

**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: Вітаміни мікробного походження як основа ін'єкційних препаратів

Виконав: здобувач 2 курсу, групи 2

ТУГАРСВА Тетяна Іванівна

(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)

Київ – 2024 р.

# НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю  
Кафедра біотехнології і мікробіології  
Освітній ступінь магістр  
Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»  
(код і назва)  
Освітньо-професійна програма «Фармацевтична біотехнологія»  
(назва)

**ЗАТВЕРДЖУЮ**

Завідувач кафедри біотехнології і  
мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ

“ 30 ” жовтня 2023 року

## З А В Д А Н Н Я

### НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

**ТУГАРСВА Тетяна Іванівна**

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Вітаміни мікробного походження як основа ін'єкційних препаратів

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від 06 листопада 2023 року № 914-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 05.02.2024

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Ashbya gossypii*; цільовий продукт: фолієва кислота (вітамін B9)

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити)

Розділ 1. Одержання вітамінів біотехнологічним шляхом. Розділ 2. Використання вітамінів мікробного походження. Розділ 3. Техніко-економічне обґрунтування виробництва вітаміну B9 для ін'єкційного гідрогелевого лікарського засобу. Розділ 4. Обґрунтування етапів виділення та очистки вітаміну B9 для ін'єкційного гідрогелевого лікарського засобу. Розділ 5. Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях. Розділ 6. Специфікація обладнання для виділення та очищення фолієвої кислоти. Розділ 7. Опис технологічної схеми післяферментаційного виділення і очищення вітаміну B9 для ін'єкційного гідрогелевого лікарського засобу. Розділ 8. Контроль виробництва вітаміну B9 для ін'єкційного гідрогелевого лікарського засобу. Розділ 9. Обґрунтування вибору технологічної схеми одержання гідрогелевих ін'єкцій для хіміотерапії. Розділ 10. Матбаланс на серію гідрогелевого лікарського засобу на основі фолієвої кислоти. Розділ 11. Специфікація обладнання для виробництва гідрогелевих ін'єкцій. Розділ 12. Опис технологічної схеми виробництва гідрогелевих ін'єкцій для хіміотерапії. Розділ 13. Опис ін'єкційного препарату на основі фолієвої кислоти згідно АНД

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна та апаратурна схеми виділення та очищення фолієвої кислоти – 1 та 2 аркушу листа формату А1; Технологічна та апаратурна схеми виробництва лікарського засобу на основі фолієвої кислоти – по 1 аркушу листа формату А1;

## 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	Розділ 1. Одержання вітамінів біотехнологічним шляхом.	01.11.2023-07.11.2023	
2	Розділ 2. Використання вітамінів мікробного походження.	08.11.2023-14.11.2023	
3	Розділ 3. Техніко-економічне обґрунтування виробництва вітаміну В9 для ін'єкційного гідрогелевого лікарського засобу.	15.11.2023-21.11.2023	
4	Розділ 4. Обґрунтування етапів виділення та очистки вітаміну В9 для ін'єкційного гідрогелевого лікарського засобу.	22.11.2023-28.11.2023	
5	Розділ 5. Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях.	29.11.2023-05.12.2023	
6	Розділ 6. Специфікація обладнання для виділення та очищення фолієвої кислоти.	06.12.2023-12.12.2023	
7	Розділ 7. Опис технологічної схеми післяферментаційного виділення і очищення вітаміну В9 для ін'єкційного гідрогелевого лікарського засобу.	13.12.2023-19.12.2023	
8	Розділ 8. Контроль виробництва вітаміну В9 для ін'єкційного гідрогелевого лікарського засобу.	20.12.2023-26.12.2023	
9	Розділ 9. Обґрунтування вибору технологічної схеми одержання гідрогелевих ін'єкцій для хіміотерапії.	27.12.2023-02.01.2024	
10	Розділ 10. Матбаланс на серію гідрогелевого лікарського засобу на основі фолієвої кислоти.	03.01.2024-09.01.2024	
11	Розділ 11. Специфікація обладнання для виробництва гідрогелевих ін'єкцій.	10.01.2024-12.01.2024	
12	Розділ 12. Опис технологічної схеми виробництва гідрогелевих ін'єкцій для хіміотерапії.	13.01.2024-14.01.2024	
13	Розділ 13. Опис ін'єкційного препарату на основі фолієвої кислоти згідно АНД	15.01.2024-16.01.2024	
14	Оформлення пояснювальної записки	17.01.2024-18.01.2024	
15	Оформлення креслень – графічної частини роботи	19.01.2024-20.01.2024	

Здобувач

\_\_\_\_\_ (підпис)

Керівник роботи

\_\_\_\_\_ (підпис)

Тетяна ТУГАРСВА

\_\_\_\_\_ (ім'я та прізвище)

Юрій КАРЛАШ

\_\_\_\_\_ (ім'я та прізвище)

## РЕФЕРАТ

Робота присвячена розробці нового ін'єкційного препарату на основі фолієвої кислоти. Визначено, що біотехнологічний синтез цього вітаміну є більш цікавим варіантом, який може дозволити одержати доволі дешеву сировину, використовуючи відходи виробництв, тим самим здешевлюючи кінцеву ціну субстанції та вирішуючи екологічні проблеми довкілля. Також, біотехнологічний метод синтезу має й інший ряд переваг, однією з яких є незалежність від пори року, оскільки нерідко вітаміни добувають саме із рослинної сировини.

Фолієва кислота у формі ін'єкцій є більш привабливою формою перед пероральним застосуванням, оскільки її можна вводити локально у потрібні місця, а також вона є більш дієвою, порівняно з таблетками чи капсулами. Ін'єкції вітаміну В9 зазвичай використовують для уникнення його дефіциту (особливо у вагітних), який може викликати низку патологічних станів.

Останні розробки ін'єкційних форм вітамінів показують їх ефективне використання у якості основи лікарських засобів у хіміотерапії. Дослідження щодо застосування гелевих ін'єкцій на основі фолату з доксорубіцином показали, що вітамін знижує його негативний вплив на організм, а також підвищує саму цитотоксичність антрацикліну, що робить один з основних препаратів проти раку більш ефективним та безпечним. Тому, у техніко-економічному обґрунтуванні було виконано розрахунок виробництва спираючись саме на цю форму.

За техніко-економічним обґрунтуванням визначено кількість доз препарату на всю Україну, що становить 4 157 348 доз на рік. Кількість фолату становила 40,2 кг. З врахуванням того, що в Україні існують інші препарати для хіміотерапії, пропонується забезпечувати 5% від потреби, що складає 2,01 кг фолату на рік.

Робота складається зі вступу, 13 розділів та списку використаної літератури (160 літературних джерел). Кількість сторінок – 133, рисунків – 15 та таблиць – 16. Графічна частина містить 5 аркушів креслень формату А1.

*Ключові слова:* ін'єкції, хіміотерапія, ін'єкційні гідрогелі, доксорубіцин, вітаміни, фолієва кислота, рекомбінантний штам *Ashbya gossypii*.

## ABSTRACT

The work is devoted to the development of a new injectable drug based on folic acid. It was determined that the biotechnological synthesis of this vitamin is a more interesting option, which can make it possible to obtain relatively cheap raw materials using industrial waste, thereby reducing the final price of the substance and solving environmental problems. Also, the biotechnological method of synthesis has a number of other advantages, one of which is independence from the season, since vitamins are often extracted from plant raw materials.

Injectable folic acid is a more attractive form over oral administration because it can be injected locally and is more effective than tablets or capsules. Injections of vitamin B9 are usually used to avoid its deficiency (especially in pregnant women), which can cause a number of pathological conditions.

Recent developments of injectable forms of vitamins show their effective use as the basis of drugs in chemotherapy. Studies on the use of gel injections based on folate with doxorubicin have shown that the vitamin reduces its negative impact on the body, and also increases the cytotoxicity of anthracycline itself, which makes one of the main drugs against cancer more effective and safer. Therefore, in the technical and economic justification, the production calculation was made based on this form.

According to the feasibility study, the number of doses of the drug for the whole of Ukraine was determined, which is 4,157,348 doses per year. The amount of folate was 40.2 kg. Taking into account that there are other drugs for chemotherapy in Ukraine, it is proposed to provide 5% of the need, which is 2.01 kg of folate per year.

The work consists of an introduction, 13 chapters and a list of used literature containing 160 literary sources. Number of pages – 133, figures – 15 and tables – 16. The graphic part contains 5 sheets of A1 format drawings.

**Key words:** injections, chemotherapy, injectable hydrogels, doxorubicin, vitamins, folic acid, recombinant *Ashbya gossypii* strain

## ЗМІСТ

<b>ВСТУП</b> .....	7
<b>РОЗДІЛ 1. ОДЕРЖАННЯ ВІТАМІНІВ БІОТЕХНОЛОГІЧНИМ ШЛЯХОМ</b> .....	11
1.1. Продуценти вітамінів.....	11
1.1.1. Природні біологічні агенти.....	11
1.1.2. Рекombінантні штами.....	15
1.2. Біотехнологічні особливості одержання вітамінів.....	26
1.3. Аналоги вітамінів мікробного походження та їх біотехнологічний синтез.....	30
<b>РОЗДІЛ 2. ВИКОРИСТАННЯ ВІТАМІНІВ МІКРОБНОГО ПОХОДЖЕННЯ</b> .....	36
2.1. Сфери застосування вітамінів мікробного походження.....	36
2.2. Вітаміни, які використовуються для ін'єкцій.....	40
<b>ВИСНОВКИ ДО ЛІТОГЛЯДУ</b> .....	44
<b>РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВА ВІТАМІНУ В9 ДЛЯ ІН'ЄКЦІЙНОГО ГІДРОГЕЛЕВОГО ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ</b> .....	46
3.1. Аналіз фармакологічних властивостей цільового лікарського засобу на основі фолієвої кислоти, галузей використання, потреби у лікарському засобі ...	46
3.2. Обґрунтування вибору форми випуску лікарського засобу на основі фолієвої кислоти.....	53
3.2.1. Обґрунтування форми випуску лікарського засобу на основі фолієвої кислоти.....	53
3.2.2. Обґрунтування вибору первинної і вторинної упаковки ін'єкційного гідрогелю на основі фолату.....	57
3.3. Обґрунтування вибору біологічного агенту для отримання фолату...	63

3.4. Розрахунок потреби у фолієвій кислоті для випуску лікарського засобу та розрахунок річної потреби у культуральній рідині для одержання розрахованої кількості фолієвої кислоти .....67

РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ЕТАПІВ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИСТКИ ВІТАМІНУ В9 ДЛЯ ІН’ЄКЦІЙНОГО ГІДРОГЕЛЕВОГО ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ.....70

- 4.1. Обґрунтування відділення біомаси від культуральної рідини.....73
- 4.2. Обґрунтування розчину для ресуспендування біомаси.....74
- 4.3. Обґрунтування методу руйнування клітинної маси.....75
- 4.4. Обґрунтування стадії кип’ятіння.....77
- 4.5. Обґрунтування методу відокремлення частково очищеного розчину фолату від осаду.....77
- 4.6. Обґрунтування лужного розчину для розчинення фолату.....77
- 4.7. Обґрунтування методу відокремлення вугілля.....78
- 4.8. Обґрунтування вибору антиоксиданту.....79
- 4.9. Обґрунтування методу концентрування очищеного розчину фолієвої кислоти.....79
- 4.10. Обґрунтування розчину кислоти для одержання осаду чистого фолату.....80
- 4.11. Обґрунтування методу сушіння фолієвої кислоти.....80

РОЗДІЛ 5. ПІДБІР ТЕХНОЛОГІЧНОГО ОБЛАДНАННЯ З ВРАХУВАННЯМ МАТЕРІАЛЬНИХ ПОТОКІВ ПО СТАДІЯХ.....82

РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ ФОЛІЄВОЇ КИСЛОТИ.....85

РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНОГО ВИДІЛЕННЯ І ОЧИЩЕННЯ ВІТАМІНУ В9 ДЛЯ ІН’ЄКЦІЙНОГО ГІДРОГЕЛЕВОГО ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ.....88

РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА ВІТАМІНУ В9 ДЛЯ ІН’ЄКЦІЙНОГО ГІДРОГЕЛЕВОГО ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ.....94

8.1. Визначення об'єму рідин.....	94
8.2. Визначення концентрації додаткових розчинів та жорсткості води .....	95
8.3. Визначення ваги фолієвої кислоти.....	96
8.4. Визначення вологості фолієвої кислоти .....	96
8.5. Ідентифікація фолієвої кислоти.....	97
РОЗДІЛ 9. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОДЕРЖАННЯ ГІДРОГЕЛЕВИХ ІН'ЄКЦІЙ ДЛЯ ХІМІОТЕРАПІЇ.....	98
9.1. Розрахунок річної потужності виробництва гідрогелевих ін'єкцій на основі фолієвої кислоти та кількості серій на рік.....	98
9.2. Обґрунтування вибору класів чистоти виробничих приміщень, підготовки персоналу, дезінфікуючих засобів, вентиляційного повітря.....	98
9.2.1. Вибір класу чистоти та вентиляційного повітря.....	98
9.2.2. Підготовка персоналу.....	102
9.2.3. Вибір дезінфікуючих засобів.....	104
9.3. Обґрунтування вибору підготовки первинної упаковки.....	108
9.4. Обґрунтування вибору підготовки води.....	108
9.5. Вибір технологічних стадій та операцій, обладнання.....	109
РОЗДІЛ 10. МАТБІЛАНС НА СЕРІЮ ГІДРОГЕЛЕВОГО ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ НА ОСНОВІ ФОЛІЄВОЇ КИСЛОТИ.....	114
РОЗДІЛ 11. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА ГІДРОГЕЛЕВИХ ІН'ЄКЦІЙ.....	116
РОЗДІЛ 12. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА ГІДРОГЕЛЕВИХ ІН'ЄКЦІЙ ДЛЯ ХІМІОТЕРАПІЇ.....	119
РОЗДІЛ 13. ОПИС ІН'ЄКЦІЙНОГО ПРЕПАРАТУ НА ОСНОВІ ФОЛІЄВОЇ КИСЛОТИ ЗГІДНО АНД.....	124
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	133

## ВСТУП

Інтелектуальні м'які матеріали на основі гідрогелю є привабливими в різних важливих областях, особливо як матриці позиції ліків у системі доставки, тканинної інженерії та різних біологічних системах. При доставці ліків необхідна низька токсичність і відсутність побічних ефектів, тому важливою особливістю цих гідрогелів є їх хороша біосумісність. Деякі природні молекули, такі як колаген, еластин, фіброїн шовку та желатин, мають великий потенціал у цій галузі. Ці молекули створюють тривимірну фібрилярну мережу у своєму гідрогелі. Однак ці гідрогелі не є тиксотропними, оскільки фізична сила формування мережі фібрилами недостатньо сильна, щоб подолати зовнішній механічний подразник [1].

Завдяки тиксотропним властивостям маломолекулярні гідрогелі привернули значну увагу. Тиксотропні гідрогелі перетворюються в фазу золю шляхом застосування зовнішнього стресу. Після зняття стресу гелева фаза з'являється знову, що робить його придатним для ін'єкційного застосування. Отже, ін'єкційні властивості гелів мають значний потенціал у галузі біомедичних застосувань [1].

Останнім часом ці гідрогелі використовуються в тканинній інженерії, м'якій літографії, візуалізації клітин, і наноносіях молекул ліків, а також є перспективними кандидатами для контрольованої та цільової доставки ліків, клітин та інших біоактивних молекул. Ці біосумісні гідрогелі можна вводити в цільові місця тіла для доставки ліків і біоактивних молекул, просто змішуючи молекули з гідрогелем перед ін'єкцією. Серед цих гідрогелів придатними кандидатами є гідрогелі на основі амінокислот і пептидів через їх притаманну біосумісність і ін'єкційну природу. Існує лише кілька повідомлень про тиксотропні ін'єкційні гідрогелі. Ін'єкційні гідрогелі зазвичай готують з дипептидом, трипептидом або синтетичними низькомолекулярними

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.20 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Тугарева Т.І.</i>			<i>ВСТУП</i>	<i>Лім.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Архувів</i>
<i>Перевір.</i>		<i>Карлаш Ю.В.</i>					7	133
<i>Реценз.</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						

біосумісними гелеутворювачами. Проте ін'єкційні гідрогелі, виготовлені з використанням важливого природного матеріалу, такого як вітамін, який є важливим для людського організму, а також для контрольованого вивільнення ліків, біомолекул тощо, зараз є темою великого дослідницького інтересу [1,2].

