html>

133. DR OXY-STERIL 15. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://victory-plus.in.ua/ua/p1771501536-dezinfitsiruyuschee-sredstvo-oxy.html>

134. ВІТОКСИД-НІТРО. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://prom.ua/ua/p1894929120-vitoksid-nitro.html>

135. Генчева В.І. Великий практикум з медичної та фармацевтичної хімії: методичні рекомендації до практичних занять для здобувачів ступеня вищої

освіти магістра спеціальності «Хімія» освітньо-професійної програми «Хімія». Запоріжжя : Запорізький національний університет, 2022. 30 с; Сорокіна К. Б. Теоретичні основи технології очистки води : конспект лекцій для здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти всіх форм навчання за спеціальністю 194 – Гідротехнічне будівництво, водна інженерія та водні технології) / К. Б. Сорокіна ; Харків. нац. ун-т міськ. госп-ва ім. О. М. Бекетова. – Харків : ХНУМГ ім. О. М. Бекетова, 2021. – 126 с.

136. СТ-Н МОЗУ 42-3.7:2013. Лікарські засоби. Якість води для застосування у фармації.

137. China supply 99% Chlorhexidine digluconate Powder supplier cas:18472-51-0. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://xianquanao.lookchem.com/products/CasNo-18472-51-0-China-supply-99-Chlorhexidine-digluconate-Powder-supplier-cas-18472-51-0-26294899.html>

138. Vacuum Shelf Dryer. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.hywellco.com/vacuum-shelf-dryer.html>

139. Реактор – гомогенізатор лабораторний КФТ 10 об'ємом 10 л. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.farmcontact.com.ua/index.php?route=service/service&service_category_id=88&service_id=87

140. 10L Jacketed Stainless Steel Chemical Reactor. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.laboao.com/products/stainless-steel-reactor/10l-jacketed-stainless-steel-chemical-reactor>

141. Industrial Shape Cutter for Fabric Fabric Machine Cutter Scarf Shape. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://yuchencut.en.made-in-china.com/product/QONafaTMYqkj/China-Industrial-Shape-Cutter-for-Fabric-Fabric-Machine-Cutter-Scarf-Shape.html>

142. Конвеєрний зварювач постійного нагріву. Плоский шов 10мм. Для Реторт пакетів. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://pakado.kiev.ua/ua/p1696369419-konvejernyj-zapajschik-postoyannogo.html?source=merchant_center&utm_source=google&utm_medium=cpc

ДОДАТКИ

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Optimized culture conditions for bacterial cellulose production by *Acetobacter senegalensis* MA1

K. Aswini, N. O. Gopal and Sivakumar Uthandi*

Abstract

Background: Cellulose, the most versatile biomolecule on earth, is available in large quantities from plants. However, cellulose in plants is accompanied by other polymers like hemicellulose, lignin, and pectin. On the other hand, pure cellulose can be produced by some microorganisms, with the most active producer being *Acetobacter xylinum*. *A. senegalensis* is a gram-negative, obligate aerobic, motile coccus, isolated from Mango fruits in Senegal, capable of utilizing a variety of sugars and produce cellulose. Besides, the production is also influenced by other culture conditions. Previously, we isolated and identified *A. senegalensis* MA1, and characterized the bacterial cellulose (BC) produced.

Results: The maximum cellulose production by *A. senegalensis* MA1 was pre-optimized for different parameters like carbon, nitrogen, precursor, polymer additive, pH, temperature, inoculum concentration, and incubation time. Further, the pre-optimized parameters were pooled, and the best combination was analyzed by using Central Composite Design (CCD) of Response Surface Methodology (RSM). Maximum BC production was achieved with glycerol, yeast extract, and PEG 6000 as the best carbon and nitrogen sources, and polymer additive, respectively, at 4.5 pH and an incubation temperature of 33.5 °C. Around 20% of inoculum concentration gave a high yield after 30 days of inoculation. The interactions between culture conditions optimized by CCD included alterations in the composition of the HS medium with 50 mL⁻¹ of glycerol, 7.50 g L⁻¹ of yeast extract at pH 6.0 by incubating at a temperature of 33.5 °C along with 7.76 g L⁻¹ of PEG 6000. This gave a BC yield of wet weight as 469.83 g L⁻¹.

Conclusion: The optimized conditions of growth medium resulted in enhanced production of bacterial cellulose by *A. senegalensis* MA1, which is around 20 times higher than that produced using an unoptimized HS medium. Further, the cellulose produced can be used in food and pharmaceuticals, for producing high-quality paper, wound dressing material, and nanocomposite films for food packaging.

Keywords: Bacterial cellulose, *Acetobacter senegalensis*, Optimization, RSM

Background

Cellulose is a water-insoluble substance that is commonly found in plant cell walls, especially in the stalk, stem, branches, and woody parts of the plant network. The production of cellulose in nature is about 10¹¹–10¹²

tons per year [1]. Cellulose, due to its abundance, has been recognized as an inexhaustible raw material to meet the demand for eco-friendly and biocompatible use [2]. The utilization of easily available raw materials such as sugarcane bagasse, banana, paddy straw, etc., can serve as an alternative source for the production of cellulose derivatives and helps to minimize deforestation [3]. On the other hand, BC is an excellent alternative to plant cellulose, which can be used for manufacturing

* Correspondence: usinikumartnau@gmail.com

Biocatalysis Laboratory, Department of Agricultural Microbiology, Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore, Tamil Nadu 641003, India



© The Author(s). 2020 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

high-end cellulose-based products [4]. BC is produced by various species of bacteria, such as *Gluconacetobacter* (formerly *Acetobacter*), *Agrobacterium*, *Aerobacter*, *Achromobacter*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Sarcina* and *Salmonella*, with the most efficient producer being Gram-negative, acetic acid bacteria, *A. xylinum* [5]. Other cellulose producing bacteria can also be distinguished depending upon their source of carbon [6]. In nature, *Gluconacetobacter xylinus* forms biofilms of cellulose on the surface of fruits and flowers [7]. Intriguingly, *G. xylinus* strains, which are known to be efficient producers of bacterial cellulose, can also produce β -glucosidase [8]. A thermotolerant acetic acid bacterium, isolated in Senegal from mango fruit (*Mangifera indica*), was also found to produce cellulose [9]. Also, *Gluconacetobacter kombuchae* RG3T, isolated from Kombucha tea, displays both cellulose-producing and nitrogen-fixing characteristics [10]. The strain, *Enterobacter amnigenus* GH-1, was subjected to various natural carbon sources like molasses, starch hydrolysate, sugar cane juice, coconut water, coconut milk, pineapple juice, orange juice, and pomegranate juice for growth and cellulose production [11]. Bacterial cellulose microfibrils from non-conventional sources such as agro-industrial residues of pineapple peel and sugar cane juice were produced by *Gluconacetobacter swingsii* [12]. Batch fermentations with the bacterial strain *Komagataeibacter sucrofermentans* using commercial sugars, and crude glycerol were also found to produce the extracellular polysaccharide [13]. The BC produced from the Egyptian *Achromobacter* sp. had pure structure without any other impurities [14].

Due to BC structure that consists of only glucose monomer, it exhibits numerous excellent properties such as unique nanostructure [15], high water holding capacity [16], a high degree of polymerization [17], high mechanical strength [12], and high crystallinity [18]. Owing to its high water holding capacity and tensile strength, microbial cellulose has become an essential raw material for products such as high fidelity acoustic speakers, papers, and dessert foods [19]. Also, BC has been used in the production of pharmaceutical and cosmetic products [20]. Nevertheless, the high production cost, primarily due to ingredients of the medium, is the major obstacle to its wide application. The critical factors affecting the BC production include the fermentation composition, i.e., carbon, nitrogen, and mineral sources used in the medium [21] and the operating conditions such as pH, temperature [22], and dissolved oxygen of the medium [23], inoculation ratio [24], and inoculum age. Though many investigators have reported BC production by various *Acetobacter* spp., the yield could not be improved to a considerable level. In order to enhance the BC yield, the present study was aimed at

determining the optimum conditions viz., carbon, nitrogen, pH, temperature, precursor, polymer additives, inoculum concentration, and incubation period for achieving maximum cellulose production by *A. senegalensis* MA1. Response Surface Methodology (RSM) performed by using Central Composite Design (CCD) was used to optimize various fermentation parameters.

Results

Pre-optimization of culture conditions for cellulose production by *A. senegalensis* MA1

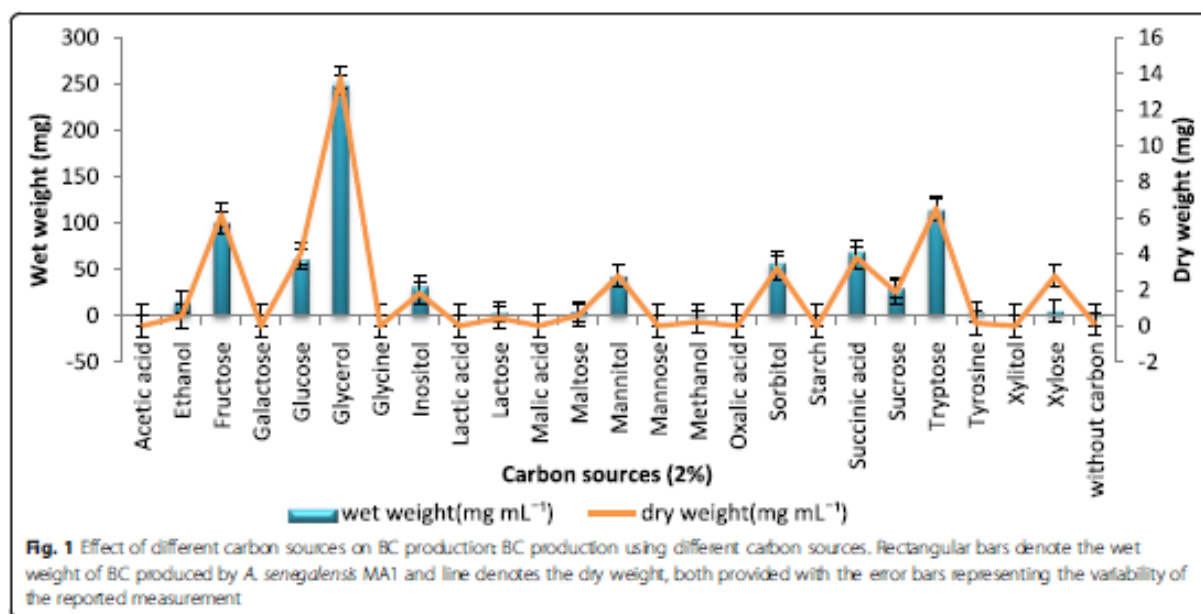
The optimum fermentation conditions, viz., carbon, nitrogen, pH, temperature, precursor and polymer additives, were investigated by measuring the wet and dry weights of the BC mats for maximum production by *A. senegalensis* MA1, and the results are discussed hereunder.

Nutrient sources on BC production

BC production by *A. senegalensis* MA1 was evaluated by supplementing with 24 carbon sources, 14 nitrogen sources, different concentrations of UDP-Glucose (from 10 to 100 ppm), and 12 additives. Among the sources of carbon used, glycerol produced a maximum BC with a wet weight of 248 mg mL⁻¹, yielding a dry weight of 13 mg mL⁻¹ in HS broth (Fig. 1). This was followed by tryptose and fructose, which produced wet weight of 114 mg mL⁻¹ and 100 mg mL⁻¹ and dry weight of 6.54 mg mL⁻¹ and 6.17 mg mL⁻¹ BC, respectively. It was also observed that the carbon sources, viz., acetic acid, galactose, glycine, lactic acid, malic acid, mannose, oxalic acid, starch, and xylitol did not result in the production of cellulose. There was no significant difference in the wet weight of BC produced from glucose, mannitol, sorbitol, and succinic acid.

Among the nitrogen sources used (at 0.5% concentration), yeast extract produced a maximum wet weight of 522 mg mL⁻¹ yielding 52.26 mg mL⁻¹ dry weight of BC in HS broth. Next to yeast extract, the beef extract produced 105 mg mL⁻¹ wet weight yielding 1.89 mg mL⁻¹ dry weight of BC followed by peptone, registering 100 mg mL⁻¹ wet and 1.49 mg mL⁻¹ dry weight. Moreover, BC production was not supported by nitrogen sources like ammonium nitrate, calcium nitrate, sodium azide, sodium nitrate, and urea (Fig. 2).

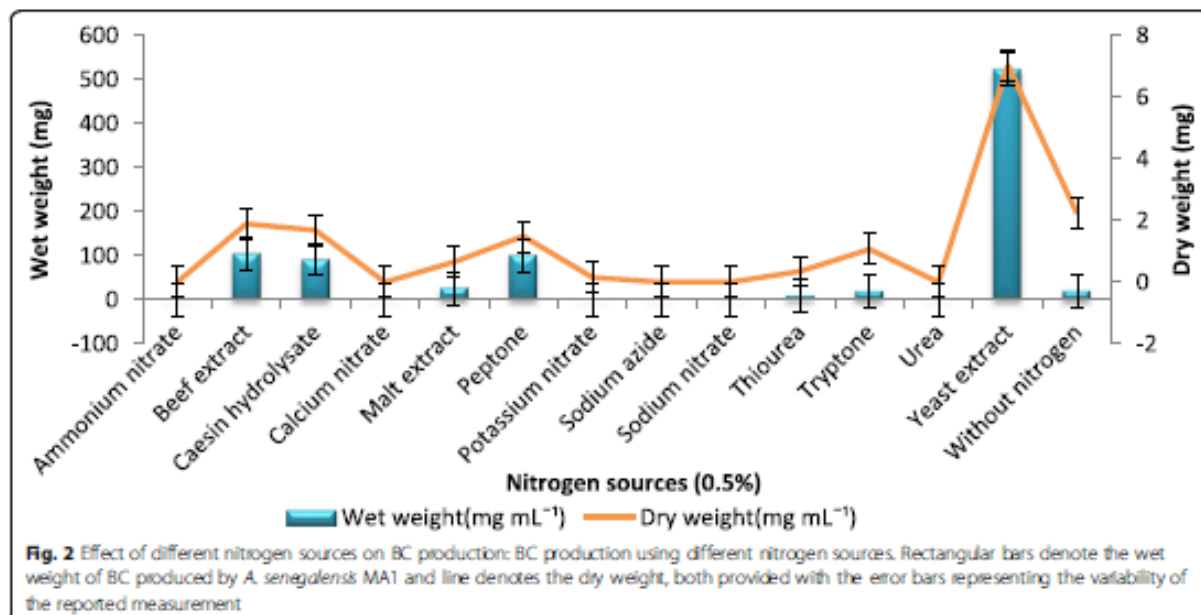
At different concentrations of UDP-Glucose (10 to 100 ppm), the maximum wet weight and dry weight of BC (81 mg mL⁻¹ and 5.27 mg mL⁻¹ in HS broth, respectively) were produced with 100 ppm of UDP-Glucose (Fig. 3). Instead, there were no significant differences in the wet and dry weight of the BC produced from other concentrations. Since UDP-Glc is the precursor for BC biosynthesis, it was used to confirm the influence of its exogenous supply over the production.

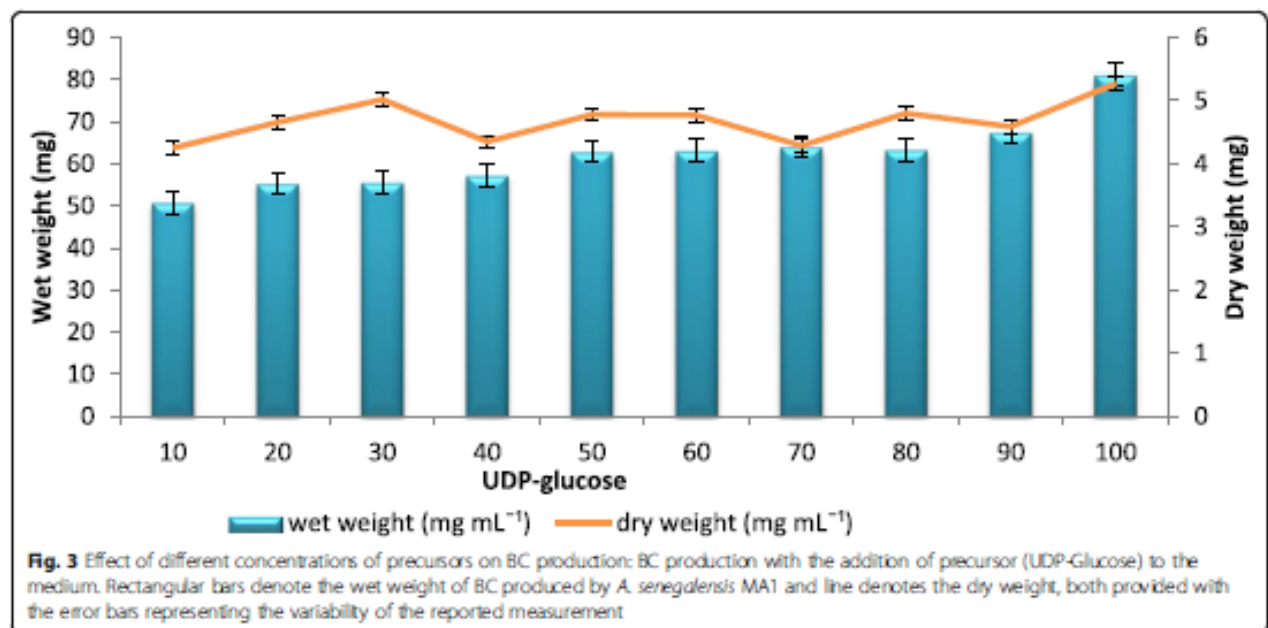


Of the 12 different additives (at 1%) evaluated for the BC production, the addition of PEG 6000 recorded a maximum of 84 mg mL⁻¹ wet weight and 6.65 mg mL⁻¹ dry weight of BC. The addition of lignin, xylan, carboxymethylcellulose, pectin, chitin, agar, and gelatin yielded 67, 64, 52, 52, 49, 48, and 44 mg mL⁻¹ of wet BC in HS broth, respectively (Fig. 4), which was even lesser than the control that did not receive any additives. The least BC production of 16 mg mL⁻¹ wet weight and 2.51 mg mL⁻¹ dry weight was observed with the additive agarose.