Рак є однією з головних причин захворюваності та смертності в усьому світі. У 2012 році у світі було зареєстровано 14,1 мільйона нових випадків раку та 8,2 мільйона смертей, пов'язаних із раком. Очікується, що до 2025 року щорічно буде виявлятися 19,3 мільйона нових випадків раку [3].

Стратегії лікування відрізняються залежно від типу раку та стадії, на якій він був вперше діагностований. Доступні варіанти лікування включають хірургію, променеву терапію, хіміотерапію, гормональну терапію, імунотерапію та генну терапію. З цих варіантів хіміотерапія є найпоширенішим підходом до лікування раку та пригнічення рецидиву пухлини. Хіміотерапія визначається як використання цитотоксичних препаратів для знищення ракових клітин. Однак сумною проблемою багатьох доступних хіміопрепаратів є нездатність обмежити цитотоксичність пухлинної клітини, і, таким чином, поява небажаної токсичності для нормальних тканин часто обмежує їх використання [3].

У порівнянні з традиційною хіміотерапією методи локалізованої доставки ліків не тільки знижують токсичність у нормальних тканинах, уникаючи таким чином системної циркуляції хіміопрепаратів, але також забезпечують локалізоване тривале вивільнення хіміопрепаратів і тим самим підвищують ефективність лікування [3].

Внутрішньопухлинна доставка ліків за допомогою ін'єкційних біорозкладаних гідрогелів привернула велику увагу, оскільки вони можуть забезпечити тривалу та контрольовану доставку ліків у цільову ділянку пухлини, мінімізуючи при цьому несприятливі наслідки системного впливу препарату. Крім того, локалізована терапія ін'єкційними гідрогелями може подолати перешкоду низької розчинності, яка спостерігається при застосуванні багатьох

хіміопрепаратів, зменшуючи необхідну кількість препарату та збільшуючи кількість, яка досягає ділянки пухлини [3].

Ін'єкційні гідрогелі можна утворювати на місці за допомогою хімічних або фізичних методів зшивання. Фізично зшиті гідрогелі мають деякі переваги перед хімічно зшитими складами, оскільки вони не вимагають фотоопромінення, органічних розчинників або каталізаторів зшивання. Крім того, фізичні методи зшивання не призводять до виробництва та виділення тепла під час полімеризації, що може вплинути на включені терапевтичні засоби/клітини та навколишні тканини [3].

Наразі було протестовано гідрогелеву основу функціоналізованого вітаміну D полікарбонату і ПЕГ для протиракового препарату Авастін та функціоналізований вітаміном E полікарбонат і ПЕГ для препарату Герцептин. Перший препарат використовується для лікування раку грудей. Антиметастатичний ефект одноразової ін'єкції гідрогелю був таким же ефективним, як і 4×тижневі ін'єкції Авастину. Другий препарат також використовувався для лікування раку грудей. Гідрогель, наповнений герцептином, був специфічним щодо ракових клітин із надмірною експресією, тоді як цитотоксична дія була порівнянна з дією розчину Герцептину. Отже, це говорить, що препарати такої природи є цікавими для використання у раковій терапії, а також щопотребують додаткового дослідження [3].

Фолієва кислота помірно розчинна у воді. Поточні дослідження разом з цим вітаміном показують новий підхід до утворення гідрогелю фолату шляхом гідролізу глюконо-d-лактону в буфері PBS у фізіологічних умовах. Тиксотропну властивість гелю перевірили для інкапсуляції як гідрофільних [доксорубіцин (DOX)], так і гідрофобних [камптотецин (СРТ)] препаратів. Аналіз гідрогелю фолату демонструє нетоксичну поведінку та те, що цитотоксичність гідрогелю фолієвої кислоти, навантаженого DOX, вища, ніж у чистого DOX, з мінімальним впливом на нормальні клітини [1].

Отже, актуальністю теми є зменшення негативного впливу препаратів для хіміотерапії шляхом розробки нових ін'єкційних препаратів на основі гідрогелів, до яких входять вітаміни.

Вітаміни виготовляються хімічним шляхом, біотехнологічним синтезом або із застосуванням окремих ферментів (біокаталітичний метод). Біотехнологічний синтез має кілька переваг: мікроби ростуть швидко, не потрібно покладатися на кліматичні умови та пори року, їх можна легко наростити та вони не конкурують з потребами людини в їжі. Більшість вітамінів все ще виробляється хімічним шляхом, але кількість мікробіологічно отриманих продуктів з часом збільшується, і зараз реалізуються лабораторні модифікації мікроорганізмів для виробництва великої кількості всіх видів вітамінів [4].

Тому, новизною теми є застосування в основі гідрогелевої ін'єкції фолієвої кислоти (вітаміну B9), яку одержують біотехнологічним шляхом біосинтезу рекомбінантного штаму *Ashbya gossypii*, який може синтезувати 6595 мкг/л фолату [5].

## РОЗДІЛ 1

### ОДЕРЖАННЯ ВІТАМІНІВ БІОТЕХНОЛОГІЧНИМ ШЛЯХОМ

#### 1.1. Продуценти вітамінів

##### 1.1.1. Природні біологічні агенти

Вітаміни є важливими поживними мікроелементами, які часто є попередниками ферментів, необхідних усім живим клітинам для виконання біохімічних реакцій. Однак людина не може виробляти багато вітамінів, тому їх потрібно отримувати ззовні. Використання мікроорганізмів, що виробляють вітаміни, може бути гарним рішенням для використання псевдовітамінів, які виробляються хімічним шляхом, і може дозволити виробництво продуктів з більш високим рівнем вітамінів, що може зменшити небажані побічні ефекти. Пробиотичні бактерії, а також комменсальні бактерії, що знаходяться в кишечнику людини, такі як *Lactobacillus* і *Bifidobacterium*, можуть *de novo* синтезувати та постачати вітаміни в організм людини. У людини представники кишкової мікробіоти здатні синтезувати вітамін К, а також більшість водорозчинних вітамінів групи В, таких як кобаламін, фолати, піридоксин, рибофлавін і тіамін [6].

П'ять штамів *Lactobacillus*, KGL2, KGL3A, KGL4, RNS4 і WTS4, були виділені з традиційних ферментованих продуктів на основі рису в Гаро-Хілз, Мегхалая, Індія. Молочнокислі бактерії виробляють необхідні вітаміни, такі як рибофлавін, фолієва кислота, кобаламін, які мають вплив на здоров'я (проти ожиріння, діабетики, протимікробні засоби та профілактика інших хронічних захворювань) людини. Ці вітаміни необхідні для клітинного та метаболічного росту живої системи. Штам KGL3A продемонстрував найвищу продукцію В2 (0,7 мкг/мл), тоді як KGL2 продемонстрував максимальну продукцію В12 (0,05 мкг/мл) через 36 годин. Крім того, WTS4 приписує найвищу продукцію фолієвої кислоти (0,09 мкг/мл) через 24 години [7].

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.20 КР ПЗ</i>					
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>						
<i>Розроб.</i>		<i>Тугарева Т.І.</i>			<b>РОЗДІЛ 1 ОДЕРЖАННЯ ВІТАМІНІВ БІОТЕХНОЛОГІЧНИМ ШЛЯХОМ</b>					
<i>Перевір.</i>		<i>Карлаш Ю.В.</i>						<i>Лім.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Реценз.</i>									11	133
<i>Н. Контр.</i>								<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>								

З Кімчі було виділено штам *L. plantarum* NY7715. Штам продемонстрував дуже високу здатність продукувати рибофлавін порівняно з контрольним штамом завдяки високій експресії генів *ribA*, *ribB*, *ribC*, *ribH* і *ribG*. NY7715 виробляв  $34,5 \pm 2,41$  мг/л рибофлавіну протягом 24 годин без споживання рибофлавіну в середовищі за оптимальних умов росту. Він був здатний виробляти рибофлавін в моделі кишкового середовища *in vitro*. Крім того, коли дефіцит рибофлавіну був індукований у мишей через обмеження в харчуванні, вищі рівні рибофлавіну були виявлені в плазмі та сечі в групі введення NY7715, ніж у контрольній групі [8].

Було досліджена поєднання гліцерину та фруктози в соєвому йогурті для посилення виробництва вітаміну B12 *L. reuteri*. Після серійних експериментів з комбінуванням було підтверджено, що такий біосинтез посилює виробництво вітаміну B12 до 18 мкг/100 мл. Обидві добавки індукували експресію *cobT* і *cbiA* і функціонували, щоб збалансувати окисно-відновну реакцію. Між тим, високий вміст добавок фруктози знижував виробництво вітаміну B12 і пригнічував експресію *cobT* в бактеріях [9].

*L. rossiae* є облігатно гетероферментативною молочнокислою бактерією, яку можна виділити з широкого діапазону середовищ, включаючи закваски, овочі, ферментоване м'ясо та борошно, а також шлунково-кишкового тракту як людей, так і тварин. Штам *L. rossiae* DSM 15814T є однією з невеликої кількості бактерій, які, як відомо, кодують повний *de novo* біосинтетичний шлях вітаміну B12 (на додаток до інших вітамінів групи B, таких як фолат і рибофлавін). Крім того, він має здатність використовувати великий набір джерел вуглецю, характеристика, яка може сприяти адаптації до навколишнього середовища, можливо, дозволяючи штамові здатність заселяти різні ніші [10].

Було ідентифіковано одинадцять ізолятів *Lactobacillus* із традиційних зразків йогурту, які можуть синтезувати декілька вітамінів групи B. Оптимальними умовами для росту *Lactobacillus* були рН 5-6 і температура 37-40°C. *L. paracasei* subsp. *tolerans* JCM 1171 (T) могла синтезувати вітаміни B6 (1566,17 мкг/мл) і B9 (1279,72 мкг/мл). Штам *L. acidophilus* KU продемонстрував

найвищу продукцію вітаміну B3 (522,7 мкг/мл). *L. fermentum* 1 виробляє найбільшу кількість вітаміну B2 (521,7 мкг/мл) [11].

З йогурту було виділено три ізоляти молочнокислих бактерій, а саме *Enterococcus faecium* EF, *E. faecium* Chole1 і *L. pentosus* 7MP, які мають пробіотичний потенціал. Ізоляти EF і Chole1 виробляли хорошу кількість (1 нг/мл) вітаміну B12. Крім того, усі штами володіли гіпохолестеричним ефектом, що робить їх цікавими для виробництва пробіотичних продуктів [12].

Вітамін K2 (менахінон, МК-н) — це жиророзчинний вітамін, який функціонує як кофактор карбоксилази для дозрівання білків, які беруть участь у багатьох життєво важливих фізіологічних процесах у людини. Шість відібраних штамів *Lactococcus lactis* продукували МК-5 до МК-10, з МК-8 і МК-9 як основним варіантом МК. *L. lactis* ssp. *cremoris* MG1363 було обрано для більш детальних досліджень впливу вибраних джерел вуглецю, протестованих у різних умовах зростання на виробництво вітаміну K2 у середовищі M17. Аеробне бродіння з фруктозою як джерелом вуглецю призвело до найвищої питомої концентрації вітаміну K2, яка становила 90 нМ/л [13].

Вітамін K можна використовувати для профілактики серцево-судинних захворювань і остеопорозу, а також як протипухлинний ефект. На жаль, стратегії культивування як у твердому, так і в рідкому стані, які використовуються для виробництва МК-7, стикаються з фундаментальними проблемами експлуатації та масштабування, а також інтенсивними проблемами тепло- та масообміну під час бродіння. Для культивування використовували *Bacillus subtilis* natto NF1. На оптимізованому середовищі концентрації МК-7 можуть досягати  $14,7 \pm 1,4$  мг/л у біоплівкових реакторах [14].

Нещодавно було виділено та охарактеризовано новий бактеріальний штам, що продукує МК-7, *B. velezensis* ND. Кілька недорогих субстратів були використані в культуральному середовищі *B. velezensis* ND, щоб знизити вартість виробництва МК-7. Концентрація МК-7  $43,8 \pm 2,8$  мг/л була отримана з використанням сирого соєвого борошна шляхом рідкої ферментації. Для

покращення виробництва МК-7 порівнювали рідку ферментацію, ферментацію на основі біоплівки і твердофазну ферментацію. Найвищий урожай МК-7 досягнуто на рідкому культивуванні –  $150,0 \pm 4,9$  мг/кг. Були також досліджені асоційовані синтетичні експресії генів під час цих трьох процесів бродіння. Результат показав, що ключові гени *menF*, *menH* і *menG* на шляху синтезу МК позитивно корелюють із збільшенням біосинтезу МК-7 [15].

$\beta$ -каротин є природним функціональним пігментом, який в основному зустрічається в біологічних системах як повністю транс-ізомер. Цей каротиноїд широко використовується у виробництві харчових продуктів, напоїв, кормів для тварин, косметики та фармацевтики. Промислове значення обумовлено його провітаміном А, антиоксидантною та імунomodуючою активністю, а також його захисною дією проти раку та серцево-судинних захворювань. Було перевірено потенціал використання стічних вод обробки зелених оливок в іспанському стилі для природного виробництва  $\beta$ -каротину *Blakeslea trispora*. Культура спарювання, отримана шляхом спільного культивування штамів гетероталічних грибів ATCC 14271 і 14272. У збагачених поживними речовинами стічних водах вироблялася значна кількість  $\beta$ -каротину, що становило 61,2 мг/л (луг) і 64,1 мг/л (промивні води). Перш за все, збагачені потоки мали значний стимулюючий ефект на синтез  $\beta$ -каротину, тому що як максимальний вихід  $\beta$ -каротину на об'єм збагачених стоків, так і питома швидкість виробництва  $\beta$ -каротину були вищими порівняно з відповідними значеннями, отриманими під час випробувань із синтетичним середовищем без додавання стоків [16].

*Mucor circinelloides* накопичує  $\beta$ -каротин як основну каротиноїдну сполуку. Було досліджено здатність двох штамів *M. circinelloides* накопичувати  $\beta$ -каротин в умовах освітлення та темряви. В умовах освітлення виробництво  $\beta$ -каротину було збільшено до  $241,6 \pm 0,53$  мкг/г і  $112,69 \pm 0,97$  мкг/г відразу після 6 годин впливу віпла для CBS 277,49 і WJ11 відповідно. Після цього пігмент поступово накопичувався з приростом біомаси через 48 год, а найвища

концентрація пігменту  $698,4 \pm 3,68$  мкг/г була досягнута через 48 год у CBS 277,49, що в 2,5 рази вище, ніж у WJ11 ( $275 \pm 1,34$  мкг/г) [17].

В табл.1.1. показано звичайні біологічні агенти, які можуть синтезувати різні вітаміни та їх попередники.

### 1.1.2. Рекомбінантні штами

Низькі загальні концентрації вітамінів у природних продуцентах через властиві механізми регулювання або виробничі процеси, засновані на нерегенеративних джерелах вуглецю, призвели до зростання інтересу до створення більш надійних і стійких виробничих платформ. У цьому контексті мікроорганізмам приділяється значна увага як альтернативним джерелам доступу до цих сполук. Наукові досягнення в галузі молекулярної біології та генної інженерії відкрили двері для використання сконструйованих мікроорганізмів для надлишкового виробництва бажаних метаболітів, включаючи вітаміни [18].

Сир, вироблений з *Lactococcus lactis*, є основним джерелом вітаміну K2 у західній дієті. Для синтезу вітаміну K2 (менахінону) використовували *L. lactis* ssp. *cremoris* MG1363. Шляхом клонування та експресії сильних промоторів було виявлено гени та вузькі місця в біосинтетичних шляхах, що ведуть до довголанцюгових менахінонів, МК-8 та МК-9. Було виявлено, що гени *mvk*, *preA*, *menF* і *menA* вносять важливий внесок у рівень менахінону, оскільки одноразова надмірна експресія цих генів подвоює і більш ніж потроює загальний вміст менахінону в культурі. Комбінована надекспресія *mvk*, *preA* та *menA* підвищувала рівень менахінону до вищого рівня, ніж отримано окремо. Коли надпродукційні штами були застосовані для ферментації молока, вміст вітаміну K2 було ефективно збільшено в 3 рази порівняно з диким типом [19].