Environmental parameters on BC production

The pH values of 2.0, 3.0, 4.0, and 9.0 showed no BC production. The maximum BC production was at pH 4.5 with a wet weight of 98 mg mL⁻¹ and a dry weight of 6.44 mg mL⁻¹, followed by pH 5.0, which produced 85 mg mL⁻¹ wet weight and 5.48 mg mL⁻¹ dry weight of BC in HS broth. At pH 5.5, wet weight of 61 mg mL⁻¹ and 4.74 mg mL⁻¹ dry weight of BC was produced (Fig. 5). Further increase in pH reduced the amount of BC production. There was no





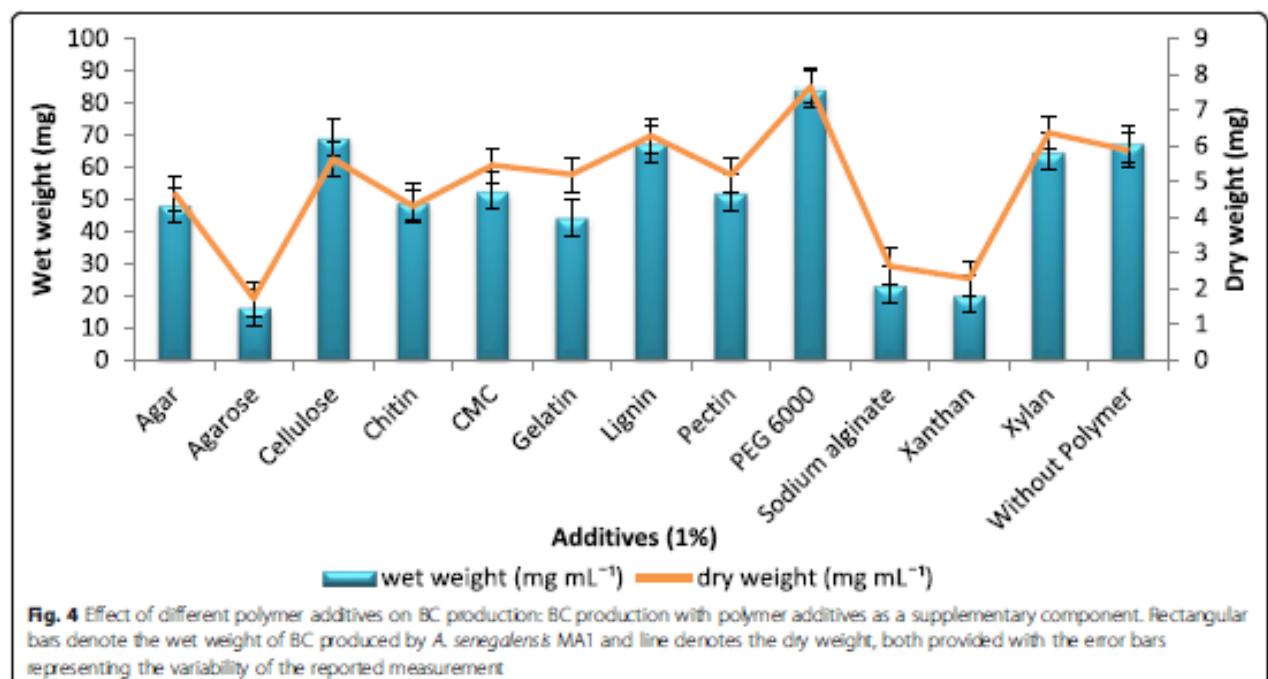
significant difference in the BC production at pH 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, and 8.0.

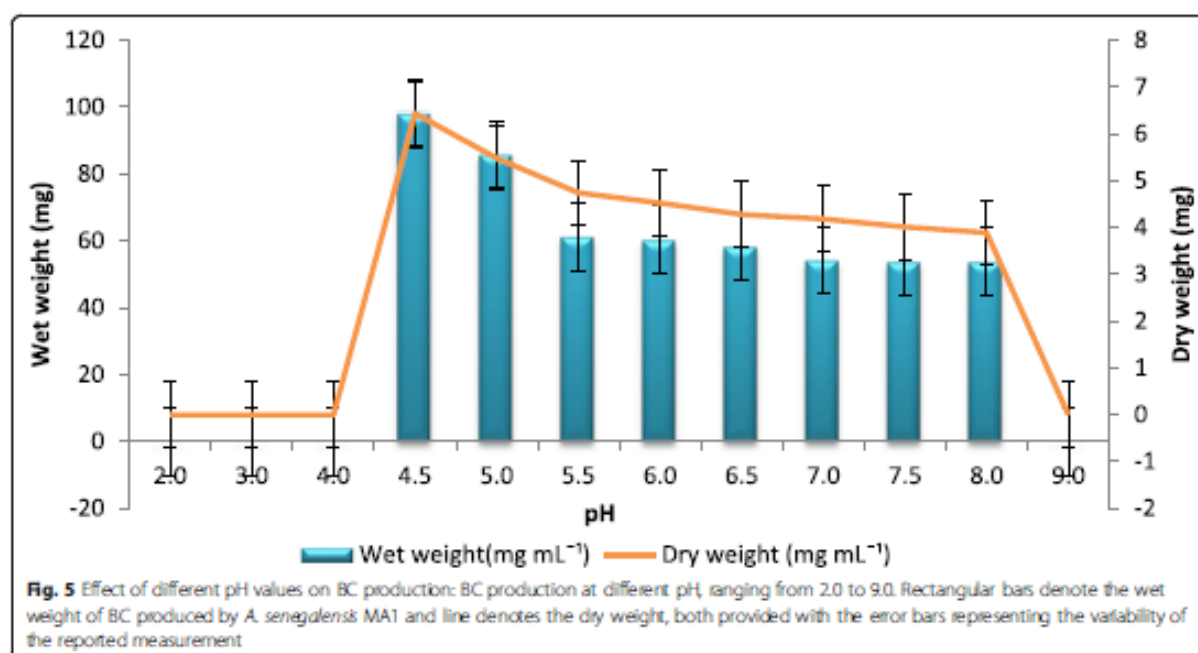
Different temperatures, viz., 25 °C, 27.5 °C, 30 °C, 32.5 °C, 35 °C and 37 °C were evaluated for maximum production of BC by *A. senegalensis* MA1. The maximum BC production was observed at 37 °C of about 57 mg mL⁻¹ of wet weight and 5.21 mg mL⁻¹ of dry weight. Distinct variations in the wet and dry weight of BC were found at different temperatures. At 35 °C, the BC production was

52 mg mL⁻¹ wet and 4.22 mg mL⁻¹ dry weight. As the temperature decreases, the amount of BC produced also gets decreased at 30 °C, 27.5 °C, and 25 °C (Fig. 6).

Inoculum concentration and incubation time on BC production

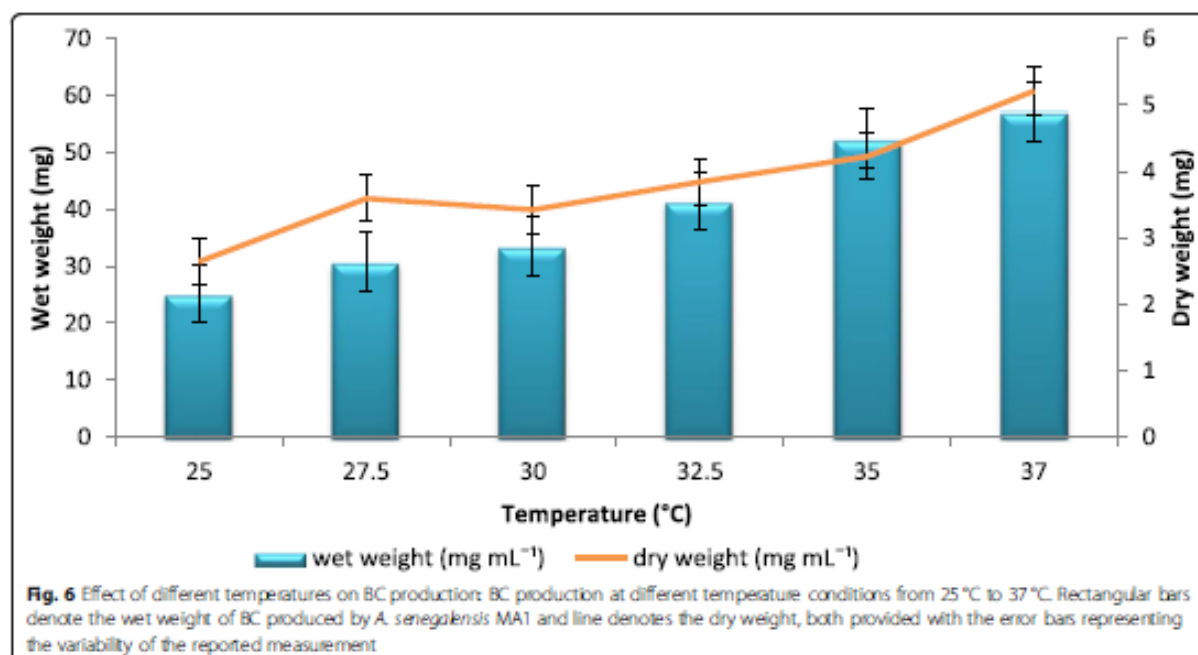
The highest-level of BC production was achieved with 20% of inoculum concentration, i.e., at 0.545 OD, which corresponds to 395 g L⁻¹ of wet weight and 15 g L⁻¹ of