Рибофлавін або вітамін B2 є попередником основних коферментів флавінмононуклеотиду (FMN) і флавінаденіндинуклеотиду (FAD). Використовуючи *B. infantis* ATCC 15697 як модельний організм для цього шляху, ми виділили спонтанних гіперпродуцентів рибофлавіну, які втратили регуляцію

## Продуценти вітамінів мікробного походження

Вітамін	Біологічний агент	Середовище для синтезу, г/л	Умови культивування	Концентрація вітаміну	Джерело
Рибофлавін (В2)	<i>Lactobacillus</i> KGL3A	Глюкоза – 20, Казамінові кислоти – 10, Аспарагін – 0,6, Цистеїн – 0,2, Триптофан – 0,2, Аденін сульфату– 0,02, Гуанідин гідрохлорид – 0,02, Урацил – 0,02, Ксантин – 0,02, 4-амінобензойна кислота – 0,002, Пантотенат кальцію – 0,0008, Фолієва кислота – 0,0008, Нікотинова кислота – 0,0008, Придоксалю гідрохлорид – 0,004, Придоксаміну гідрохлорид – 0,004, Тіамін гідрохлорид - 0,0004, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> – 1, FeSO <sub>4</sub> – 0,02, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – 1, MgSO <sub>4</sub> – 0,4, MnSO <sub>4</sub> – 0,02, Ацетат натрію – 15, NaCl – 0,02	37 °С, 36 год, рН 7,0	0,7 мкг/мл	[7]

Продовження табл.1.1.

	<i>L. fermentum</i> 1	Глюкоза – 20, Дріжджовий екстракт – 8, Твін-80 – 1, Пептон – 10, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> – 2, Цитрат амонію – 2, Цитрат натрію – 5, MgSO <sub>4</sub> – 0,2, MnSO <sub>4</sub> – 0,4	37 °С, 48 год, рН 5-6	521,7 мкг/мл	[11]
Рибофлавін (B2)	<i>L. plantarum</i> HY7715	Глюкоза – 20, Ксантин – 0,02, 4-амінобензойна кислота – 0,0005, Пантотенат кальцію – 0,0005, Фолієва кислота – 0,0001, Нікотинова кислота – 0,0005, Піридоксин– 0,0005, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> – 1,5, FeSO <sub>4</sub> – 0,02, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – 3,1, MgSO <sub>4</sub> – 0,5, MnSO <sub>4</sub> – 0,02, Твін-80 – 1 Інозин – 0,1, Біотин – 0,0005 Ціанокобаламін – 0,0001, Інозитол - 0,0005 Вітамін С – 0,0001, Всі амінокислоти, крім глутаміну, лейцину, метіоніну і тирозину – 0,2, Глутамін – 0,6, Лейцин – 0,4, Метіонін – 0,1 Тирозин – 0,1	37 °С, 24 год	34,5 ± 2,41 мг/л	[8]

Ціанокобаламін (B12)	<i>Lactobacillus</i> KGL2	Глюкоза – 40, Пептон – 15, Аспарагін – 0,2, Цистеїн хлорид – 0,2, Цистеїн – 0,4, Триптофан – 0,4, Аденін – 0,02, Гуанін – 0,02, Урацил – 0,02, Ксантин – 0,02, 4-амінобензойна кислота – 0,002, Вітамін С – 4, Біотин – 0,00001, Пантотенат кальцію – 0,001, Фолієва кислота – 0,0002, Нікотинова кислота – 0,002, Придоксалю гідрохлорид – 0,004, Придоксаміну гідрохлорид – 0,0008, Рибофлавін – 0,001, Тіамін гідрохлорид - 0,0008, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> – 1, FeSO <sub>4</sub> – 0,02, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – 1, MgSO <sub>4</sub> – 0,4, MnSO <sub>4</sub> – 0,02, Ацетат натрію – 20, NaCl – 0,02	37 °С, 36 год, рН 7,0	0,05 мкг/мл	[7]
	<i>L. reuteri</i> ZJ03	Соя – 100, Глюкоза – 20, Гліцерин – 10, Фруктоза 10	37 °С, 72 год	180,30 ± 5,87 нг/мл	[9]

Ціанокобаламін (B12)	<i>E. faecium</i> EF	Пептон – 10, Дріжджовий екстракт – 5, Яловичий екстракт – 10, Глюкоза – 20, КЗРО4- 2,	37 °С, 48 год	1 нг/мл	[12]
	<i>E. faecium</i> Chole1	Ацетат натрію – 5, MgSO <sub>4</sub> - 0,2, MnSO <sub>4</sub> - 0,05, Твін-80 – 1,08, Цитрат амонію – 2		1 нг/мл	
Фолієва кислота (B9)	<i>Lactobacillus</i> WTS4	Глюкоза – 40, Акіказа – 12, Цистеїн – 0,2, Триптофан – 0,2, Аденін сульфат– 0,02, Гуанідин гідрохлорид – 0,02 Урацил,– 0,02, 4-амінобензойна кислота – 0,0002, Біотин – 0,0000008, Пантотенат кальцію – 0,0004, Піридоксин гідрохлорид – 0,004, Рибофлавін – 0,002, Тіамін гідрохлорид - 0,002, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> – 1, FeSO <sub>4</sub> – 0,02, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – 1, MgSO <sub>4</sub> – 0,4, MnSO <sub>4</sub> – 0,02, Ацетат натрію – 20, NaCl – 0,02 Ніацин – 0,002	37 °С, 24 год, рН 7,0	0,09 мкг/мл	[7]

Фолієва кислота (B9)	<i>Ashbya gossypii</i> ATCC 10895	Дріжджовий екстракт - 2, Пептон - 20, Інозит - 0,6, Глюкоза - 10	28 °С 72 год 250 об/хв	45,17 мкг/л	[5]
Піродоксин (B6)	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i> JCM 1171	Глюкоза - 20, Дріжджовий екстракт - 8, Твін-80 - 1,		1566,17 мкг/мл	[11]
Нікотинова кислота (B3)	<i>L. acidophilus</i> KU	Пептон - 10, К <sub>2</sub> НРО <sub>4</sub> - 2, Цитрат амонію - 2, Цитрат натрію - 5, MgSO <sub>4</sub> - 0,2, MnSO <sub>4</sub> - 0,4	37 °С, 48 год, рН 5-6	522,7 мкг/мл	
Менахінон (K2)	<i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> MG1363	Фруктоза - 5, Казеїновий пептон - 5, Соевий пептон - 5, Яловичий екстракт - 5, Дріжджовий екстракт - 2,5, Вітамін С - 0,5 MgSO <sub>4</sub> - 0,25, С <sub>3</sub> Н <sub>7</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>6</sub> P - 19	30 °С, 48 год, 120 об/хв	0,058 мг/л	[13]
	<i>Bacillus subtilis</i> <i>natto</i> NF1	Гліцерин - 48,2, Дріжджовий екстракт - 8,1, Сойтон - 13,6, К <sub>2</sub> НРО <sub>4</sub> - 0,06	35 °С, 144 год, 200 об/хв	14,7±1,4 мг/л	[14]
	<i>B. velezensis</i> ND	Сире соєве борошно - 160, Дріжджовий екстракт - 12, Гліцерин - 50, К <sub>2</sub> НРО <sub>4</sub> ·3Н <sub>2</sub> O - 0,7, СаCl <sub>2</sub> - 0,2, NaCl - 9.	37 °С, 168 год, 200 об/хв	43,8 ± 2,8 мг/л	[15]

Провітамін А	<i>B. trispora</i> 14271 і 14272	Луг від переробки зелених оливок Глюкоза - 50, Гідролізат казеїнової кислоти - 2, Дріжджовий екстракт - 1, L-аспарагін - 2, КН <sub>2</sub> Р <sub>04</sub> - 1,5 Тіаміну гідрохлорид -0,005, Span 20 – 10 Твін 80 - 1	25 °С, 144 год, 160 об/хв, рН 7	61,2 мг/л	[16]
	<i>M. circinelloides</i> CBS 277.49	Глюкоза - 80, Тартрат амонію – 2, КН <sub>2</sub> Р <sub>04</sub> - 7, Na <sub>2</sub> HP <sub>04</sub> - 2, MgS <sub>04</sub> ·7H <sub>2</sub> O – 1,5, Дріжджовий екстракт – 1,5, CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O – 0,1, FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O – 0,008, ZnS <sub>04</sub> ·7H <sub>2</sub> O – 0,001, CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O – 0,0001, MnS <sub>04</sub> ·5H <sub>2</sub> O – 0,0001, Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O – 0,0001	28 °С, 48 год, 700 об/хв, рН 7	9 мг/л	[21]
		Глюкоза - 80, Тартрат амонію – 2, КН <sub>2</sub> Р <sub>04</sub> - 7, Na <sub>2</sub> HP <sub>04</sub> - 2, MgS <sub>04</sub> ·7H <sub>2</sub> O – 1,5, Дріжджовий екстракт – 3,2, CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O – 0,1, FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O – 0,008, ZnS <sub>04</sub> ·7H <sub>2</sub> O – 0,001, CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O – 0,0001, MnS <sub>04</sub> ·5H <sub>2</sub> O – 0,0001, Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O – 0,0001 Церуленін – 0,01 Кетоконазол – 0,15	28 °С, 72 год, 150 об/хв, рН 7	4,26 мг/л	[17]

транскрипції генів, необхідних для біосинтезу рибофлавіну. Серед них було показано, що один мутант допускає вивільнення рибофлавіну в середовище до концентрації 60,8 нг/мл [20].

Комерційне виробництво рибофлавіну з *B. subtilis* було розроблено шляхом поєднання раціонального та класичного розвитку штамів протягом майже двох десятиліть, проте ще досі ведуться дослідження щодо створення надсинтезуючого штаму. При комбінованому використанні інтегрованого геномного та транскриптомного аналізу генетичної основи надлишкової продукції рибофлавіну вдалося виявити позитивні мутації в продуценті рибофлавіну *B. subtilis* 24/pMX45, отриманому шляхом мутагенезу, секвенування всього генома та секвенування транскриптомів. Серед них *RibC*, *ribD+*, *PurA*, *CcpN*, *YvrH*. Повторне введення цих специфічних мутацій у штам дикого типу відновило фенотип надлишкового виробництва рибофлавіну, а подальша метаболічна інженерія значно покращила виробництво рибофлавіну, досягнувши до 3,4-кратного збільшення титру рибофлавіну порівняно з секвенованим продуцентом. Мутація *YvrH*, залучена до типової двокомпонентної регуляторної системи, дерегулювала шлях синтезу пурину *de novo* та збільшила пул внутрішньоклітинних метаболітів пурину, що, у свою чергу, збільшило виробництво рибофлавіну [22].

L-аскорбінова кислота природним чином синтезується в рослинах з D-глюкози. Дріжджі здатні синтезувати L-аскорбінову кислоту, лише якщо їх культивують у присутності одного з її попередників: L-галактози, L-галактоно 1,4-лактону або L-гулоно 1,4-лактону, екстрагованого з рослин або тварин. Щоб уникнути живлення культури дріжджів цим «L» енантіомером, було створено *Kluyveromyces lactis* з генами шляху біосинтезу L-галактози: GDP-манноза 3,5-епімераза (GME), GDP-L-галактозофосфорилаза (VTC2) і L-галактоза -1-фосфат фосфатаза (VTC4), виділена з *Arabidopsis thaliana*. Рекомбінантні дріжджі були здатні виробляти близько 30 мг/л L-аскорбінової кислоти за 48 годин культивування при культивуванні на багатому середовищі з 2% (мас./об.) D-

галактози. Також, було оцінено виробництво вітаміну С, культивуючи рекомбінантні рекомбінантні штами в сироватці, відходах виробництва сиру, як альтернативне джерело лактози, проте результати такого синтезу є дуже посередніми (максимальний синтез вітаміну – 13 мг/л) [23].

Було сконструйовано нитчастий гриб *Aspergillus niger* для перетворення D-галактуронової кислоти в L-аскорбінову кислоту. У створеному шляху була використана нативна активність D-галактуронатредуктази, тоді як ген, що кодує другий фермент у грибковому шляху D-галактуронової кислоти, L-галактонатспоживаюча дегідратаза, був видалений. Було виявлено два гетерологічних гени, що кодують ферменти шляху L-аскорбінової кислоти рослин – L-галактоно-1,4-лактонлактоназу з *Euglena gracilis* (*EgALase*) і L-галактоно-1,4-лактондегідрогеназу з *Malpighia glabra* (*MgGALDH*), які було введено в штам *A. niger*. Альтернативно, неспецифічну L-гулоно-1,4-лактонлактоназу (*smp30*) з тваринного шляху L-аскорбінової кислоти було введено в штам грибів замість рослинної L-галактоно-1,4-лактонлактонази. Одержаний штам був здатний виробляти L-аскорбінову кислоту з чистої D-галактуронової кислоти або багатой на пектин біомаси в консолідованому біопроекті. Були досягнуті титри продукту до 170 мг/л [24].

Вітамін А є важливим для людини мікроелементом і відіграє вирішальну роль у зорі, репродуктивній функції, імунній системі та здоров'ї шкіри. Сучасні промислові методи виробництва вітаміну А засновані на хімічному синтезі з нафтових субстратів, таких як ацетон і ацетилен. Нещодавно було розроблено біотехнологічний метод виробництва вітаміну А. Було сконструйовано *Saccharomyces cerevisiae* для виробництва вітаміну А з ксилози, за допомогою введення біосинтетичного шляху β-каротину та гена, що кодує β-каротин 15, 15'-діоксигеназу (BCMO) у *S. cerevisiae*, що ферментує ксилозу. Отриманий штам дріжджів продукував вітамін А з ксилози в титрі, що в чотири рази перевищував титр з глюкози. Періодична ферментація ксилози з екстракцією додеканом *in situ*

досягла кінцевого титру 3350 мг/л вітаміну А, який складався з ретиналю (2094 мг/л) і ретинолу (1256 мг/л) [25].

*Env9* було виявлено як ендogenous редуктазу сітківки, і її активність перевірена *in vitro*. Завдяки спільній експресії *Env9* з *E. coli* у *bbO* в *E. coli* BL21 було отримано 443,43 мг/л ретинолу з чистотою 98,76% у двофазній культурі у струшувальних колбах, коли додавався антиоксидант бутильований гідрокситолуол для запобігання деградації ретиноїдів. Титр ретинолу досяг 2479,34 мг/л при періодичній ферментації з підживленням [26].

Різноманітні фізіологічні функції токотрієнолів вважають їх цінними добавками до продуктів вітаміну Е, у яких домінує  $\alpha$ -токоферол. Щоб зробити токотрієноли більш доступними, *S. cerevisiae*, що продукує токотрієноли, було сконструйовано шляхом поєднання гетерологічних генів фотосинтезуючих організмів з ендogenous шикікатним шляхом і мевалонатним шляхом. Після ідентифікації та усунення метаболічних вузьких місць і збільшення постачання прекурсорів сконструйовані дріжджі можуть виробляти токотрієноли з виходом до 7,6 мг/г маси сухої клітини. Для подальшого вирішення конфлікту між ростом клітин і накопиченням токотрієнолів, щоб забезпечити ферментацію з високою щільністю, розроблено систему контролю температури, що запускається холодним шоком, для ефективного контролю двостадійної ферментації, що призводить до виробництва 320 мг/л токотрієнолів [27].

Відомо, що флавіногенні дріжджі *Candida famata* здатні здійснювати гіперпродукцію рибофлавіну в умовах дефіциту заліза, але регуляція цього процесу залишається невідомою. Показано, що делеція гена *SEF1* (кодує активатор транскрипції) блокує здатність до гіперпродукції рибофлавіну в умовах дефіциту заліза. Було визначено, що промотори *SEF1* інших флавіногенних дріжджів (*C. albicans* і *C. tropicalis*), злиті з *SEF1* відкриті рамки зчитування *C. famata*, можуть відновити гіперпродукцію рибофлавіну в мутанті *sef1Δ*. Порушення гена *VMA1* (кодує субодиницю А вакуолярної АТФази) призвело до надлишку рибофлавіну в *C. famata* в середовищі з повним вмістом заліза [28].