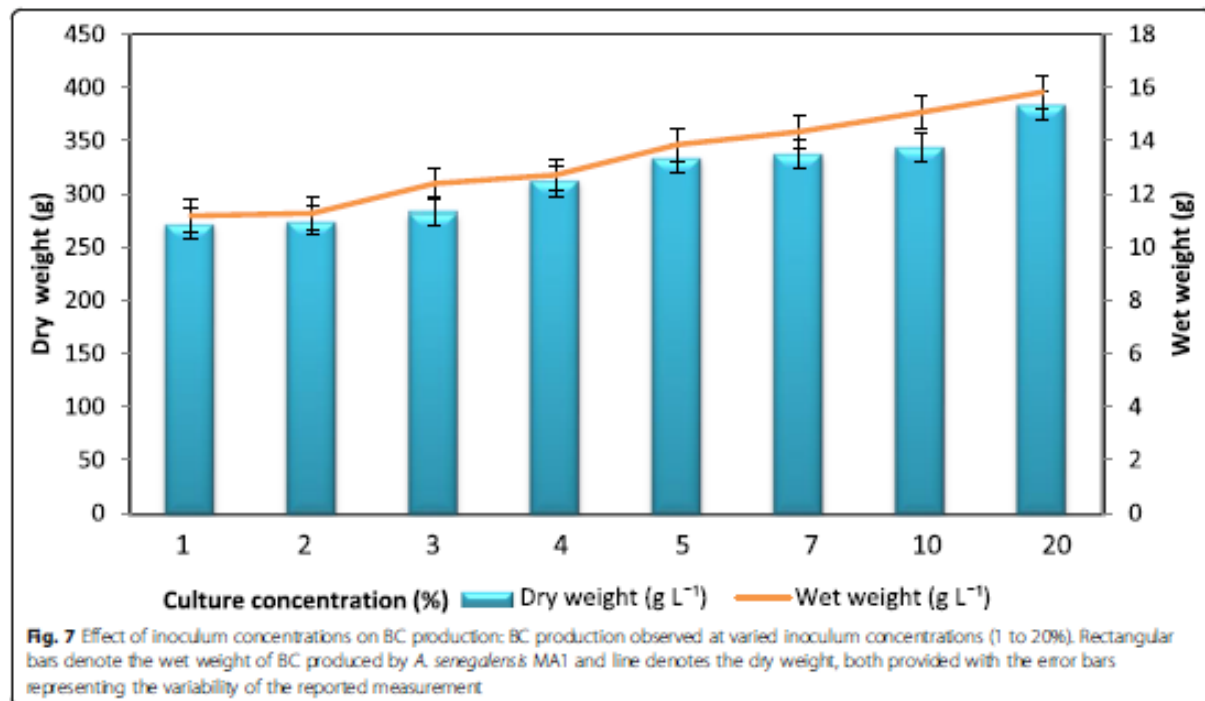




dry weight. Further, at low inoculum concentration, bacterial cellulose yield was also low (Fig. 7). The concentrations of 5, 7, and 10% (0.227, 0.326, and 0.351 OD respectively) did not show a significant difference in the production of BC. The lowest production levels of 279 g L⁻¹ wet weight and 10.91 g L⁻¹ dry weight were obtained with an inoculum concentration of 1% (0.076 OD).

The BC production by *A. senegalensis* MA1 was evaluated by incubating for different periods, and the results implied that maximum production recorded at 30 d after incubation registering about 443 g L⁻¹ of wet weight and 17 g L⁻¹ of dry weight. The BC production gradually increased with an increase in the incubation period, and a rapid increase was found at 15 d after inoculation (Fig. 8).





Optimized culture conditions by response surface methodology (RSM)

The culture conditions like carbon, nitrogen, pH, temperature, precursor, and polymer additives were pre-optimized and evaluated by response surface methodology using Central Composite Design (CCD). The results representing the actual and predicted values of BC

production for optimization are given in Table 1. The design consists of a set of 50 runs each performed at different parameters and different levels. A quadratic design model was used for correlating the independent variables for optimization using the Design-Expert software version 11.0.5. The dependent variable contributes to different sets of independent variables. The *F* value of

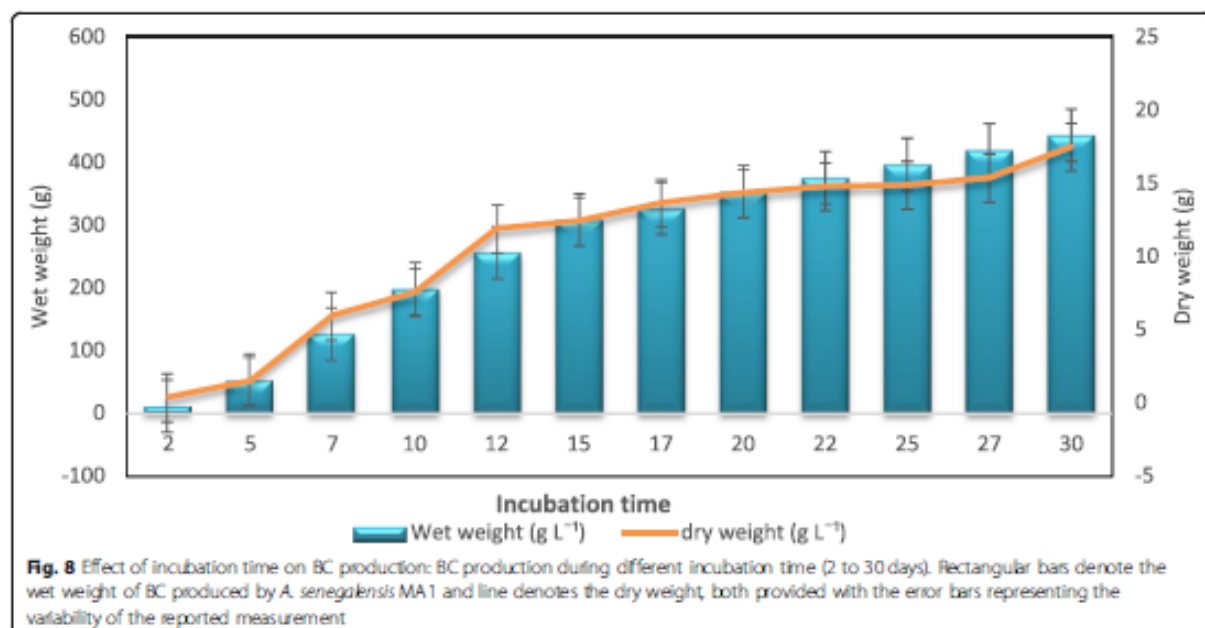


Table 1 Central Composite Design (CCD) matrix for the experimental and predicted values of wet BC produced by *A. senegalensis* MA1

Run Order	A: Carbon (Glycerol) (mL L ⁻¹)	B: Nitrogen (Yeast extract) (g L ⁻¹)	C: pH	D: Temperature (°C)	E: Additives (PEG 6000) (g L ⁻¹)	Actual wet weight of BC (g L ⁻¹)	Predicted wet weight of BC (g L ⁻¹)
1	50.00	7.50	6.00	33.50	1.76	387.83	343.13
2	55.00	5.00	8.00	37.00	1.00	0.00	67.06
3	55.00	10.00	8.00	37.00	3.00	0.00	19.31
4	45.00	10.00	4.00	30.00	3.00	0.00	244.17
5	50.00	7.50	6.00	33.50	3.00	440.46	378.60
6	50.00	7.50	6.00	33.50	3.00	418.89	378.60
7	61.89	7.50	6.00	33.50	3.00	370.50	185.46
8	45.00	10.00	4.00	37.00	1.00	0.00	-53.09
9	45.00	5.00	4.00	37.00	1.00	23.80	28.08
10	55.00	10.00	8.00	30.00	1.00	22.43	148.3
11	55.00	5.00	4.00	30.00	1.00	374.51	507.71
12	55.00	10.00	4.00	37.00	1.00	0.00	92.73
13	55.00	10.00	4.00	37.00	3.00	0.00	80.39
14	50.00	7.50	6.00	33.50	3.00	394.57	378.60
15	50.00	7.50	1.24	33.50	1.00	0.00	-157.43
16	45.00	10.00	4.00	37.00	1.00	0.00	41.20
17	55.00	5.00	4.00	37.00	5.00	0.00	102.59
18	45.00	5.00	4.00	37.00	1.00	0.00	8.60
19	50.00	7.50	6.00	33.50	3.00	436.37	378.60
20	45.00	10.00	8.00	37.00	1.00	0.00	76.91
21	50.0	7.50	6.00	25.18	3.00	430.41	361.36
22	45.00	5.00	4.00	37.00	1.00	0.00	8.60
23	55.00	10.00	4.00	37.00	5.00	0.00	45.14
24	45.00	5.00	4.00	30.00	5.00	415.10	265.81
25	45.00	10.00	6.00	37.00	5.00	388.63	450.91
26	55.00	5.00	8.00	30.00	5.00	0.00	182.28
27	45.00	5.00	4.00	30.00	3.00	0.00	248.71
28	45.00	10.00	4.00	30.00	1.00	334.97	92.48
29	50.00	7.50	6.00	41.82	3.00	0.00	-118.12
30	50.00	7.50	6.00	33.50	7.76	469.83	432.62
31	50.00	13.45	6.00	33.50	3.00	456.57	328.06
32	45.00	5.00	4.00	37.00	1.76	0.00	28.08
33	45.00	5.00	8.00	30.00	1.00	363.41	320.58
34	55.00	5.00	4.00	37.00	1.00	386.85	373.54
35	55.00	10.00	4.00	30.00	1.00	383.61	234.12
36	45.00	10.00	4.00	30.00	5.00	396.92	372.95
37	55.00	5.00	4.00	30.00	5.00	293.88	228.08
38	55.00	5.00	8.00	30.00	1.00	383.89	271.63
39	55.00	5.00	8.00	37.00	3.00	0.00	38.18
40	50.00	7.50	10.76	33.50	3.00	0.00	-18.73
41	45.00	5.00	8.00	37.00	1.00	97.29	105.56
42	55.00	10.00	4.00	30.00	1.00	0.00	230.50

Table 1 Central Composite Design (CCD) matrix for the experimental and predicted values of wet BC produced by *A. senegalensis* MA1 (Continued)

Run Order	A: Carbon (Glycerol)	B: Nitrogen (Yeast extract)	C: pH	D: Temperature	E: Additives (PEG 6000)	Actual wet weight of BC	Predicted wet weight of BC
43	50.00	7.50	6.00	33.50	3.00	378.42	378.60
44	55.00	10.00	8.00	37.00	1.76	000	-29.4
45	50.00	1.55	6.00	33.50	3.00	414.57	355.91
46	38.11	7.50	6.00	33.50	3.00	399.43	397.29
47	50.00	7.50	6.00	33.50	3.00	408.08	378.68
48	45.00	10.00	4.00	30.00	1.00	000	92.48
49	50.00	7.50	6.00	33.50	1.00	297.98	343.13
50	50.00	7.50	6.00	33.50	3.00	457.81	378.60

3.77 for the model implies that the model is robust, and there is only 0.06% chance that such a large *F* value can occur due to noise. Likewise, the *R*² value of 0.7221 suggested that the model is acceptable with an adequate precision of 7.5023, which indicates a desirable signal to noise ratio.

On the other hand, a *p* value less than 0.0500 indicates that the model terms are significant, and the results analyzed by ANOVA for the quadratic model are shown in Table 2. The model's *F* value was calculated as a ratio of mean square regression to the mean square residual, and

the *p* values were used to check the significance of coefficients, which represents the expected change in response per unit change in factor value keeping other factors constant (Table 3). The variation inflation factors (VIFs) denote how the coefficients of regression variance are inflated when the predictor variables are not linearly related, and VIFs less than 10 are tolerable. The final equation for BC production by *A. senegalensis* MA1 in terms of coded factors was given as:

$$\text{Wet weight of BC} = + 378.60 - 44.53 * A - 5.85 * B + 36.49 * C - 100.80 * D + 118.80 * E - 39.34 * (A * B) -$$

Table 2 ANOVA for quadratic model for wet weight of BC produced by *A. senegalensis* MA1

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	<i>p</i> -value	Significance
Model	1.410 × 10 ⁵	20	70,509.17	3.77	0.0006	Significant
A-Carbon	58,343.26	1	58,343.26	3.12	0.0886	
B-Nitrogen	991.84	1	991.84	0.053	0.8195	
C-pH	34,482.34	1	34,482.34	1.84	0.1851	
D-Temperature	2.990 × 10 ⁵	1	2.990 × 10 ⁵	15.95	0.0004	
E-Additives	45,376.76	1	45,376.76	2.42	0.1303	
AB	43,097.43	1	43,097.43	2.3	0.1442	
AC	1.753 × 10 ⁵	1	1.753 × 10 ⁵	9.34	0.0048	
AD	7017.77	1	7017.77	0.375	0.5451	
AE	1.141 × 10 ⁵	1	1.141 × 10 ⁵	6.09	0.0197	
BC	32,833.07	1	32,833.07	1.75	0.1957	
BD	84.84	1	84.84	0.0045	0.9468	
BE	47,914.04	1	47,914.04	2.56	0.1204	
CD	6716.78	1	6716.78	0.3589	0.5538	
CE	31,122.95	1	31,122.95	1.66	0.2074	
DE	77.74	1	77.74	0.0042	0.9491	
A ²	13,140.61	1	13,140.61	0.7021	0.4089	
B ²	2315.92	1	2315.92	0.1237	0.7276	
C ²	3.916 × 10 ⁵	1	3.916 × 10 ⁵	20.89	0.0001	
D ²	1.145 × 10 ⁵	1	1.145 × 10 ⁵	6.09	0.0197	
E ²	3988.88	1	3988.88	0.2131	0.6478	

*R*² = 0.7221, Adjusted *R*² = 0.5304, Adeq. Precision = 7.5023

Table 3 Regression coefficients in terms of coded factors for optimization of cellulose production

Factor	Coefficient Estimate	df	Standard Error	VF
Intercept	378.60	1	45.72	
A-Carbon	-44.53	1	25.22	1.47
B-Nitrogen	-5.85	1	25.42	1.50
C-pH	-36.49	1	26.88	1.54
D-Temperature	-10081	1	25.42	1.46
E-Additives	-11884	1	76.32	1.51
AB	-39.34	1	25.93	1.15
AC	-86.99	1	28.46	1.30
AD	16.48	1	26.92	1.24
AE	-20023	1	81.14	1.39
BC	37.56	1	28.36	1.32
BD	-1.80	1	26.78	1.23
BE	132.81	1	83.80	1.45
CD	-17.6	1	29.38	1.43
CE	113.14	1	87.74	1.70
DE	5.16	1	80.12	1.35
A ²	-15.42	1	18.41	1.06
B ²	-6.47	1	18.41	1.06
C ²	-85.58	1	18.72	1.11
D ²	-45.43	1	18.41	1.06
E ²	-64.79	1	140.34	1.20

$86.99 * (A * C) + 16.48 * (A * D) - 200.23 * (A * E) + 37.56 * (B * C) - 1.80 * (B * D) + 132.81 * (B * E) - 17.60 * (C * D) + 113.14 * (C * E) + 5.16 * (D * E) - 15.42 * A^2 - 6.47 * B^2 - 85.58 * C^2 - 45.43 * D^2 - 64.79 * E^2$.

The final equation in terms of actual factors for production of BC by *A. senegalensis* MA1 was denoted as:

Wet weight of BC = $-8134.02085 + 122.28 * \text{Glycerol concentration} + 98.89 * \text{Yeast extract concentration} + 702.13 * \text{pH of the medium} + 188.28 * \text{Temperature of incubation} + 297.57 * \text{PEG 6000 concentration} - 3.15 * (\text{Glycerol concentration} * \text{Yeast extract concentration}) - 8.70 * (\text{Glycerol concentration} * \text{pH of the medium}) + 0.94 * (\text{Glycerol concentration} * \text{Temperature of incubation}) - 8.42 * (\text{Glycerol concentration} * \text{PEG 6000 concentration}) + 7.51 * (\text{Yeast extract concentration} * \text{pH of the medium}) - 0.21 * (\text{Yeast extract concentration} * \text{Temperature of incubation}) + 11.17 * (\text{Yeast extract concentration} * \text{PEG 6000 concentration}) - 2.51 * (\text{pH of the medium} * \text{Temperature of incubation}) + 11.89 * (\text{pH of the medium} * \text{PEG 6000 concentration}) + 0.31 * (\text{Temperature of incubation} * \text{PEG 6000 concentration}) - 0.62 * (\text{Glycerol concentration} * \text{Glycerol concentration}) - 1.04 * (\text{Yeast extract concentration} * \text{Yeast extract concentration}) - 21.40 * (\text{pH of the medium} * \text{pH of the medium}) - 3.71 * (\text{Temperature of incubation}$

$* \text{Temperature of incubation}) - 2.86 * (\text{PEG 6000 concentration} * \text{PEG 6000 concentration})$.