Синтез попередника вітаміну D3 7-дегідрохолестеролу (7-DHC) шляхом мікробної ферментації привернув велику увагу завдяки своїм перевагам захисту навколишнього середовища. Було створено рекомбінантний штам *S. cerevisiae* було для біосинтезу 7-DHC *de novo*. Сім основних генів (шість ендогенних генів і один гетерологічний ген) були надмірно експресовані, а ген *ROX1* (гем-залежний репресор гіпоксичних генів) був нокаutowаний. Отриманий штам продукував 82,6 мг/л 7-DHC з глюкози. Нокаут гена *GDH1* збільшив титр 7-DHC з 82,6 до 101,5 мг/л. Далі транспозон *Ty1* у *S. cerevisiae* був застосований для збільшення копій гена *ERG1* та гена *DHCR24*, що призвело до збільшення титру 7-DHC на 120% до 223,3 мг/л. Для оптимізації розподілу метаболічного потоку була використана система інтерференції CRISPRi для динамічного інгібування конкурентного шляху, а також перевірено найкраще місце зв'язування промотора *ERG6*. Значення OD600 регульованих *ERG6* клітин зросло на 43%, ніж при прямому нокаутуванні *ERG6*, а титр 7-DHC збільшився до 365,5 мг/л при постійному перемішуванні. При поєднанні усіх вищенаведених методів, титр 7-DHC досяг 1328 мг/л у 3-л біореакторі [29].

7-Дегідрохолестерин (7-DHC) привертає все більше уваги через його велику медичну цінність і зростання попиту на ринку вітаміну D3, який каталізується ультрафіолетом. Підвищення сумісності між гетерологічним шляхом і клітиною-хазяїном має вирішальне значення для реалізації мікробного надлишкового виробництва природних продуктів зі складною структурою та відносно довгим шляхом. Для синтезу попереднику вітаміну D було надмірно експресовано всі гени шляху мевалонату (*ERG10*, *ERG13*, *tHMG1*, *ERG12*, *ERG8*, *ERG19*, *IDII*, *ERG20*) в *S. cerevisiae*. Після цього вироблення 7-DHC було покращено на 48,3% (до 250,8 мг/л) шляхом видалення *NEM1*, який брав участь у метаболізмі ліпідів. Згодом виробництво 7-DHC досягло 1,07 г/л у 5-літровому біореакторі [30].

Ергостерол є важливим прекурсором у фармацевтичній промисловості для виробництва багатьох ліків, в тому числі він є превітаміном D2. Було досліджено

вплив транскрипційних факторів *UPC2*, *MOT3* і *ROX1* *K. marxianus* на синтез ергостерину. Штам із надмірною експресією *Urc2* продукував у 1,78 рази більше ергостеролу (167,33 мг/л), ніж штам дикого типу (60,04 мг/л). Загалом було вироблено 239,98 мг/л ергостеролу, коли глюкозу замінили фруктозою, щоб обмежити виробництво етанолу. Посилена аерація підвищила титр ергостеролу з 63,09 мг/л до 128,46 мг/л при 42 °С. Титр ергостеролу досяг 304,37 мг/л у струшуваній колбі при 37 °С або 1124,38 і 948,32 мг/л при 37 °С і 42 °С відповідно в біореакторі на 5 л, використовуючи бульби топінамбура як єдине джерело вуглецю [31].

В табл.1.2. показано рекомбінантні штами мікроорганізмів, здатних до синтезу вітамінів та їх попередників.

## **1.2. Біотехнологічні особливості одержання вітамінів**

Джерело вуглецю є найбільш вивченим параметром впливу на каротиногенез. Глюкоза та інші ферментовані цукру метаболізуються гліколітичним шляхом, а потім спиртовим бродінням, навіть з киснем. Багато авторів відзначають, що джерела вуглецю, такі як етанол, провокують посилення синтезу пігментів. Світло є важливим фактором, який слід враховувати під час виробництва мікробних каротиноїдів. Мікроорганізмам необхідно захищатися від світла, яке викликає пошкодження, а каротиногенез є фотозахисним механізмом. Температура є ще одним параметром, який слід враховувати при виробництві каротиноїдів. Вона впливає на ріст клітин і виробництво метаболітів, змінює шляхи біосинтезу, включаючи каротиногенез. Аерація є ще одним важливим параметром, оскільки каротиногенез є аеробним процесом, а швидкість повітряного потоку є важливим фактором для засвоєння субстрату для швидкості росту, клітинної маси та каротиногенезу. Було також показано, що іони та солі металів (Ba, Fe, Mg, Ca, Zn і Co) є стимуляторами виробництва каротиноїдів [32].

Флавіногенна активність штамів дуже залежить від температури культивування, помітно знижуючись при 38°C. Було припущено, що при підвищених температурах активується специфічний репресор біосинтезу

рибофлавіну. Взаємодія ендogenous рибофлавіну зі світлом викликає окислювальне пошкодження ДНК у клітинах через появу активних форм кисню (АФК) із збільшенням вироблення рибофлавіну. Надсинтез рибофлавіну може бути

## Рекомбінантні штами-продуценти вітамінів

Вітамін	Біологічний агент	Гени, що експресуються	Середовище для синтезу, г/л	Умови культивування	Концентрація вітаміну	Джерело
Менахінон (K2)	<i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> MG1363	<i>mvk</i> , <i>preA</i> , <i>menF</i> і <i>menA</i>	Молоко як середовище Нівін – 0,0000002	30 °С, 20 год	500 нг/мл	[19]
Рибофлавін (B2)	<i>B. infantis</i> ATCC 15697	<i>ribD</i>	Фруктоолігосахариди – 10, Казамінові кислоти -10, Ацетат натрію – 10, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> – 5, Сечовина – 2, MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O - 0,2, FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O - 0,01, MnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O - 0,007, NaCl - 0,01, Твін 80 - 1 г, Цистеїн - 0,5	37 °С, 48 год, рН 7,0	60,8 нг/мл	[20]
	<i>B. subtilis</i> 168	<i>RibC</i> , <i>ribD</i> <sup>+</sup> , <i>PurA</i> , <i>CspN</i> , <i>YvrH</i>	Глюкоза – 10, Пептон – 10, Дріжджовий екстракт – 5, NaCl - 5	41 °С, 72 год, 240 об/хв	1211,79±38,47 мг/л	[22]
	<i>C. famata</i> VKMY-9	<i>VMA1</i>	Пептон – 10, Дріжджовий екстракт – 10, Глюкоза – 20, Лейцин – 0,04	30 °С, 120 год	54,00 ± 1,95 мг/л	[28]
Фолієва кислота (B9)	<i>A. gossypii</i> ATCC 10895	<i>AgMET7</i> , <i>AgRIB1</i> , <i>AgRIB7</i> , <i>AgGPD1</i>	Дріжджовий екстракт - 2, Пептон - 20, Інозит – 0,6, Глюкоза – 10, Пара-амінобензойна кислота – 0,02	28 °С 72 год 250 об/хв	6595 мкг/л	[5]
Аскорбат (C)	<i>K. lactis</i> CBS2359	<i>GME</i> , <i>VTC2</i> , <i>VTC4</i>	Галактоза – 20, Дріжджовий екстракт – 3, Пептон – 10	30 °С, 48 год, 200 об/хв	14,4 мг/л	[23]

Аскорбат (С)	<i>A. niger</i> ATCC 1015	<i>EgALase</i> <i>MgGALDH</i> <i>smр30</i>	Відходи переробки висушених цитрусових – 40	28 °С, 96 год, 200 об/хв	170 мг/л	[24]
Ретинол (А)	<i>S. cerevisiae</i> SR8	<i>crtE, crtI, crtYB</i>	Ксилоза – 20, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> – 15, КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub> – 8, MgSO <sub>4</sub> – 3, Додекан - 25	30 °С, 96 год, 300 об/хв, рН 5,5	3350 мг/л	[25]
	<i>E. coli</i> BL21	<i>Env9</i>	Пептон – 10, Дріжджовий екстракт – 3, Глюкоза – 10, FeSO <sub>4</sub> – 0,22, Додекан - 25	30 °С, 120 год, 220 об/хв	2479,34 мг/л	[26]
β-Каротин (превітамін А)	<i>S. cerevisiae</i> CEN.PK2-1с	<i>crtE, crtYB, crtI</i>	Глюкоза - 450, КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub> - 15, MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O – 5,5, Казамінові кислоти – 1,125	30 °С, 80 год, 200-500 об/хв рН 5	750 мг/л	[33]
Токоферол (Е)	<i>S. cerevisiae</i> BY4741	<i>GAL4, GAL80,</i> <i>GAL4M9</i>	Дріжджовий екстракт – 15, Кукурудзяний екстракт – 25, Глюкоза - 30	30 °С, 150 год, 300-600 об/хв, рН 5,5	320 мг/л	[27]
7- дегідрохолестерол (попередник D3)	<i>S. cerevisiae</i> CEN.PK2-1D	<i>ERG10,</i> <i>ERG13,</i> <i>tHMG1,</i> <i>ERG12, ERG8,</i> <i>ERG19, IDII,</i> <i>ERG20</i>	Пептон – 20, Дріжджовий екстракт – 10, Глюкоза – 40, Галактоза - 10	30 °С, 250 год	1,07 г/л	[30]
Ергостерол (попередник D2)	<i>S. cerevisiae</i> ZTW1	<i>ERG1, ERG9,</i> <i>ERG11</i>	Гідролізат кукурудзяного борошна (містить 265,2 г/л глюкози)	33 °С, 65 год,100 об/хв, рН 5,5	60 мг/л	[34]

викликане екологічним стресом, наприклад, аліментарним або окислювальним стресом. Позитивними ефекторами регуляції є також іони заліза, іноді й інших металів (кобальт, хром, цинк, магній). Деякі види дріжджів надмірно виробляють рибофлавін у середовищах, що містять н-алкани як єдине джерело вуглецю. Вихід рибофлавіну також помітно залежить від типу та початкових концентрацій джерел вуглецю та азоту, а також від додавання первинних або проміжних попередників для біосинтезу. Регуляція метаболізму шляхом додавання структурних аналогів метаболітів (антиметаболітів), що пригнічують метаболічні реакції, використовується для пошуку лімітуючих етапів біосинтезу та шляхів їх подолання, включаючи розвиток стійкості штаму до антиметаболітів (наприклад, туберцидин, ітаконат, оксалат, амінометилфосфона кислота, розеофлавіну) [35].

Природні форми вітаміну B12, синтезуються лише прокариотами (через аеробні/анаеробні шляхи та/або шляхи відновлення), які необхідні як основні кофактори для двох ферментів: цитозольного метіонінсинтази і мітохондріального метилмалоніл-синтази. У бактерій список B12-залежних ферментів доповнюється гліцеролдегідратазою та етаноламінамоніакліазою для анаеробного бродіння гліцерину, пропандіолів та етаноламіну; аміномутази для перетворення амінокислот; рибонуклеозиддифосфатредуктази для синтезу ДНК. Більша частина форм вітаміну B12 не стійкі до світла. З цієї причини майже всі комерційні продукти з вітаміном B12 (порошок, таблетки, капсули або гранули), які мають довший термін зберігання, виробляються у вигляді стійкої на повітрі форми ціанокобаламіну. Додавання попередників 5-амінолевулінової кислоти і 5,6-диметилбензимідазолу, а також іонів кобальту, які беруть участь у каталізі, мають велике значення для синтезу вітаміну B12 [36].

Донедавна процес Рейхштайна-Грюсснера, розроблений у 1933 році, був основним промисловим маршрутом синтезу вітаміну C. Тут D-сорбітол перетворюється на L-аскорбінову кислоту за допомогою 2-кетол-гулонової кислоти як основного проміжного продукту за допомогою біоокислення

*Gluconobacter oxydans* і кількох хімічних етапів. Сьогодні процеси промислового виробництва використовують додаткові етапи біоокислення з *Ketogulonicigenium vulgare* як біокатализатор для перетворення D-сорбіту на 2-кето-L-гулонову кислоту. Нещодавно були виявлені нові ферменти, які генерують L-аскорбінову кислоту безпосередньо шляхом окислення L-сорбозону, проміжного продукту біоокислення D-сорбіту до 2-кето-L-гулонової кислоти [37].

Діапазон 28–45 °C (оптимум – 40 °C) часто використовується для виробництва менахінону (вітамін K<sub>2</sub>). Виробництво менахінону потребує як вуглеводів, так і джерел азоту. В загальному, для синтезу вітаміну K<sub>2</sub> глюкоза, декстрин і гліцерин використовуються як основні джерела вуглецю, тоді як соєвий пептон і дріжджовий екстракт є одними з часто використовуваних джерел азоту для. Вважається, що соєвий пептон, дріжджовий екстракт і гліцерин мають значний вплив на посилення виробництва менахінону [38].

### **1.3. Аналоги вітамінів мікробного походження та їх біотехнологічний синтез**

Відомо порівняно небагато природних аналогів рибофлавіну. Кофактор F420 і молібдоптерини подібні до RF і зустрічаються в різних групах організмів як активні каталітичні кофактори. Особливої уваги заслуговує аналог розеофлавін, оскільки це єдиний відомий природний аналог флавіну з антибіотичною активністю. Розеофлавін продукується грамположитивною бактерією *Streptomyces davawensis*. Він міститься в супернатанті *S. davawensis*, що росте на культуральному середовищі крохмалем, і його легко ідентифікувати за характерним червоним кольором. На відміну від розеофлавіну, прямі попередники 8-деметил-8-аміно-рибофлавін (AF) і 8-деметил-8-диметиламіно-рибофлавін (MAF) було знайдено в цитоплазмі *S. davawensis*. Конструктивно. Розеофлавін, MAF і AF виявляють антимікробну активність проти грамположитивних бактерій, таких як *B. subtilis*, а також проти грамнегативних бактерій. Встановлено, що мінімальна інгібуюча концентрація розеофлавіну становить 1,56 г/мл для *B. subtilis* і варіює від 0,25 до 6,25 г/мл для *Staphylococcus aureus*. Крім того, сполука

активна проти *B. cereus*, *B. cereus* var. *mycoides* і *Micrococcus luteus* (*Sarcina lutea*) [39].

Кобаламін та його аналоги разом називаються кобамідами (і також відомі як кориноїдні кофактори). Мікроби кишківника людини можуть виробляти аналоги B12, такі як псевдокобаламін *L. coryniformis* CRL 1001. Існують й флуоресцентні похідні кобаламіну (флуорофори, прикріплені до позиції рибози). Аналоги вітаміну B12 можуть синтезувати *Sulfitobacter* sp., *Ruegeria pomeroyi*, *Aliivibrio fischeri*, *Nitrosopumilus* sp., *Prochlorococcus* sp. та *Synechococcus* sp. [40].

Природні та синтетичні аналоги ретинолу, звані ретиноїдами, як правило, асоціюються з диференціюванням клітин за допомогою ретиноевої кислоти, яка є найпотужнішим метаболітом ретинолу [41]. Ретиноїди є як плейотропними групами, включаючи вітаміни, так і гормони. Ретинол (який є спиртовим) і альдегід (ретиналь) часто називають попередньо сформованим вітаміном А. Ретиналь *in vivo* перетворюється на ретиноеву кислоту, метаболіт вітаміну А, необхідний для транскрипції генів. Ретиналь, ретиноева кислота та інші родичі називаються ретиноїдами, тоді як  $\beta$ -каротин та інші каротиноїди, які перетворюються в тканинах на ретинол, відомі як каротиноїди провітаміну А. Ретиноїди означають хімічні речовини, які мають фізіологічну схожість з природним вітаміном А, але не обов'язково мають однакову структурну формулу, тому вони вважають аналогами вітаміну А [42]. В загальному аналоги вітаміну А добувають з різноманітних грибів, в тому числі *Fusarium*, але наразі все частіше для цих цілей використовують генно-інженерні штами [43,44].

Активна форма вітаміну D3, 1,25-дигідроксивітамін D3, є основним регулятором гомеостазу кісток і кальцію. Крім того, цей гормон також пригнічує проліферацію і стимулює диференціювання нормальних і злоякісних клітин. Одним із прикладів такого аналога з хорошим коефіцієнтом дисоціації є кальципотріол (Daivonex®), який клінічно використовується для лікування гіперпроліферативного шкірного захворювання псоріазу. Інші аналоги вітаміну D були клінічно схвалені для лікування остеопорозу або вторинного

гіперпаратиреозу. На даний момент всі аналоги вітаміну D – є синтетичними продуктами та не виробляються біотехнологічним шляхом. Парикальцитол і доксеркальциферол є аналогами вітаміну D2 для застосування при вторинному гіперпаратиреозі. У Японії фалекальцитріол і максакальцитол також використовуються для лікування цього захворювання. Такальцитол, кальципотріол використовуються як монотерапія для лікування псоріазу. До аналогів вітаміну D3 відносять альфакальцидол і ельдекальцитол [45].