The 3-dimensional response surface curves of different parameters are graphically represented in Fig. 9. The interaction between glycerol concentration and pH of the medium showed that the maximum production of BC could be obtained when pH is slightly acidic with 50 mL L⁻¹ of glycerol (Fig. 9a). In the interaction between glycerol concentration and temperature of incubation, the former has only a little influence compared to the latter (Fig. 9b). Further, the interaction between PEG 6000 concentration and glycerol concentration (Fig. 9c) indicates that the maximum concentration of additive (PEG 6000) along with glycerol could produce the maximum amount of cellulose. The effect of yeast extract concentration in interaction with the pH of the medium produced maximum BC at slightly acidic pH and 7.5 g L⁻¹ of yeast extract (Fig. 9d). Accordingly, the interaction of pH with temperature increased the production to a maximum at 30 °C and pH of 5.0 (Fig. 9e). The interaction of PEG 6000 concentration with the pH of the medium and incubation temperature, respectively, revealed that the concentration of PEG 6000 had a higher impact than the other two (Fig. 9f and Fig. 9g). The interaction between the temperature of incubation and yeast extract concentration indicated that maximum BC was produced at a temperature of about 30 °C with 5 g L⁻¹ of yeast extract (Fig. 9h). The effect of PEG 6000, along with yeast extract concentration, was found to be high at a medium concentration of both the sources (Fig. 9i). Also, the effect of glycerol and yeast extract concentration had no significant differences in BC production when the other factors are constant (Fig. 9j). Ultimately, the maximum production of about 469.83 g L⁻¹ of wet BC was achieved with the parameters viz., 50 mL L⁻¹ of glycerol, 7.50 g L⁻¹ of yeast extract at pH 6.0 by incubating at a temperature of 33.5 °C along with 7.76 g L⁻¹ of PEG 6000.

Discussion

Cellulose is synthesized by bacteria belonging to the genera *Acetobacter*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, and *Sarcina* [25]. The most efficient producer of BC is a Gram-negative, acetic acid bacterium, *Acetobacter xylinum* (reclassified as *Gluconacetobacter xylinus*) [26, 27]. In this study, *A. senegalensis* MA1, isolated previously [28] from sugarcane juice, was used for optimizing BC production. Our earlier results demonstrated that *A. senegalensis* MA1 produced the maximum amount of cellulose mat, registering 7.2 g L⁻¹ on a dry weight basis in HS broth in 2 weeks of culturing [28]. Although the standard recommended medium for the BC production is HS medium [29], researchers have continuously attempted to optimize the media and process parameters

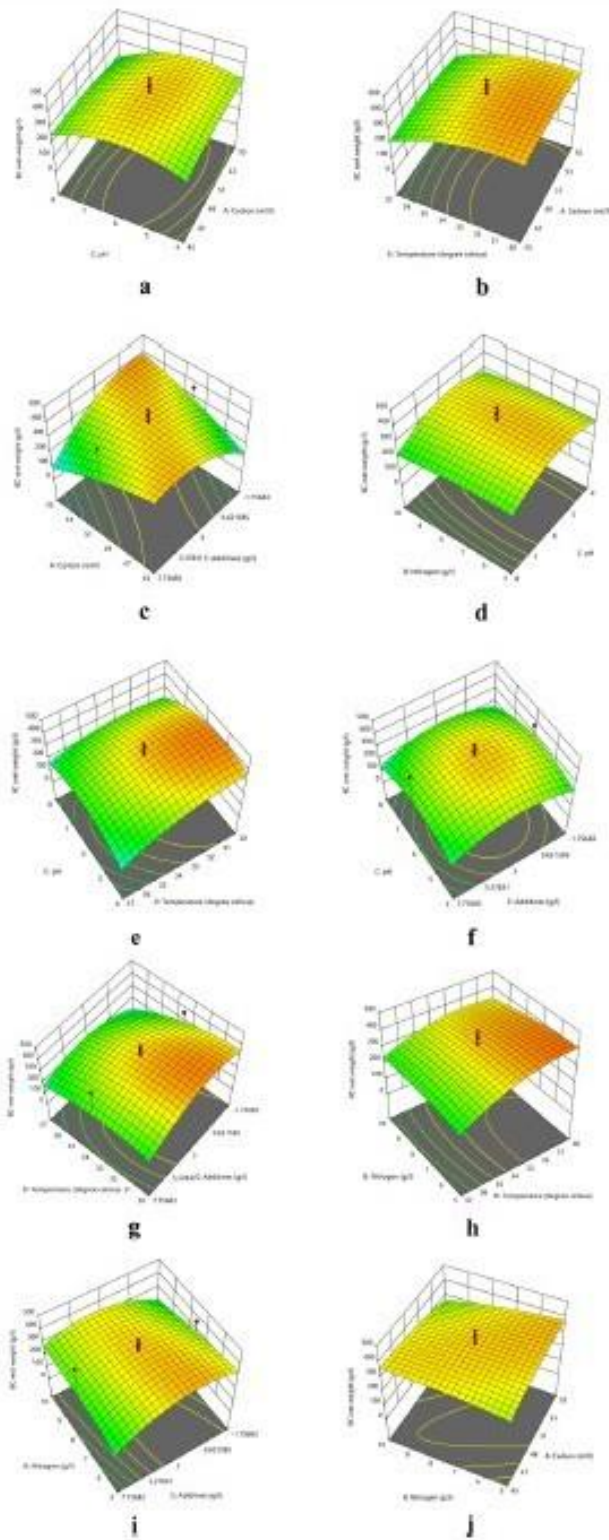


Fig. 9 (See legend on next page.)

(See figure on previous page.)

Fig. 9 Response surface curves showing the effect of different culture conditions on BC production by *A. senegalensis* MA1: The response surface curves showing interaction between varying factors. Interactive effect is represented with the color ranging from green to red, green being lesser significant, and red being highly significant. 9a. Interaction between glycerol and pH; 9b. Interaction between glycerol and temperature; 9c. Interaction between PEG 6000 and glycerol; 9d. Interaction between yeast extract and pH; 9e. Interaction between pH and temperature; 9f. Interaction between temperature and PEG 6000; 9g. Interaction between yeast extract and PEG 6000; 9h. Interaction between yeast extract and glycerol

for improving BC yields [30]. In general, a medium containing appropriate carbon and nitrogen sources is most supportive in the stable production of BC [31]. The present study optimized culture conditions such as carbon, nitrogen, pH, temperature, precursors, polymer additives, inoculum concentration, and incubation time. Although glycerol was identified as the best carbon source for maximum BC production by *A. senegalensis* MA1 in the present investigation, one of the previous studies identified mannitol as the best carbon source among the evaluated carbon sources [32]. Similarly, some experimental evidence suggests that the use of tri-carbon sugar also increased BC production [33]. Tea broth, along with a sucrose concentration of 90 g L^{-1} , resulted in 66.9% yield of BC [34].

Contrary to this, a combination of sugars such as glucose and fructose accelerated the fermentation process and maximized the yield of cellulose in lesser time [35]. Independent of the substrate used, the efficient cellulose production by the bacterium *Gluconacetobacter* sp. lies in its ability to synthesize glucose from the different carbon sources, followed by its polymerization to cellulose [36]. The synthesis of BC is a precisely and specifically regulated multi-step process that includes the synthesis of UDP-Glc, which is the cellulose precursor, followed by glucose polymerization into the β -1,4-glucan chain, and nascent chain association to form the characteristic ribbon-like structure, composed of hundreds or even thousands of individual cellulose chains [37]. In the present study, a yield enhancement in BC was seen by the incorporation of UDP-Glc as a precursor. Furthermore, depending on the carbon compound available (hexoses, glycerol, dihydroxyacetone, pyruvate, and dicarboxylic acids), the cells would begin Krebs cycle, gluconeogenesis, or pentose phosphate cycle, accounting to the production of UDP-Glc, which is a precursor for cellulose biosynthesis [38]. Several carbon compounds can be converted into cellulose with an efficiency of 50% by *A. xylinum* [39]. Supplementing the medium with ethanol instead of glucose increased the production of BC by serving as an energy source for ATP generation rather than being utilized as a carbon source [40]. On the other hand, during the utilization of glucose, gluconic acid is formed as a byproduct, which decreases the production of cellulose by reducing the pH of the culture medium. The bacterial cells cannot survive in the highly acidic

medium, which hampers further production of BC. The formation of gluconic acid can be diminished in the presence of lignosulfonate [41].

Nevertheless, the microscopic and molecular characteristics of the BC remain indistinguishable with any carbon source. Evidence suggested that there is no specific pattern for a given bacterial species to utilize any desired carbon and nitrogen sources for BC production [42]. In the present investigation, yeast extract yielded maximum BC. While supplementing additional nitrogen increased biomass production but diminished the cellulose production [43]. Hence, adding nitrogen source in excess amount leads to decreased BC production, whereas the precursor molecules such as amino acids and methionine enhanced the yield [44]. The inorganic nitrogen sources in culture medium inhibited cell growth, resulting in low BC production. Whereas, the use of organic nitrogen at sufficient concentration improved the BC yield. To prevent clumping and coagulation of BC, water-soluble polysaccharides such as agar [45], acetan, and sodium alginate [46] were added as additives that enhanced the BC production in the jar-fermentor or air-lift bioreactor. The highest production of BC (8.2 g L^{-1}) was established with the addition of CMC [47]. Under static conditions, the negatively charged water-soluble cellulose derivatives, CMC, agar, and sodium alginate were used to improve the production of BC [48]. Similarly, the addition of agar at a concentration of 0.6% in the stirred-tank reactor generated 11.6 g L^{-1} of BC by *Acetobacter xylinum* BPR2001 [49]. In the present study, addition of 1% PEG 6000 as polymer additive in HS medium enhanced the BC yield as reported earlier [28, 50].

Optimum pH is essential for oxidative reaction and normal nutrient solubility, uptake, and enhancement of BC production [51]. The pH of all media containing glucose was decreased due to the generation of gluconic acid [52]. Also, the accumulation of acetic or lactic acid in static cultures decreases the pH far lower than the optimal range required for good BC yield. The maximum cellulose yield was reported for *Acetobacter pasteurianus* HBB6 and *Acetobacter lovaniensis* HBB5 at pH 7.0 [33, 53].

The temperature plays a significant role in BC production. It has been found that *A. xylinum* culture needs a warm and static condition with the temperature not

below 20 °C and not above 30 °C [54] and the ideal temperature is about 23 °C to 30 °C. The maximum production of BC was found at 30 °C by *Acetobacter pasteurianus* RSV-4 [31] and *Komagataeibacter xylinus* B-12068 [55]. In another study, an optimum temperature of 30 °C was suggested for maximum BC production, and at 45 °C, the lowest production was observed [56]. *Acetobacter* could tolerate 5 to 9% of ethanol and temperature up to 34 °C while producing vinegar [57]. The growth of *A. xylinum* 0416 at an incubation temperature of 25 °C, 27 °C, 28 °C, and 30 °C was found with no lag phase. However, at 5 °C, 20 °C, 35 °C, and 40 °C, the growth was prolonged with a more extended period of log phase [58]. A high incubation temperature can denature the bacterial cell components such as nucleic acids and proteins, even in an optimal growth medium.

If the inoculum concentration is in excess, there would be competition between the cells in utilizing nutrients, which disrupts the bacterial growth and thereby reduces the production of BC [36]. After 17–18 d of incubation, glucose in the medium was almost dissipated completely, and the metabolites reached maximum production [59]. The pellicle of BC is formed on the air-liquid interface of the media for providing sufficient oxygen to the bacterial cells. After 14 d, the pellicle attains sufficient thickness, thus restricting the entry of oxygen, which makes the cells starve for oxygen and become unable to grow actively [60]. Such operational factors can be optimized by statistical approaches such as RSM to maximize the production of BC. It can be well applied when a response or a set of responses of interest is influenced by several variables [61]. Various optimization techniques have been compared to improve the BC yields, such as one variable at a time and the design of experiments (DOE). The DOE being a statistical technique is helpful in analyzing the effect of process variables and the effects of their interactions. Plackett-Burman design (PBD) and central composite design (CCD) have been employed for BC optimization [62]. However, in the present study, the initial BC production with *A. senegalensis* MA1 was only 20.4 g L⁻¹ of wet weight and 1.02 g L⁻¹ of dry weight, which increased to approximately 20 times after 30 d of inoculation by optimizing the fermentation parameters using CCD. The results showed a correlation between the predicted and experimental responses that predicted R² value of 0.7221 is in reasonable agreement with the adjusted R² of 0.5304 suggesting that the model is acceptable. Whereas, in another experiment, sucrose concentration, ethanol addition, and temperature for bacterial cellulose production were optimized by RSM for *Gluconacetobacter hansenii*, and it was concluded that the addition of ethanol favors oxidation into acetic acid [63]. Taguchi method of

RSM was used for optimizing the yield of bacterial cellulose and illustrated that 5% of glucose at pH 4.5 could increase the yield up to 37.5% [64]. With 10.8% sugarcane molasses and 12.5% corn steep liquor at 31 °C and pH 6.5, after 172 h, the maximum optimized production of BC by *Gluconacetobacter xylinus* C18 was attained [65]. Furthermore, the BC yield accomplished by *Komagataeibacter intermedius* after RSM analysis by modifying the HS medium components with 41 g L⁻¹ of fructose, and 38 g L⁻¹ of peptone was 382% higher than the standard medium [66]. *Acetobacter xylinum* produced 3.6 times more yield than the conventional one by using the fermentation condition of 29.2 °C, pH 5.83, and 1.75 g L⁻¹ glucose concentration, where 17.81 g of BC was achieved after optimization [67].

Conclusions

Bacterial cellulose is a versatile biomaterial and has found applications in many processes giving products like high-quality paper, nanocomposites, wound repair materials, and even artificial blood vessels. Despite various applications, the cost of manufacturing of BC limits its use to a few biomedical devices and traditional fermented products, including Nata de Coco, in Asian countries. Response Surface Methodology performed by using Central Composite Design (CCD), optimized various fermentation parameters and the modification of HS medium with 50 mL L⁻¹ of glycerol, 7.50 g L⁻¹ of yeast extract at pH 6.0 by incubating at a temperature of 33.5 °C along with 7.76 g L⁻¹ of PEG 6000 for 30 days has resulted in maximum BC of 469.83 g L⁻¹. A twenty-fold higher BC yield obtained through the optimized parameters could still be enhanced through the design of a suitable bioreactor and genetic manipulation approaches. Furthermore, BC produced as such is considered as a highly pure nano polymer, any interventions of nanoformulation and extending its application toward sustainable food and pharmaceutical sector would be a much appreciable way forward.

Methods

Microorganisms and media

The cellulose producing bacteria, *A. senegalensis* MA1 [28] obtained from the Department of Agricultural Microbiology, Agricultural College and Research Institute, Madurai - 625,104, was previously isolated from sugarcane juice. The isolate was maintained in standard Hestrin-Schramm (HS) medium [68] composed of glucose-20 g L⁻¹, peptone- 5 g L⁻¹, yeast extract- 5 g L⁻¹, disodium hydrogen phosphate (Na₂HPO₄)- 2.7 g L⁻¹, citric acid- 1.15 g L⁻¹ and agar- 20 g L⁻¹.

Pre-optimization of culture conditions for BC production

To obtain maximum BC, varying nutrients (carbon, nitrogen, precursor, and polymer additives), environment (pH and temperature), inoculum rate, and incubation period were evaluated. BC gel was produced by inoculating the freshly prepared inoculum of *A. senegalensis* MA1 (10%) in 250 mL Erlenmeyer flask containing 100 mL of sterile Modified Hestrin – Schramm (MHS) broth. After inoculation, the broth was incubated at $30 \pm 1^\circ\text{C}$ for 14 d under static conditions. The mat formed at air-liquid interface was harvested and purified by alkali treatment, i.e., 2% NaOH at 80°C for 45 min and subsequently washed with distilled water until the pH of BC was neutralized to 7.0. Prior to purification, the harvested mats were washed with deionized water. The purified mats were later dried in a hot air oven at 45°C until BC reached constant dry weight. The concentration of peptone, Na_2HPO_4 , and citric acid was kept constant, whereas glucose, yeast extract, pH, and temperature of the standard media varied. All the experiments were carried out under static conditions.

Nutritional parameters

Glucose (2%), in HS medium, was replaced with other carbon sources viz., acetic acid, ethanol, fructose, galactose, glucose, glycerol, glycine, inositol, lactic acid, lactose, malic acid, maltose, mannitol, mannose, methanol, oxalic acid, sorbitol, starch, succinic acid, sucrose, tryptose, tyrosine, xylitol, and xylose. Similarly, the effect of nitrogen sources viz., ammonium nitrate, beef extract, casein hydrolysate, calcium nitrate, malt extract, peptone, potassium nitrate, sodium azide, sodium nitrate, thiourea, tryptone, urea, and yeast extract was evaluated by keeping other factors constant except yeast extract (0.5%). The major precursor for BC production was found to be uridine diphosphoglucose (UDP-Glc), and its effect on BC production was evaluated by different concentrations such as 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, and 100 ppm. Polymer additives such as agar, agarose, microcrystalline cellulose, chitin, carboxy methylcellulose, gelatin, lignin, pectin, polyethylene glycol (PEG) 6000, sodium alginate, and xanthan were supplemented at 1% to evaluate the maximum production of BC. A 24 h old culture of *A. senegalensis* MA1, grown for 14 d under static conditions at $30 \pm 1^\circ\text{C}$, was used for the evaluation of nutrients under all the conditions.