В табл.1.3. показано біосинтез аналогів мікробних вітамінів

## Продуценти аналогів вітамінів мікробного походження

Вітамін/аналог	Біологічний агент	Середовище для синтезу, г/л	Умови культивування	Концентрація аналогу	Джерело
Рибофлавін (B2)/ Розофлавін	<i>Corynebacterium glutamicum</i> RML5	Настій з мозкового серця – 6, Пептон – 6, NaCl – 5, Глюкоза – 40, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> – 2,5, IPTG – 0,06	Анаеробне культивування, 30 °С, 14 днів, 200 об/хв	0,7 мг/л	[46]
	<i>S. davaonensis</i> RML7	Дріжджовий екстракт – 2, Крохмаль – 10	30 °С, 14 днів, 200 об/хв	14 мг/л	
Кобаламін (B12)/ Псевдокобаламін	<i>L. reuteri</i> DSM20016	Глюкоза – 1, Яловичий екстракт – 1,5, Пептон – 6, Панкреатичний перевар казеїну – 4, Дріжджовий екстракт - 3	Анаеробне культивування, 30 °С, 24 год, Статичні умови	0,18 мг/л	[47]
	<i>L. coryniformis</i> CRL 1001	Пептон – 10, Дріжджовий екстракт – 5, Яловичий екстракт – 10, Глюкоза – 20, КЗРО <sub>4</sub> - 2, Ацетат натрію – 5, MgSO <sub>4</sub> - 0,2, MnSO <sub>4</sub> - 0,05, Твін-80 – 1,08, Цитрат амонію – 2	37 °С, 12-18 год, Статичні умови	0,94 мкг/мл	[48]

Кобаламін (B12)/ Псевдокобаламін	<i>L. coryniformis</i> CRL 1001	Глюкоза – 10, CH <sub>3</sub> COONa - 2, Твін - 80 - 1, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ×H <sub>2</sub> O - 1,75 , KCl - 0,75 MnSO <sub>4</sub> ×H <sub>2</sub> O - 0,0077, MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O - 0,2 Глюконат натрію - 10, р-амінобензойна кислота – 0,0004, Піродоксаль – 0,0005, Нікотинова кислота – 0,001 Фолієва кислота – 0,0002, Пантотенат – 0,001, Рибофлавін - 0,001, Тіамін - 0.001, Аденін 0,00005 Гуанідин – 0,0001 Урацил - 0,0001, Всі амінокислоти – по 0,05, CoCl <sub>2</sub> – 0,00025	37 °С, 12-18 год, Статичні умови	5,6 ± 0,5 мкг/мл	[49]
	<i>L. reuteri</i> CRL 1098	Ксилоза – 15, Глюкоза – 760, Дріжджовий екстракт – 12, Триптон – 6, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> – 6, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O – 12,5, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – 2,5, MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O – 3,5, Глутамат – 1, Пара-Амінобензойна кислота – 0,3		20 год, 37 °С, 220 об/хв	

Фолат (B9)/ 5-метилтетрагідрофолат	<i>E. coli</i> BL21-WL	Дріжджовий екстракт - 24, Пептон - 12, Гліцерин - 4, КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub> – 12,5, К <sub>2</sub> НРО <sub>4</sub> – 2,3, ІПТГ – 0,19	25 °С, 16 год 220 об/хв	1,24 мг/л	[51]
Ретинол (А)/ретиаль	<i>S. cerevisiae</i> JS-CE1	Глюкоза – 20, Дріжджова основа без амінокислот – 6,7	37 °С, 120 год	69,13 мг/л	[52]
Ретинол (А)/ретиноєва кислота	<i>E. coli</i> MG1655	Гліцерин - 20 Триптон - 12, Дріжджовий екстракт - 24, КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub> – 23,13, К <sub>2</sub> НРО <sub>4</sub> - 125	30 °С, 24 год, 250 об/хв	3,46 ± 0,16 мг/л	[53]

## РОЗДІЛ 2

### ВИКОРИСТАННЯ ВІТАМІНІВ МІКРОБНОГО ПОХОДЖЕННЯ

#### 2.1. Сфери застосування вітамінів мікробного походження

Потреба у вітаміні А надзвичайно висока під час серйозних травм або стресу. Опіки, переломи та навіть планові операції можуть призвести до зниження рівня вітаміну А, ретинолзв'язуючого білка, ретинілових ефірів і  $\beta$ -каротину в сироватці крові. Крім того, запаси вітаміну А в печінці можуть бути виснажені великими дозами кортикостероїдів. Дефіцит вітаміну А уповільнює загоєння ран і швидко виникає у тяжко травмованих пацієнтів, особливо постраждалих від опіків. Вітамін А відомий своєю здатністю стимулювати ріст епітелію, фібробластів і грануляційної тканини. Крім того, на початку запальної фази вітамін А полегшує диференціацію епітеліальних клітин у відкритих ранах шляхом збільшення кількості моноцитів і макрофагів і, таким чином, діє як протизапальний засіб. Інгібуючий ефект вітаміну А на процес епідермальної диференціації, забезпечує основу для терапевтичного використання ретиноїдів при захворюваннях шкіри, при яких кератинізація неорганізована. Присутність ретиноїдів є важливою для індукції або підтримки диференціювання кератиноцитів від базального до рогового шару, що призводить до різних шарів епідерміс [54].

Вітамін С розглядався як пояснення цинги, яка вважалася захворюванням сполучної тканини, оскільки багато симптомів, таких як погане загоєння ран, передбачали вирішальний вплив на сполучну тканину. Тому загальноприйнята точка зору в медицині розглядала вітамін С як вітамін, що зберігає цілісність сполучних тканин. Вітамін С є антиоксидантом. Таким чином, будь-які ефекти вітаміну С можуть бути найбільш помітними в умовах, коли окислювальний стрес підвищений. Багато інфекцій призводять до активації фагоцитів, які виділяють окислювачі, що називаються активними формами кисню (АФК). Вони

вдіграють					НУХТ БТЕК 02.02.20 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Тугарєва Т.І.				РОЗДІЛ 2 ВИКОРИСТАННЯ ВІТАМІНІВ МІКРОБНОГО ПОХОДЖЕННЯ	Лім.	Арк.	Аркушів
Перевір.	Карлаш Ю.В.						36	133
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							

певну роль у процесах, які призводять до дезактивації вірусів і знищення бактерій. Контрольовані дослідження показали, що вітамін С скорочує та полегшує застуду та запобігає застуді за певних умов і в обмежених підгрупах населення. П'ять контрольованих досліджень виявили значний ефект вітаміну С проти пневмонії. Також, вітамін С використовують для лікування захворювань шкіри [55].

Антипроліферативний ефект вітамінів D на ракові клітини відомий з 1981 року і був підтверджений у більшості нормальних і ракових клітин з інгібуванням клітинного циклу на стадії G1. Більш злоякісні клітини можуть втратити свою чутливість до 1,25(OH)<sub>2</sub>D через різні механізми, такі як втрата експресії рецептора вітаміну D або втрата пострецепторної сигналізації. Існує велика кількість літератури про зв'язок між впливом ультрафіолету або статусом вітаміну D і великою кількістю ракових захворювань. У звіті Міжнародного агентства з дослідження раку, спонсорованого Всесвітньою організацією охорони здоров'я, було зроблено висновок, що низький рівень вітаміну D пов'язаний із вищим ризиком раку кишечника. На жаль, існує лише кілька клінічних досліджень, які стосуються питання статусу вітаміну D і раку, що вказує на те, що дослідження не змогли виявити істотного впливу на захворюваність на рак після прийому добавок вітаміну D [56,57].

Зв'язок між вітаміном D і аутоімунними захворюваннями припускається в генетичних дослідженнях, де поліморфізм генів, залучених до метаболізму вітаміну D, пов'язаний з аутоімунними захворюваннями, такими як діабет 1 типу та розсіяний склероз. Дані *in vitro* та моделі на тваринах підтверджують потенційну роль системи, оскільки дефіцит вітаміну D призводить до більшої поширеності аутоімунних захворювань, тоді як лікування високими дозами вітаміну D або його аналогів запобігає аутоімунним захворюванням. Епідеміологічні дослідження на людях підтверджують такий зв'язок, але інтервенційні дослідження поки що не показали профілактичних ефектів [56,57].

Існує значний зв'язок між низькими рівнями 25ОНD і серцево-судинними ризиками та подіями, але рівні вище 25 нг/мл не покращують потенційну користь.

Останні клінічні дослідження щодо прийому добавок вітаміну D також не змогли продемонструвати сприятливий вплив на серцево-судинні фактори ризику або події. Навіть для добре вивченої кінцевої точки, такої як артеріальна гіпертензія, справедливий той самий висновок, тобто дані сильного зв'язку, але суперечливі результати. Пацієнти з хронічними захворюваннями нирок, яка, як відомо, пов'язана з дефіцитом як 25ОНD, так і 1,25(ОН)2D, мають високий ризик смертності від серцево-судинних захворювань. Ці ризики можна зменшити шляхом лікування метаболітом або аналогами вітаміну D, але надлишок вітаміну D також є основним ризиком кальцифікації судин у цих пацієнтів [56,57].

Дефіцит рибофлавіну вважається фактором ризику раку в цілому, хоча це не було задовільно встановлено та доведено на людях. Рибофлавін у високій дозі може пригнічувати життєздатність клітин і має значне зниження рівня рецептора фактора некрозу пухлини 1 (TNFR1) у клітинах 786-O. Рибофлавін має сильний інгібуючий ефект на утворення метастазів меланоми. Крім того, вітамін, ймовірно, знижує ризик колоректального раку серед жінок [58].

Дослідження вказують на позитивний вплив вітаміну B2 у профілактиці мігрені, оскільки вважається, що він відіграє потенційну роль завдяки своїм характеристикам. Клінічне дослідження показало, що рибофлавін є ефективним і недорогим профілактичним засобом у дітей і підлітків, які страждають від мігрені. У дослідженні хворих на мігрень вітаміну B2 у поєднанні з ліхоманкою та магнієм показали значне зменшення кількості нападів мігрені, днів мігрені та індексу мігрені в 3-місячному дослідженні. Утворення катаракти є результатом агрегації білків, що викликає помутніння кришталика. Споживання B2 з їжею та харчовими добавками було пов'язане зі зниженням ризику помутніння ядерної лінзи. Висока доза вітаміну, 400 мг/добу, має профілактичний ефект або деякий сприятливий вплив на розвиток вікової катаракти [58].

Передменструальний синдром (ПМС) - це стан, який відноситься до комплексу фізичних і психологічних симптомів, які виникають під час лютеїнової фази менструального циклу та зникають, коли починається менструація. Збільшення споживання рибофлавіну з харчових джерел було пов'язане зі

зниженням ризику ПМС. Встановлено, що споживання 2,52 мг вітаміну на день призводить до зниження ризику розвитку ПМС на 35% порівняно із споживанням 1,38 мг на день. Рибофлавін сприяє утворенню клітин крові, оскільки відіграє роль в еритропоезі, покращує засвоєння заліза та допомагає в мобілізації феритину з тканин. Концентрацію гемоглобіну вдалося збільшити за допомогою добавок вітаміну В2. Спостерігається позитивний зв'язок між споживанням радіочастот і анемією у жінок, особливо молодше 50 років. Крім того, було виявлено значний зв'язок між вітаміну В2 і споживанням заліза відповідно до ризику анемії. Варто відзначити подібний ефект вітаміну В12 [58].

Дієтичне споживання вітаміну В2 може призвести до зменшення діабетичних ускладнень через зменшення запальних процесів, викликаних окисним стресом та утворенням АФК. Встановлено, що радіочастота позитивно впливає на рівень цукру в крові. Він відіграє роль у всмоктуванні цукру з кишечника та знижує гіперглікемію. Він покращує стан гіперглікемії, збільшуючи поглинання глюкози в скелетних м'язах і білій жировій тканині, а також значно пом'якшуючи окислювальний стрес, пошкодження тканин і пошкодження клітинної ДНК [58].

Споживання фолієвої кислоти нижче встановленого допустимого верхнього рівня споживання 1000 мкг/день одразу не показує негативних ефектів. Проте даний вітамін використовують для вирішення дефектів нервової трубки. Добавки фолієвої кислоти спеціально націлені на жінок репродуктивного віку, рекомендовано у всьому світі при рівнях споживання щонайменше 400 мкг/день і до 5 мг/день для жінок із високим ризиком дефекту нервової трубки. Ці захворювання виникають, коли нервові складки не зрощуються під час ембріонального розвитку, і призводять до довічної виснажливої медичного огляду. Закриття нервової трубки відбувається на четвертому тижні після зачаття. Таким чином, критичне вікно для втручання відбувається до того, як більшість жінок дізнаються про те, що вони вагітні. Наразі йде активне вивчення використання фолієвої кислоти при лікуванні серцево-судинних захворювань, раку, розладів, пов'язаних з діабетом і захворюваннями щитовидної залози,

аутизму, імунологічних, неврологічних та репродуктивних захворювань, а також ревматоїдного артриту [60].

Вітамін Е є основним жиророзчинним компонентом антиоксидантної захисної системи клітин, який отримується виключно з їжею. Завдяки своїй антиоксидантній активності він виконує численні важливі функції в організмі. Окислення пов'язують із численними можливими станами та захворюваннями, включаючи рак, старіння, артрит і катаракту. Було показано, що вітамін Е ефективний проти них. Вітамін Е також може запобігти гіперагрегації тромбоцитів, яка може призвести до атеросклерозу. Крім того, це також допомагає зменшити вироблення простагландинів, таких як тромбоксан, які викликають злипання тромбоцитів. У поточному огляді літератури обговорюються функції та роль вітаміну Е в здоров'ї людини та деяких захворюваннях, а також наслідки дефіциту вітаміну Е [61].

Вітамін К - це жиророзчинний вітамін, який бере участь у згортанні крові, опосередкованому підтримкою активності факторів згортання крові в печінці. Вітамін К також має позапечінкову дію і, як було показано в клінічних дослідженнях, запобігає переломам кісток. Крім того, епідеміологічні дослідження показують, що нестача вітаміну К пов'язана з декількома геріатричними захворюваннями, включаючи остеопороз, остеоартрит, деменцію та атеросклероз. Також було показано, що вітамін К сприяє профілактиці та лікуванню деяких видів злоякісних новоутворень. Нещодавно ми виявили нову роль вітаміну К як ліганду ядерного рецептора, стероїдного та ксенобіотичного рецептора (SXR), і його мишачого ортолога, рецептора прегнану Х (PXR). Окрім встановленої ролі кофактора g-глутамілкарбоксилази (GGCX) у опосередкуванні посттранскрипційних модифікацій, вітамін К має інший спосіб дії, опосередкований регуляцією транскрипції генів-мішеней SXR/PXR. Аналіз кісткової тканини мишей з дефіцитом PXR показав, що захисні ефекти вітаміну К на кістки частково опосередковуються SXR/PXR-залежною передачею сигналів. Відкриття нового механізму дії вітаміну К відкрило нові можливості того, що

вітамін К може бути корисним для профілактики або лікування різноманітних захворювань, які вражають літнє населення [62].

## **2.2. Вітаміни, які використовуються для ін'єкцій**

Ін'єкції є однією з найпоширеніших медичних процедур, які проводяться в медичних установах у всьому світі. Щорічно робиться близько 16 мільярдів ін'єкцій. Більшість цих ін'єкцій, приблизно 90%, робляться для введення ліків з терапевтичною метою. Безпечна ін'єкція – це така, яка не завдає шкоди пацієнту, який її отримує, не наражає медичного працівника на будь-який ризик, якому можна запобігти, і не призводить до небезпечних для суспільства відходів [63].

Ін'єкція вітаміну А знижує ризик цього захворювання легенів у немовлят, які народилися з низькою вагою. Бронхолегенева дисплазія (БЛД) вражає більше однієї третини немовлят з дуже низькою вагою при народженні і спричиняє смертність, збільшення використання медичних ресурсів та порушення росту та нервового розвитку, з ефектами, що поширюються на доросле життя. З десятків розроблених методів лікування для запобігання БЛД протягом останніх 25 років терапія вітаміном А є однією з небагатьох, яка продемонструвала як безпеку, так і ефективність. Проте терапія вітаміном А мала різне застосування в клінічній практиці через вартість, потенційний біль від внутрішньом'язових ін'єкцій і невелика користь [64]. Профілактичний прийом добавок вітаміну А помірно та безпечно знижує рівень смертності або хронічне захворювання легенів у немовлят з низькою вагою без будь-яких побічних ефектів протягом 18–22 місяців спостереження. Національне постачання ін'єкційної форми вітаміну А наприкінці 2010 року стало дефіцитним і продовжує бути комерційно недоступним [35].

Сепсис спричинений дисфункціональною реакцією організму на інфекцію, пов'язана з високою смертністю. Для зниження смертності є внутрішньовенне введення пацієнтам аскорбату (вітамін С). У тваринних моделях сепсису ця ін'єкція покращує виживання та, серед іншого, функцію мікросудин. Аскорбат, введений септичним мишам, запобігає порушенню проведеної вазоконстрикції шляхом інгібування NO, отриманого нейрональною синтазою оксиду азоту, що призводить до відновлення міжендотеліального електричного зв'язку через

щільні з'єднання, що містять коннексин. Рання ін'єкція аскорбату запобігає закупорці капілярів шляхом інгібування адгезії тромбоцитів до ендотелію. Відстрочена ін'єкція аскорбату усуває закупорку капілярів і адгезію тромбоцитів до ендотелію; він також послаблює спричинене сепсисом падіння кількості тромбоцитів у системній крові. Захищена/відновлена артеріюлярна провідність і перфузія капілярного русла за допомогою аскорбату сприяє зменшенню пошкодження органів і покращенню виживання при сепсисі [66].

Фолієва кислота (Вітамін В9) є хорошим рецептором ліків, що запускає поглинання клітинами через ендцитоз. Дана речовина помірно розчинна у воді. Наразі вивчають можливий цитотоксичний вплив ін'єкційної форми гелю вітаміну В9. Гель з фолієвої кислоти використовується для інкапсуляції як гідрофільних (доксорубіцин (DOX)), так і гідрофобних (камптотецин) препаратів. Аналіз метилтіазолідифенілтетразолію броміду гідрогелю вітаміну В9 демонструє нетоксичну поведінку препарату та те, що цитотоксичність гідрогелю, наповненого DOX, вища, ніж у чистого DOX, з мінімальним впливом на нормальні клітини [1].

Фолієва кислота також є одним із важливих компонентів гемопоетичної системи, будучи коферментом, який контролює генерацію феррогема. Нестача жирної кислоти призводить до гігантоцитарної анемії, пов'язаної з лейкопенією, деволуцією психіки, психозами тощо. Вважається, що дефіцит фолієвої кислоти є найпоширенішим дефіцитом вітамінів у світі через переробку їжі, вибір їжі та кишкові розлади. Тому ін'єкційні форми цього вітаміну гарно борються з проблемою його дефіциту, що може викликати інші негативні ефекти [67].

Ін'єкційні форми вітаміну В12 в першу чергу використовуються для боротьби з дефіцитом цього ж вітаміну. Також, цей вітамін, як і рибофлавін, використовують для ін'єкцій проти анемії. Відомі випадки застосування комбінованого ін'єкційного препарату, в складі якого міститься вітамін В12, В6 та фолієва кислота, при діабетичній нефропатії. Також, кобаламін можна використовувати як ін'єкційний препарат при хронічних болях в попереку і не

тільки цієї зони. Відзначається висока ефективність ін'єкцій В12 для лікування невралгії Мортона та *tabes dorsalis* (спинна сухотка) [69].

Ін'єкції вітаміну D нерідко призначаються лікарями для покращення здоров'я та зменшення слабкості людей похилого віку. Також, відмічають, що даний вітамін приписують для реабілітації після операцій, які стосуються травмування кісток. Також, наразі ін'єкції цього вітаміну пропонується використовувати при виразковому коліті (хронічне рецидивуюче запалення товстої кишки) [69].

Новонароджені піддаються ризику кровотечі, пов'язаної з дефіцитом вітаміну К (ДВК), спричиненого недостатнім внутрішньоутробним зберіганням і дефіцитом вітаміну К у грудному молоці. Одноразова внутрішньом'язова ін'єкція вітаміну К при народженні ефективно запобігає цьому явищу. Дози перорального вітаміну К менш ефективні, ніж внутрішньом'язове введення при ДВК. Наразі оптимальним значенням однієї дози вітаміну К становить 0,5–1,0 мг усім новонародженим, за загальними рекомендаціями різних медичних товариств. Пероральне введення вітаміну К рекомендують обмежити новонародженим, оскільки така методика не є ефективною [70].

## ВИСНОВКИ ДО ЛІТОГЛЯДУ

1. Вітаміни – це велика група різних біологічно-активних речовин, яку промислово добувають хімічним синтезом, з рослинної сировини, а також біотехнологічним шляхом. Потрібно відмітити, що синтез вітамінів звичайними, не модифікованими, мікроорганізмами дуже обмежений, як кількістю біологічних агентів, так і концентрацією необхідного продукту.

2. Для досягнення більш високих концентрацій в культуральній рідині використовуються методики генної інженерії. Велике визнання мають саме рекомбінантні штами для синтезу біологічно-активних речовин. Особливо часто використовують рекомбінантні штами дріжджів *S. cerevisiae*. Також, генетичній модифікації піддають мікроорганізми, які вже могли синтезувати вітаміни, проте в обмеженій кількості (наприклад, *L. lactis* ssp. *cremoris* та менахінон).

3. Ще одним варіантом вирішення надсинтезу вітамінів може бути оптимізація умов культивування. Відзначається важливість температури та джерел вуглецю та азоту для синтезу всіх відомих нині мікробних вітамінів. Варто зазначити про нагальну потребу додавання металів до середовища при культивуванні вітаміну А та вітаміну В12. Нерідко застосовують методи додавання антиметаболітів для блокування певних метаболічних шляхів, що призводить до утилізації субстрату на утворення цільового продукту. Попередники також відіграють не малу роль для більшого виходу вітамінів, особливо для кобаламіну.

4. Вітаміни найчастіше за все використовуються у лікарській справі, як харчова добавка для раціону людини, або у сфері косметології для покращення якості шкіри. Останні дослідження зазначають важливість ролі вітамінів у лікуванні різних онкологічних захворювань. До цієї групи належать вітамін А, В12, В2, фолієва кислота, вітаміни групи D та вітаміни групи К.

5. Ін'єкційні форми вітамінів використовують для більш ефективної дії діючих речовин, порівняно з пероральним методом споживання ліків. Особливу увагу приділяють використанню ін'єкцій для немовлят, оскільки їм важко давати

тверді лікарські форми. Також, існують дослідження щодо застосування вітамінів для ін'єкцій проти раку.

6. Одним з перспективних вітамінів для ін'єкцій є фолієва кислота, яку наразі активно досліджують для лікування різних захворювань, починаючи з дефіциту вітаміну В9, закінчуючи раковою терапією. Оскільки цей вітамін в промислових масштабах одержується хімічним методом, ніша біотехнологічного синтезу немає конкуренції. Біотехнологічний синтез субстанції не рідко виявляється дешевшим за альтернативні методи. Оскільки вже є певні розробки щодо використання ін'єкцій фолату у раковій терапії, який є одним з найстрашніших захворювань поточного століття, пропонується подальшу розробку вести саме по цьому вітаміну, враховуючи його перспективність.

### РОЗДІЛ 3

## ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВА ВІТАМІНУ В9 ДЛЯ ІН'ЄКЦІЙНОГО ГІДРОГЕЛЕВОГО ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ

### 3.1. Аналіз фармакологічних властивостей цільового лікарського засобу на основі фолієвої кислоти, галузей використання, потреби у лікарському засобі

Фолієва кислота вітамін В<sub>9</sub>, В<sub>9</sub> — виділена в 1939 р. з листків шпинату, у зв'язку з чим і отримала свою назву. Досить поширена в природі, синтезується в тканинах рослин, мікроорганізмів, частковий синтез здійснюється в організмі людини і тварин мікрофлорою кишечника [71].

За хімічною будовою фолієва кислота є птероїлглутаміною кислотою. Її молекула складається з трьох структурних одиниць: залишку птеридину (конденсованого біциклу, який складається з піримідинового і піразинового кілець), параамінобензойної кислоти (ПАБК) і глутамінової кислоти. Фолієва кислота обмежено розчинна у воді [71].

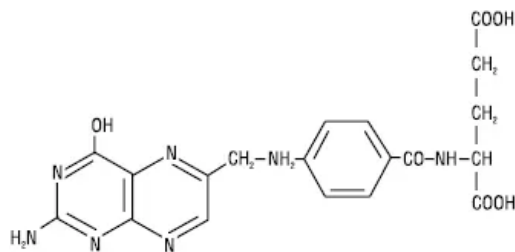


Рис.3.1. Структурно-хімічна формула фолату [71]

У медичній практиці застосовують фолієву кислоту і кальцію фолінат (аналог тетрагідрофолієвої кислоти). Призначають їх при фолієвому дефіциті для стимуляції кровотворення, при порушенні функцій кишечника. Антивітамінами фолієвої кислоти є аміно- й аметоптерини (лікарський препарат має назву Метотрексат), які застосовують як протипухлинні препарати, що гальмують синтез нуклеїнових кислот і білка в клітинах [71].

					<b>НУХТ БТЕК 02.02.20 КР ПЗ</b>			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Тугарева Т.І.				РОЗДІЛ 3 ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВА ВІТАМІНУ В9 ДЛЯ ІН'ЄКЦІЙНОГО ГІДРОГЕЛЕВОГО ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.	Карлаш Ю.В.						46	133
Реценз.						<b>Кафедра БТМ</b>		
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							

Фолієва кислота бере участь у синтезі піримідинових та пуринових основ, що входять до складу ДНК і РНК, бере участь в утворенні глутамінової кислоти. Важливий учасник нормального кровотворення, регулює пластичні та регенераторні процеси в усіх органах і тканинах, має ноотропну і антисклеротичну дію. При дефіциті фолієвої кислоти спостерігається клінічна картина макроцитарної анемії (схожа на прояви перніціозної анемії внаслідок недостатності вітаміну В12) за відсутності порушень з боку нервової системи [72].

Аналіз на визначення фолієвої кислоти наразі призначають у випадку діагностики макроцитарних анемії, порушень з боку крові (анемії і лейкопенії), викликаних хіміотерапією або променевою терапією, або виявлення дефіциту фолієвої кислоти [72].

Референтні значення для аналізу вітаміну В9 показано в табл.1.1.

*Таблиця 1.1.*

#### **Референтні значення фолату в крові [72]**

Вік, років	Норма, нг/мл	Помірний дефіцит, нг/мл	Дефіцит, нг/мл
0-130	>5,38	3,38-5,38	0,38-3,37

Дефіцит фолієвої кислоти призводить до розвитку мегалобластної анемії (збільшення обсягу еритроцитів). У дітей при дефіциті даної кислоти спостерігається відставання у вазі (гіпотрофія), пригнічення функції кісткового мозку, порушення стану слизової оболонки шлунково-кишкового тракту, шкірних покривів, що створює основу для розвитку ентеритів, попрілостей, затримки психомоторного розвитку [73].

Нормальний рівень фолієвої кислоти в організмі знижує ризик розвитку онкологічних захворювань і відіграє особливу роль при вагітності. Нестача даного вітаміну у вагітних загрожує розвитком у плода вроджених вад (дефекти нервової трубки, гідроцефалії, аненцефалії, мозкових гриж), невиношуванням вагітності, частковим або повним відшаруванням плаценти [73].

Препарати, що знижують рівень фолієвої кислоти в організмі [73]:

- аспірин,

- протисудомні препарати,
- естрогени, нітрофурани,
- оральні контрацептиви,
- антациди,
- холестирамін,
- сульфасалазин,
- триметоприм,
- метотрексат,
- азатіоприн,
- азидотимідин.

Причини зниження концентрації фолату в організмі можуть бути наступними [73]:

- недостатнє надходження вітаміну з їжею (голодування, переважне вживання їжі, що пройшла кулінарну обробку);
- порушення всмоктування при захворюваннях кишківника (синдром мальабсорбції, целиакія, ентерит, резекція шлунка і кишечника);
- підвищена потреба у вітаміні В9 (вагітність, грудне вигодовування, період інтенсивного росту, гемодіаліз, онкологічні захворювання, похилий вік, лихоманка, септичні стани);
  - анорексія;
  - алкоголізм;
  - прийом препаратів, що порушують всмоктування фолієвої кислоти і її антагоністів.

Жінки потребують більшої кількості фолатів під час вагітності, оскільки фолат необхідний для формування ДНК у міру розвитку плода. Дефіцит фолієва кислота може перешкоджати нормальному поділу клітин і зростанню плоду і плаценти, що призводить до вроджених аномалій [74].

Якщо жінка не отримує достатню кількість фолатів до та під час вагітності, у її дитини можуть виникнути серйозні дефекти нервової трубки, які є проблемами з головним і спинним мозком [74].

Дефекти нервової трубки включають [74]:

- Аненцефалія, при якій у плода відсутні частини мозку та череп;
- Розщеплення хребта, що призводить до аномалій хребта, нервів або обох структур одразу.

Дефіцит фолатів також може викликати низьку вагу дитини. CDC (Центр з контролю та профілактики захворювань США) стверджує, що кожна жінка дітородного віку повинна отримувати 400 мкг фолієвої кислоти на додаток до їжі, збагаченої фолатом їжі [74].

Навіть жінки, які не планують завагітніти, вони повинні приймати добавку з фолієвою кислотою, оскільки [74]:

- Майже половина всіх вагітностей в США є незапланованими, за даними CDC;
- Аномалії народження внаслідок дефіциту фолатів виникають дуже рано, часто до того, як жінка навіть знає, що вагітна;
- Самостійно отримати рекомендовану кількість фолатів може бути важко.
- Одним із найсерйозніших наслідків дефіциту фолієвої кислоти є розвиток мегалобластної анемії.

Загальною рисою мегалобластозу є дефект синтезу ДНК у клітинах, що швидко діляться. Меншою мірою порушується синтез РНК та білка. Незбалансований ріст клітин та порушення клітинного поділу виникають з моменту порушення ядерного дозрівання. Більш зрілі попередники еритроцитів руйнуються в кістковому мозку до надходження в потік крові (інтрамедулярний гемоліз) [74].

Дефіцит споживання фолієвої кислоти погіршує дозрівання молодих еритроцитів, що призводить до анемії. Хвороба також характеризується

лейкопенією (дефіцитом лейкоцитів або лейкоцитів), тромбоцитопенією (дефіцитом тромбоцитів), неефективним кровотворенням у кістковому мозку та прогресуючими шлунково-кишковими симптомами, такими як біль у мові, тріщини у кутиках рота, діареєю, глоситом або езофагітом, виразкуванням слизової шлунка і кишечника [74].

Пероральний прийом фолієвої кислоти дає швидке поліпшення всіх симптомів, а адекватна дієта призводить довиліковування у випадках, пов'язаних з неправильним харчуванням [74].

Деякі фахівці висловлюють занепокоєння з приводу того, що високий прийом добавок фолатів може «замаскувати» дефіцит вітаміну В12, поки його неврологічні наслідки не стануть незворотними. Питання щодо такої можливості все ще залишаються відкритими і не вивченими до кінця [74].

Також було висловлено занепокоєння, що високий прийом фолієвої кислоти може прискорити прогресування паранеопластичних уражень, збільшуючи ризик виникнення колоректальних та, можливо, інших онкологічних захворювань у деяких осіб. Крім того, споживання фолієвої кислоти в кількості 1000 мг мкг на день або більше від добавок протягом прекоцепційного періоду було пов'язано з нижчими показниками у кількох тестах когнітивного розвитку у дітей у віці 4–5 років, ніж у дітей матерів, які приймали 400 мкг до 999 мкг [74].

Споживання фолієвої кислоти, що перевищує здатність організму перетворювати її до ТГФ, призводить до накопичення неметаболізованої фолієвої кислоти в організмі. Це пов'язано зі зменшенням кількості та активності природних клітин-кілерів, що дозволяє припустити, що надлишок фолату може впливати на імунну систему. Крім того, деякі вчені припускають, що неметаболізована фолієва кислота може бути пов'язана з порушенням когнітивних функцій у дорослих людей. Ці потенційні негативні наслідки для здоров'я недостатньо вивчені і вимагають подальших досліджень [74].