Environmental parameters

HS medium prepared at different pH values of 2.0, 3.0, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 and 9.0, was inoculated with 24 h old culture of *A. senegalensis* MA1 and incubated at $30 \pm 2^\circ\text{C}$ for 14 d under static conditions. The effect of different temperatures on BC production

was also determined by incubating at temperatures of 25°C , 27.5°C , 30°C , 32.5°C , 35°C and 37°C for 14 d.

Inoculum concentrations and incubation times

Different concentrations of 24 h old *A. senegalensis* MA1 viz., 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, and 20%, after measuring OD at 660 nm using UV-Vis Spectrophotometer (M/s. Shimadzu, Japan) were inoculated separately into 50 mL of HS broth at pH 5.0 and incubated at $30 \pm 1^\circ\text{C}$ for 14 d under static conditions. The inoculum was added at the rate of 10% and then incubated at $30 \pm 1^\circ\text{C}$ for different incubation periods viz., 2, 5, 7, 10, 12, 15, 17, 20, 22, 25, 27 and 30 d.

Media optimization by response surface methodology (RSM)

RSM was used for the design of experiments for the screening of five critical media components as independent variables. The variables were glycerol as carbon source, yeast extract as a nitrogen source, pH, temperature, and PEG 6000 as a polymer additive. The dry weight of cellulose produced was fixed as the dependent variable. The design consists of 50 experimental trials, and the experiments were conducted in a randomized fashion at two levels of concentrations (high level and low level). A total of eight verification runs were performed to confirm the validity and accuracy of the model, and the experiments were done in triplicates under a static condition in 250 mL conical flasks. The natural levels and interval of variation of the independent variables in the experimental plan for the optimization of the cellulose production process are given in Table 4.

Statistical analysis

All the data presented in tables and figures were expressed as the mean \pm standard error of three replications. Statistical analysis was done as per the method of Panse (1954) [69]. Response Surface Methodology (RSM) was employed to study the effect of different independent parameters on dependent variables using the statistical software, Design Expert (Version 11.0.5). The

Table 4 Natural levels and interval of variation in the independent variables in the design of cellulose production

Factors	Codes	Levels			Interval of variation
		-1	0	+1	
Carbon	Glycerol (mL L^{-1})	45.0	50.0	55.0	5.0
Nitrogen	Yeast extract (g L^{-1})	5.0	7.5	10.0	2.5
pH		4.0	6.0	8.0	2.0
Temperature	$^\circ\text{C}$	30.0	33.5	37.0	3.5
Additive	PEG 6000 (g L^{-1})	0.0	2.5	5.0	2.5

software was used for the data analysis, developing the regression models, and plotting the three-dimensional surface plots by employing multiple regression techniques [70]. The number of experiments designed by CCD is based on

$$N = k^2 + 2k + n$$

where N is the total number of experiments, k is the number of factors studied, and n is the number of replicates.

Experimental results obtained were analyzed using the response surface regression procedure of the statistical analysis system. The correlation between responses and independent variables is achieved by fitting them into the second-order polynomial equation.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^k \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon$$

where Y represents the responses, k is the total number of independent factors, β_0 is an intercept, i , ii , and ij with β represent the coefficient values for linear, quadratic, and interaction effects, respectively, and x_i and x_j in the above equation show the coded levels for independent variables.

Abbreviations

ATP: Adenosine Tri Phosphate; BC : Bacterial Cellulose; CCD: Central Composite Design; CMC: Carboxy Methyl Cellulose; DOE: Design of Experiments; HS: Hestán and Schramm; OD: Optical Density; PBD: Plackett–Burman Design; PEG: Poly Ethylene Glycol; RSM: Response Surface Methodology; UDP-Glc: Uridine Di Phosphate Glucose; VF: Variation Inflation Factors

Acknowledgements

We acknowledge the Metabolomic and Proteomic Analytical Facility (MPAF) at the Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore, India for sharing their equipment for various analyses carried out in the present study.

Authors' contributions

SU received the research grant and conceptualized the idea. AK conducted the experiments. SU and NOG provided guidance to conduct the experiments. AK wrote the original draft. SU redrafted, reviewed, and edited the manuscript. All authors have read and approved the manuscript.

Funding

This study was funded by the Central Institute for Research on Cotton Technology, Indian Council Agricultural Research, Mumbai (Grant No. ICAR-CRCOT-CRP-TNAU-01), India through a research project support to SU. The funders had no role in study design, data collection, and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Availability of data and materials

All data of this manuscript are included in the manuscript. No separate external data source is required. Any additional information required will be provided by communicating with the corresponding author via the official mail: uswa@tnau.ac.in

Ethics approval and consent to participate

No specific permissions were required for the described studies because no human or animal subjects were involved in this research.

Consent for publication

All authors agreed to publish the content.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 7 April 2020 Accepted: 10 August 2020

Published online: 26 August 2020

References

- Hori DNS. Cellulose: a random walk along its historical path. *Cellulose*. 1994; 1:1–25. <https://doi.org/10.1007/BF00818796>.
- Kemm D, Schmauder HP, Heinze T. *Biopolymers* vol. 6. Vandamme S, de Bess, Steinbuechel A, Eds, ed Weinheim: Wiley-VCH; 2002p.290–292.
- Cheng KC, Catchmark JM, Demird A. Enhanced production of bacterial cellulose by using a biofilm reactor and its material property analysis. *J Biol Eng* 2009;3:32. <https://doi.org/10.1186/1754-1611-3-12>.
- Pokalwar SJ, Mishra MK, Manwar AV. Production of cellulose by *Gluconacetobacter* sp. *Recent Res Sci Technol*. 2010;2:14–9.
- Shoda M, Sugano Y. Recent advances in bacterial cellulose production. *Biotechnol Bioprocess Eng* 2005;10:1. <https://doi.org/10.1007/BF02981175>.
- Mohammad kazemi F, Azizi M, Ashraf A. Production of bacterial cellulose using different carbon sources and culture media. *Carbohydrate Polymers*. 2015;117:518–523. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.10.008>.
- McFenna BA, Mikkelsen D, Wehr JB, Gidley MJ, Merzies NW. Mechanical and structural properties of native and alkali-treated bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter xylinus* strain ATCC 5354. *Cellulose*. 2009;16:1047. <https://doi.org/10.1007/s10570-009-9340-y>.
- Harhangi HR, Steenbakkers PJM, Akhmanova A, Jetter MSM, van der Drift C, Op den Camp HJM. A highly expressed family 1 β -glucosidase with transglycosylation capacity from the anaerobic fungus *Piriformyces* sp. E2. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*. 2002; 1574:293–303. [https://doi.org/10.1016/S01674781\(01\)00380-3](https://doi.org/10.1016/S01674781(01)00380-3).
- Ndoye B, Cleenweck I, Engelbeen K, Dubois-Dauphin R, Guiso AT, Van Trappen S, Thonart P. *Acetobacter senegalensis* sp. nov., a thermotolerant acetic acid bacterium isolated in Senegal (sub-Saharan Africa) from mango fruit (*Mangifera indica* L.). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2007;57:1576–1581. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64678-0>.
- Dutta D, Gachhui R. Nitrogen-fixing and cellulose-producing *Gluconacetobacter kombuchae* sp. nov., isolated from Kombucha tea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2007;57: 353–357. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64638-0>.
- Hungund BS, Gupta SG. Production of bacterial cellulose from *Enterobacter amnigenus* GH-1 isolated from rotten apple. *World J Microbiol Biotechnol* 2010;26:1823–1828. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0863-1>.
- Castro C, Zuluaga R, Putsux JL, Caro G, Mondragon I, Ganan P. Structural characterization of bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter swingii* sp. from Colombian agroindustrial wastes. *Carbohydr Polym* 2011; 84:96–102. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.10.072>.
- Tsouka E, Koumentza C, Ledakis D, Kopsahelis N, Mendala I, Papanikolaou S, Koutinas A. Bacterial cellulose production from industrial waste and byproduct streams. *Int J Mol Sci* 2015;16:14832–14849. <https://doi.org/10.3390/ijms160714832>.
- Farag S, Asker MMS, Mahmoud MG, Ibrahim H, Amr A. Comparative study for bacterial cellulose production using Egyptian *Achromobacter* sp. Soher. *Research journal of pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 2016; 7:954–69.
- Chen P, Cho SY, Jin HJ. Modification and applications of bacterial celluloses in polymer science. *Macromol Res* 2010;18:309–320. <https://doi.org/10.1007/s13233010-0404-5>.
- Selbastang O, Phisalaphong M. Novel aloe vera-bacterial cellulose composite film from biosynthesis. *Carbohydr Polym* 2010;79:455–460. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.08.039>.
- Dahman Y, Jayesuriya KE, Kalis M. Potential of biocellulose nanofibers production from agricultural renewable resources: preliminary study. *Appl Biochem Biotechnol* 2010;162:1647–1659. <https://doi.org/10.1007/s12010-010-8946-8>.
- Reshk SMAS. Bacterial cellulose production and its industrial applications. *Journal of Bioprocessing and Biotechniques* 2014;4:150. <https://doi.org/10.4172/21559821.1000150>.