Фолієва кислота грає роль у зростанні та відновленні клітин. Деякі дослідження показують, що фолієва кислота блокує рак на ранніх стадіях. Проте, отримання надто великої кількості фолієвої кислоти може мати протилежний

ефект. Тому, застосування цього вітаміну цій галузі ще потребує додаткового аналізу, але можна точно сказати про те, що наразі ведуться активні дослідження, які в перспективі дозволять використання фолату у протираковій терапії [75].

Розмір ринку фолієвої кислоти оцінювався в 0,68 мільярда доларів США в 2021 році, і очікується, що загальний світовий дохід ринку фолієвої кислоти зросте на 4,3% протягом 2022-2029 років, досягнувши майже 0,94 мільярда доларів США [76].

Основним обмеженням ринку фолієвої кислоти є те, що більш високий рівень споживання може спричинити проблеми зі здоров'ям у її споживачів, такі як виразка шлунка, шкірний висип, судоми тощо [76].

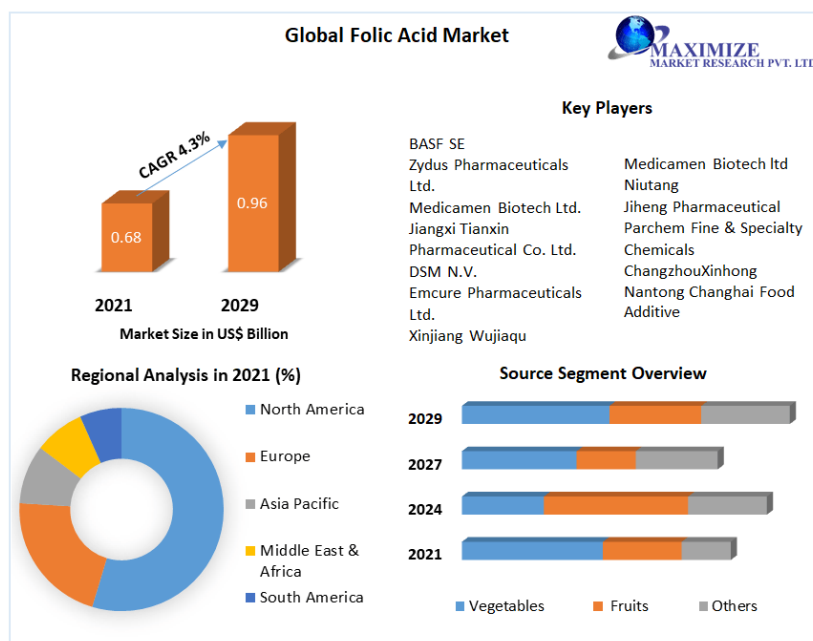


Рис.3.2. Зведена інформація за світовий ринок фолату [76]

За формою лікарського засобу прогнозується зростання сегмента таблеток в період з 2022 до 2029 рік, що можна пов'язати з високим попитом на допологовий догляд у галузі охорони здоров'я. Дослідження також показують, що фолієва кислота запобігає аномаліям у ротовій порожнині плода, таким як заяча губа та піднебіння. Очікується, що сегмент гелевих препаратів також продемонструє високі темпи зростання на 3,2% у той самий прогнозований період. Це можна пояснити, що препарати на основі гелю дають швидке полегшення за менший проміжок часу порівняно зі звичайними таблетками [76].

Наразі, перспективним варіантом для застосування фолієвої кислоти – є виробництво гелевих ін'єкційних препаратів для лікування онкологічних захворювань [1]. Рак є основною причиною смерті в усьому світі, на нього припадає майже 10 мільйонів смертей за статистикою на 2020 рік. Найпоширенішими видами раку у 2020 році були [77]:

- молочна залоза (2,26 млн випадків);
- легені (2,21 млн випадків);
- товста і пряма кишки (1,93 млн випадків);
- простати (1,41 млн випадків);
- шкіра (немеланома) (1,20 млн випадків);
- шлунок (1,09 млн випадків).

Найпоширенішими причинами смерті від раку у 2020 році були [77]:

- легені (1,80 млн смертей);
- товста і пряма кишки (916 000 смертей);
- печінки (830 000 смертей);
- шлунок (769 000 смертей); і
- грудей (685 000 смертей).

Щорічно приблизно 400 000 дітей хворіють на рак. Найбільш поширені види раку відрізняються між країнами. Рак шийки матки є найпоширенішим у 23 країнах [77].

Стандартизований рівень захворюваності усіх видів раку разом у світі зріс з 383 випадків на 100 000 людей у 1982 році до піку в 508 випадків на 100 000 у 2008 році до 504 випадків на 100 000 у 2018 році. у 2022 році залишився на рівні 507 випадків на 100 000 осіб [78].

Тож, незважаючи на те, що рівень захворюваності на рак залишається вже довгий час стабільним, неможна казати, що він є дуже малим. Препарати, які використовуються для хіміотерапії, все ще є доволі дієвими, проте мають негативні ефекти. Наприклад доксорубіцин, один з найвідоміших антрациклінових антибіотиків, має кардіотоксичність. Тому, використання

ін'єкційних препаратів на основі гелю фолієвої кислоти може дозволити вирішити питання токсичності, а також збільшити тривалість дії та ефективність самого препарату [1,78,79].

### **3.2. Обґрунтування вибору форми випуску лікарського засобу на основі фолієвої кислоти**

#### **3.2.1. Обґрунтування форми випуску лікарського засобу на основі фолієвої кислоти**

Фолієва кислота використовується як основа для ін'єкційного введення доксорубіцину. Тому, логічно, що препарат має бути ін'єкційним.

Лікарські форми для ін'єкцій - стерильні лікарські форми для парентерального застосування у вигляді розчинів, суспензій, емульсій, а також твердих лікарських речовин (порошки, таблетки, пористі маси), які розчиняють у стерильному розчиннику безпосередньо перед введенням [80].

Розрізняють ін'єкції малого об'єму (до 100 мл) і великого об'єму (100 мл і більше - інфузії). Порошок для ін'єкцій - стерильні тверді лікарські засоби, що застосовуються для приготування розчинів або суспензій для ін'єкцій. Розчини для ін'єкцій - стерильні водні або неводні розчини лікарських речовин у відповідному розчиннику. Суспензії для ін'єкцій - стерильні високодисперсні суспензії. Емульсії для ін'єкцій - стерильні високодисперсні емульсії [80].

Розчин для ін'єкцій (*Solutiones pro injectionibus*) - це рідка лікарська форма для парентерального введення (минаючи шлунково-кишковий тракт). Розчини для ін'єкцій вводять підшкірно (п/к), внутрішньом'язово (в/м), внутрішньовенно (в/в). Лікарські форми для ін'єкцій - промислового виробництва: ампули, флакони, шприц-тюбики. Лікарські форми для ін'єкцій повинні бути стерильними, стійкими, апірогенну, вільними від механічних домішок [80].

Головною перевагою ін'єкційних форм є високий ступінь біодоступності, що дозволяє ефективно використовувати препарат та уникати потенційних передозувань. Для внутрішньовенних препаратів показник біодоступності може досягати й 100%, коли для пероральних препаратів, щоб досягти хоча б 60% треба передбачувати додаткові речовини, що будуть захищати форму від зовнішніх

чинників організму до місця їх всмоктування, що буде потребувати додаткових затрат у грошовому та часовому еквіваленті [81].

Переваги ін'єкційного введення ліків [82]:

- Швидкість дії (в деяких випадках дія лікарського препарату розвивається через кілька секунд).
- Найбільш повна біологічна доступність (лікарські речовини вводяться, минувши такі захисні бар'єри організму, як шлунково-кишковий тракт).
- Точність і зручність дозування лікарських речовин.
- Можливість введення лікарських препаратів пацієнтам, які перебувають в несвідомому стані, при порушенні акту ковтання.
- Можливість вводити лікарські засоби, що руйнуються в шлунково-кишковому тракті: інсулін, строфантин, бензилпеніцилін.

Окрім порошкової форми для ін'єкцій, пропонується розглянути інші лікарські ін'єкційні форми: ін'єкційний розчин в ампулі або у вигляді готового шприц-тюбика, який є готовим до застосування лікарським препаратом, тобто, лікарська форма у вигляді готового розчину (гідрогелю) для ін'єкцій.

Зазвичай порошки постачаються в скляних або пластикових контейнерах для однієї дози (нині менш рекомендований ПВХ або поліолефін). До **переваг порошків** як лікарської форми можна віднести наступні [83]:

- простота приготування, точність дозування;
- універсальність складу (у формі порошків можна поєднувати різні за складом і властивостям лікарські речовини);
- зручність зберігання і транспортування.

**Недоліки порошків** [83]:

- погана збереження у зв'язку з великою питомою поверхнею (легко втрачають або поглинають воду, окислюються тощо);
- потребують додаткової закупівлі не лише шприцю, а й розчину для ін'єкцій.

Оскільки доксорубіцин зазвичай вводять внутрішньовенно, для нашого препарату на основі фолату маємо розглянути що ж це за метод такий. Внутрішньовенна ін'єкція - спосіб введення лікарських засобів, при якому лікарський препарат потрапляє в організм безпосередньо у кров'яне русло шляхом проколу венозної судини та подальшого вливання лікарського засобу через додаткове обладнання (шприц ) в судину [84].

**Перевага внутрішньовенного введення рідких ліків** - діючі речовини при введенні в організм не змінюються у місці контакту з тканинами, тому внутрішньовенно можна застосовувати лікарські засоби, які руйнуються під дією ферментів травної системи. При внутрішньовенному введенні забезпечується швидке досягнення лікувального ефекту та більш точне дозування препарату. Тому внутрішньовенна ін'єкція частіше застосовується при наданні невідкладної медичної допомоги, особливо у випадках, коли хворий знаходиться без свідомості та не може ковтати. Окрім цього, при внутрішньовенному введенні можна регулювати швидкість введення препарату, застосовуючи внутрішньовенне крапельне введення препарату. На швидкість всмоктування препарату не впливає прийом їжі та значно менше впливають особливості біохімічних реакцій організму конкретної людини, прийом інших препаратів, та стан ферментативної активності організму [84].

**Недоліки внутрішньовенного введення рідких ліків** - хворий не може самостійно вводити лікарські препарати сам, для чого він повинен користуватися допомогою медпрацівників. При внутрішньовенному введенні ліків, як і при інших видах парентерального застосування лікарських препаратів, існує ризик інфікування пацієнта або медичного працівника збудниками інфекційних захворювань, які передаються через кров. При внутрішньовенному застосуванні збільшується ймовірність побічної дії ліків у зв'язку із більшою швидкістю надходження в організм та відсутністю на шляху надходження препарату біологічних фільтрів організму — слизової оболонки шлунково-кишкового тракту та гепатоцитів. При внутрішньовенному застосуванні дозволяється вводити лише водні розчини лікарських препаратів, оскільки олійні розчини можуть викликати

емболію судин (допускається введення лише жирових емульсій для парентерального харчування), а також лікарські препарати із місцево подразнювальною дією (які можуть викликати флебіти або тромбофлебіти) і препарати, що пришвидшують згортання крові. Також, недоліком є погана стійкість препарату після контакту з навколишнім середовищем, що вирішується дозованістю препарату [84].

Для створення готових розчинів як розчинник використовують [85]:

- дистильовану воду (Aqua destillata);
- етиловий спирт (Spiritus aethylicus 70%, 90%, 95%);
- гліцерин (Glycerinum);
- рідкі масла (Oleum Vaselini, Oleum Olivarum, Oleum Persicorum та ін.).

Проте, в дашому випадку основою ін'єкції є гідрогель на основі фолієвої кислоти. Це новітні лікарські засоби, які тільки починають свій складний шлях тестування з подальшим впровадженням, але вже є купа досліджень введення таких ін'єкцій до кровотоку, при чому дуже успішних. Тому, як розчинник, в нашому випадку використовується цільовий продукт – фолієва кислота [1].

Щодо ін'єкцій фолієвої кислоти, в Україні наразі такі препарати відсутні, хоча вони вважаються більш дієвими для лікування того ж самого дефіциту вітаміну В9. Фолієва кислота в ін'єкціях зазвичай має дуже мало побічних ефектів. Дуже серйозна алергічна реакція на цей препарат буває рідко. До цих ефектів відносяться: висип, свербіж/набряк (особливо обличчя/язика/горла), сильне запаморочення, утруднене дихання [86-88].



Рис.3.3. Фолієва кислота в ін'єкційній формі, що реалізується закордоном [86]

Отже, ін'єкційні форми фолієвої кислоти є більш привабливими за їх ефективність, а також за можливість місцевого введення, через що можна припустити, що саме ця форма є перспективною, а тому буде в подальшому опановувати світовий ринок, з врахуванням того, що наразі в Україні ін'єкцій вітаміну В9 немає [87,88].

**Висновок:** з врахуванням усіх особливостей хіміотерапії, а також переваг та недоліків використаних лікарських форм, пропонується зупинити свій вибір на рідких лікарських формах для ін'єкційного введення внутрішньовенно на основі гідрогелевих ін'єкцій, основою яких є фолієва кислота. Резюмуючи все вищевикладене, пероральні форми для лікування є дуже зручними, але мають набагато меншу біодоступність діючої речовини, а також потребують додаткових речовин, для захисту від чинників, які також будуть зменшувати показник доступності.

Щодо препаратів ін'єкційного характеру, було розглянуто 2 лікарські форми, суху у вигляді порошку, та рідкі для можливого застосування у ампулах або шприц-тюбику (оскільки це вже стосується первинної упаковки, її обґрунтування буде продемонстровано нижче, див.п.3.2.2.). Порошкова форма є зручною у зберіганні, але такою ж нестабільною при контакті з навколишнім середовищем. Крім того, потребує води для ін'єкцій та додаткового шприцю. Готові розчини (у нашому випадку – гідрогелі) вирішують останнє питання, що робить цю форму більш привабливою за порошок. Тому, спираючись на всі за та проти, обираємо готовий гідрогель з доксорубіцином для внутрішньовенного введення за допомогою ін'єкції.

### **3.2.2. Обґрунтування вибору первинної і вторинної упаковки ін'єкційного гідрогелю на основі фолату**

В минулому пункті (п.3.2.1.) нами було обрано виготовлення рідкої лікарської форми для внутрішньовенних ін'єкцій на основі гідрогелю фолієвої кислоти. При цьому було запропоновано в подальшому розглянути ампули та шприц-тюбики як можливу первинну упаковку. Така пропозиція обумовлена тим, що тривалість одного курсу хіміотерапії складає близько 3 тижнів (5 разів на рік)

та потребує внутрішньовенного введення 1 рази на день дози антибіотику в 4,5 мг. Було визначено, що така доза припадає на 10 мл ін'єкцію. Отже, на один курс одній людині потрібно:

$$1 \times 3 \times 7 \approx 21 \text{ доза}$$

Тоді, логічно виготовляти або по 5 ампул в 1 упаковці або по 5 шприц-тюбиків в 1 упаковці. У випадку, якщо розробити препарат з 10 ампулами/шприцями в 1 коробці, наприкінці курсу людина отримає 9 лишніх доз, а у випадку з 5 штуками – лише 4. Отже, залишаємо наш вибір на 5 шт ампл си шприців.

З врахуванням об'єму однієї дози, пропозиція розгляду ампул та шприц-тюбиків залишається незмінною. Тому, для початку пропонується розглянути саме ампули, через їх поширеність на теренах нашої країни.

Скляні ампули знайшли широке застосування для упаковки ін'єкційних ліків. Скло має важливі характеристики, які дозволяють широко використовувати його у виготовленні реципієнтів для ліків та інших стерильних речовин. Ампульні рідкі препарати є дуже зручним лікарським засобом, оскільки це вже готовий гідрогель для ін'єкцій, який потребує лише шприцю, як додаткового знаряддя [89].

Проте, ампули мають один великий недолік, а саме забруднення розчинів скляними мікрочастинками при розбитті скляних ампул, наявність металів, черезшкірні пошкодження. Скляні мікрочастинки, що утворюються під час швидкого відкриття ампул, а також метали, які забруднюють їхній вміст, можуть бути аспіровані та введені кількома шляхами. Екзогенне забруднення склом і металами може досягати кількох місць в організмі. Вони викликають органічні реакції, які можуть призвести до травм. Розкриття ампул може наражати фахівців на ризик черезшкірних травм. Ці ураження підвищують біологічний ризик, оскільки є воротами для вірусів і бактерій. Системи відкриття ампул (VIBRAC і OPC) були розроблені для зменшення частоти таких нещасних випадків [90].

Альтернативні склі матеріали можуть бути цікавою стратегією підвищення безпеки. Використання попередньо наповнених шприців може являти собою еволюцію щодо безпеки [90].

Як альтернатива скляним ампулам може стати технологія BFS (blow-fill-seal). Сучасна технологія BFS (blow-fill-seal) гарантує асептичну упаковку різноманітних продуктів у ємності різного обсягу. Порівняно з традиційним процесом «наповнення-закупорювання» технологія «видування-наповнення-запаювання» є повністю автоматичним процесом, що практично не вимагає втручання оператора, що дає низку незаперечних переваг [91]:

- Менші розміри виробничих площ
- Скорочення потреб у персоналі
- Зменшення вимог до чистоти приміщення
- Захист продукту від забруднення
- Уникнення проблем матеріально-технічного забезпечення під час постачання та зберігання порожніх контейнерів
- Будь-яка форма флакона, включаючи ампули з нанесенням логотипу компанії
- Великий вибір матеріалів для виробництва ампул
- У довгостроковій перспективі економічніша технологія

Процес починається з екструзії пластикових гранул у вигляді гарячої порожнистої трубки рідкого пластику, внаслідок чого з'являється заготівка [91].

Наступний крок – видувне формування ампул із пластикових гранул. Заготовка затискається прес-формами, і флакон формується через видування стерильним стисненим повітрям або вакуумом, або використанням і вакууму, і видування. Ампула приймає вигин каналу прес-форми. Виготовлена таким чином ампула відкривається зверху і залишається незакритою, доки не будуть зроблені наступні кроки – наповнення та запаювання. При цьому пластик все ще гарячий і знаходиться у розплавленому стані [91].

Далі – заповнення відкритої сформованої ампули зверху. Часто процес заповнення може виконуватися під потоком очищеного стерильного повітря для

того, щоб уникнути забруднення під час наповнення ампул. Установка повітря може мати різний тиск, який може бути змінений автоматично для того, щоб підтримувати постійний тиск повітря в різних ситуаціях [91].

Наступний крок – це запаювання верхньої частини ампули, яка все ще відкрита і знаходиться у гарячому розплавленому стані. Верхня частина затискається прес-формами і, як наслідок, верх ампули формується, запаюється і водночас охолоджується. Результат-герметично запаяна ампула [91].

Останнім етапом є обдування для видалення відходів, вирівнювання ампул та постачання за межі машини. Повністю процес екструзії, видування, наповнення, запаювання та видалення відходів займає від 10 до 18 секунд залежно від типу та розміру ампул [91].

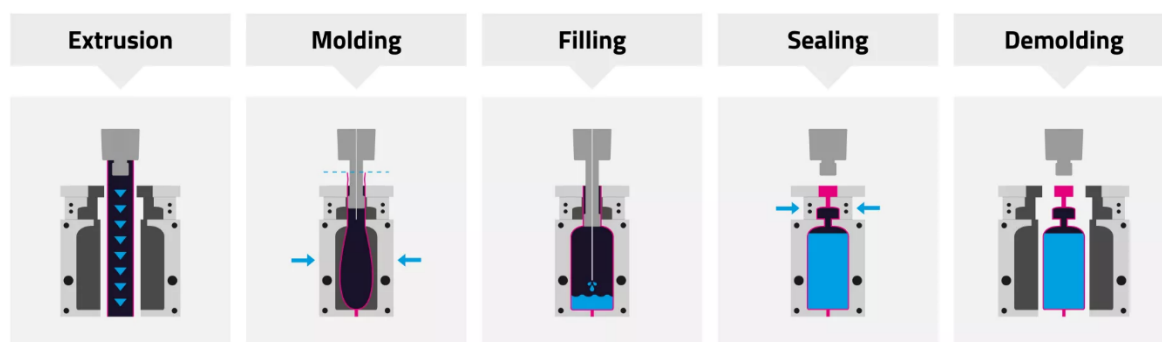


Рис.3.4. Схематичне зображення технології BFS [92]

Для виготовлення ампул наразі застосовують поліетилен та поліолефіни. Матеріали мають повністю відповідати вимогам Європейської Фармакопеї (EP) і Американської Фармакопеї (USP). В Україні Nikorpharm першою розпочала виробництво інфузійних та ін'єкційних розчинів з використанням технології BFS, що може казати про сучасність даної технології [93].

Шприц-тюбик — це шприц ін'єкційний одноразового застосування, наповнений лікарським препаратом. Складається з еластичного полімерного корпусу (ампули), у горловину якого запресована попередньо простерилізована сталеві ін'єкційна голка, герметично закрита полімерним ковпачком. Шприци одноразового застосування виготовляють з певних сортів поліпропілену,

полістиролу і співполімеру стиролу та акрилонітрилу, дозволених до застосування для медичних цілей органами охорони здоров'я. Для поршня використовують високоякісний натуральний каучук або силіконовий каучук з покриттям поверхні поршня полідиметилсилоксаном [94].



Рис.3.5. Приклад препарату, що випускається у вигляді шприц-тюбику [95]

Щоб застосувати шприц, утримуючи рукою його корпус, насувають ковпачок. При цьому мандрен проколює мембрану. Знімають ковпачок разом із мандреном. Піднімають шприц-тюбик голкою вгору і натисканням на стінки корпусу наповнюють розчином його верхню частину, видаляючи повітря з голки. Голку вводять у підшкірну клітковину і натисканням на корпус шприца вводять ліки [96].

Зручність шприц-тюбиків полягає в тому, що споживачу не потрібно додатково закуповувати розчин для ін'єкції та шприць, він має готовий препарат для одноразового застосування. Але мінусом цієї лікарської форми є її неекологічність, тому що потребує застосування жорстких пластмас для зберігання та транспортування [94,96].

З врахуванням усіх за та проти, пропонується обрати ампули, які будуть виготовлятися за технологією BFS. Фолієва кислота сумісна разом з поліетиленом, а тому логічно виготовляти ампули з цього матеріалу.

Як було вираховано раніше, одна ампула має містити 10 мл ін'єкційного препарату на основі гідрогелі з фолієвої кислоти, тому передбачаємо 5 ампул об'ємом 10 мл.



*Рис.3.6.* Приклад ампул, які одержують по технології BFS [96]

Препарат не розкладається від сонячних променів, а тому не потребує використання темних пластмас. Також, він є стабільним при кімнатній температурі, тому не потребує додаткового зберігання в холодильнику [5]. Як і всі лікарські препарати, його варто зберігати подалі від дітей і бажано в темному місці, через потенційну можливість деградації пластмаси.

Щодо вторинної упаковки, для «класичних ампул» використовують пластиковий блістер для кращого зберігання та транспортування. Проте, обрані ампули не скляні, а полімерні і не можуть бути такими ж крихкими. Крім того, технологія BFS дозволяє об'єднувати між собою відповідну кількість ампул, як це було вказано раніше, тому використання спеціального блістеру в даному випадку непотрібне.

Для обраних ампул варто передбачити картонну коробку, як основну вторинну упаковку, за її простоту та екологічність.

Отже, пропонується виготовляти ін'єкційний препарат, у ампулах об'ємом 10 мл, що виконані з поліетилену за допомогою технології BFS, об'єднані по 5 штук на пачку з картонної коробки.

**Висновки:** в попередньому пункті було обґрунтовано використання рідкого ін'єкційного препарату як основної лікарської форми. З врахуванням потреби було визначено, що одна доза препарату має становити 10 мл. З

врахуванням цього об'єму було розглянуто потенційні первинні упаковки, які представлені ампулами та шприц-тюбиком.

Класичні ампули мають суттєвий недолік, а саме частинки мікроскла, які можуть потрапити у кровотік та призводити до негативних явищ організму, через що, як альтернатива, була розглянута технологія BFS, яку технічно можна назвати більш безпечним, а іноді навіть екологічним аналогом. Недоліком такої первинної упаковки є те, що потрібно окремо купувати шприц, проте через доступність аптек у кожному місці, наразі це не така велика проблема.

Шприц-тюбик – дуже зручна форма, оскільки це вже готовий лікарський препарат, але його незручно брати із собою, оскільки він займає в будь-якому випадку більше місця, ніж той самий флакон чи ампула. Також, він потребує більшої кількості пластику, ніж необхідно для виробництва ампул, що не дуже екологічно. Крім того, виробництво шприц-тюбику банально дорожче за пластикові ампули, що буде здорожчувати кінцевий продукт.

Тому, спираючись на зручність форми, її безпечність та ефективність самого лікарського препарату, було обрано виробництво пластикових ампул з гідрогелем фолату, який потрібно вводити ін'єкційно внутрішньовенно.

### **3.3. Обґрунтування вибору біологічного агенту для отримання фолату**

Для вибору біологічного агента пропонується обрати продуцентів фолієвої кислоти, одного з вітамінів групи В. Раніше згадувалось, що більшість робіт щодо мікробного одержання вітамінів присвячені саме вітамінам групи В. Було згадано, що ринок фолієвої кислоти має середній рівень реалізації, а отже, має не таку велику конкуренцію. Також, такий вибір пропонується, через відсутність в Україні ін'єкційних препаратів на основі цього вітаміну, хоча закордоном такі препарати існують у великій кількості. Ще одним фактором вибору цього вітаміну стало те, що фолієва кислота наразі в промисловому масштабі виробляється лише хімічним синтезом.

Одним з відомих за попереднім аналізом продуцентом вітамінів групи В є плісняві гриби - *Ashbya gossypii*. З материнського штаму ATCC 10895 за допомогою *E. coli* DH5α було одержано рекомбінантний штам *A. gossypii* (назву

не надано). Даний мікроорганізм синтезує близько 6,6 мг/л фолату. Тривалість культивування становила 72 години [5].

Ізольований штам *Streptococcus thermophilus* St 563 при рН 5,0 синтезує 68,4 мкг/л фолату. Тривалість культивування становила всього 24 години. Температура процесу становила всього 42 °С [97].

Мутований штам *Lactobacillus reuteri* 6475:fo1C спеціально виведено для синтезу фолієвої кислоти. Тривалість культивування становить 24 години. За цей час вдається одержати  $170 \pm 25,6$  мкг/л (нг/мл) бажаного вітаміну [98].

Також відомі випадки одержання фолієвої кислоти шляхом ко-культивування. Таким чином, при проведенні сумісної ферментації *Lactobacillus bulgaricus* CRL871, *S. thermophilus* CRL803 та *S. thermophilus* CRL415. За 4 години виробничого процесу відзначається найвищий рівень фолату, який становить  $263 \pm 12$  мкг/л [99].

Відомі ще продуценти фолату у вигляді молочнокислих бактерій. *S. macedonicus* CRL415 за 12 годин культивування при значенні рН за 12 годин культивування при значенні рН 6,0 може синтезувати  $210 \pm 1$  мкг/л. Температура процесу становила 42 °С [100].

Подібні результати спостерігаються при культивуванні *S. thermophilus* CRL803. Варто відзначити подібність технологічного підходу з минулою роботою [100], оскільки відзначається важливість рівня рН на значенні 6. На 6 годині культивування відмічається  $240 \pm 14$  мкг/л [101].

Отже, з порівняльною характеристикою продуцентів фолієвої кислоти можна ознайомитись в табл.3.2.

Таблиця 3.2

### Порівняння різних продуцентів фолієвої кислоти

Біологічний агент	Склад поживного середовища, г/л	Режим культивування	Концентрація фолату, мкг/л	Література
<i>Ashbya gossypii</i>	Дріжджовий екстракт - 2, Пептон - 20, Інозит - 0,6, Глюкоза - 10, Пара-амінобензойна кислота - 0,02	28 °С 72 год 250 об/хв	6595	[5]

<i>Lactobacillus reuteri</i> 6475:foIC	Пептон – 10, М'ясний екстракт – 8, Дріжджовий екстракт – 4, Глюкоза – 20, Дикалій гідрофосфат – 2, Натрію ацетат тригідрат – 5, Тріамонію цитрат - 2, Магнію сульфат гептагідрат – 0,2 Сульфат марганцю тетрагідрат – 0,05	37 °С, 24 год, рН 7,4	170 ± 25,6	[98]
<i>Streptococcus thermophilus</i> CRL803	Пептон - 15, Триптон - 10, Глюкоза – 10 Твіну 80 - 1	42 °С 6 год рН 6,0 100 об/хв	240 ± 14	[101]

Як було вище наведено, гриб *A. gossypii* має найвищу концентрацію серед усіх запропонованих мікроорганізмів. Проте, час його культивування є найдовшим, що може вплинути та зрівняти шанси з іншими продуцентами фолату. Найменший час культивування відмічається в штаму термофільного стрептококу та складає всього 6 годин. На фоні цього, *L. reuteri* 6475:foIC виглядають дуже не вигідним продуцентом для промислового виробництва.

Також, варто звернути увагу на поживні середовища, які доволі сильно відрізняються одне від одного, а цей параметр на пряму впливає на умовну вартість кінцевої продукції. Тому, в табл.3.3. пропонується ознайомитись з прорахунком вартості поживних середовищ.

Таблиця 3.3

### Розрахунок та порівняння вартості поживних середовищ для культивування біологічних агентів

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації
<i>A. gossypii</i>	Дріжджовий екстракт - 2	92,33	0,18	1
	Пептон - 20	540	10,8	2
	Інозит – 0,6	500	0,3	3
	Глюкоза - 10	49	0,49	4
	Пара-амінобензойна кислота – 0,02	295,8	0,006	5
<b>Вартість 1 л поживного середовища ≈ 11,78 грн</b>				

Таблиця 3.3.

<i>L. reuteri</i> 6475:folC	Пептон – 10	540	5,4	2
	М'ясний екстракт – 8	338,78	2,71	6
	Дріжджовий екстракт – 4	92,33	0,37	1
	Глюкоза – 20	49	0,98	4
	Дикалій гідрофосфат – 2	210	0,42	7
	Натрію ацетат тригідрат – 5	180	0,9	8
	Тріамонію цитрат - 2	40	0,08	9
	Магнію сульфат гептагідрат – 0,2	23	0,005	10
	Сульфат марганцю тетрагідрат – 0,05	45	0,0002	11
	<b>Вартість 1 л поживного середовища ≈ 10,87 грн</b>			
<i>S. thermophilus</i> CRL803	Пептон - 15	540	8,1	2
	Триптон -10	627,82	6,28	12
	Глюкоза – 10	49	0,49	4
	Твіну 80 - 1	330	0,33	13
	<b>Вартість 1 л поживного середовища ≈ 15,2 грн</b>			

Примітка (ціни наведено станом на грудень 2023 року): 1 - <https://russian.alibaba.com/p-detail/Yeast-62258786446.html?spm=a2700.8699010.29.11.2338a9abGVOIxy>, 2 - <https://labsnab.com/ua/p25753022-pepton-fermentativnyj.html>, 3 - <https://kreon-d.com.ua/ua/p881114230-mezo-inozit-vitamin.html>, 4 - <https://prom.ua/p818429907-dekstroza-glyukoza.html>, 5 - <https://www.alibaba.com/product-detail/4-Aminobenzoic-acid-50028682063.html?spm=a2700.7724857.0.0.d268e70d8j67E9>, 6 - <https://www.indiamart.com/proddetail/meat-extract-powder-19136982162.html>, 7 - <https://prom.ua/p953593209-kalij-fosfornokislyj-zameschennyj.html?&primelead=MC40MjU>, 8 - <https://prom.ua/p1747749466-atsetat-natriya-bezvodnyj.html>, 9 - [https://www.covalent.com.ua/ru/shop/ammonium\\_citrate/](https://www.covalent.com.ua/ru/shop/ammonium_citrate/), 10 - <https://prom.ua/p293371290-sulfat-magniya-magnij.html?&primelead=Mi4zNzU>, 11 - [https://www.covalent.com.ua/ru/shop/manganese\\_sulfate/](https://www.covalent.com.ua/ru/shop/manganese_sulfate/), 12 - <https://russian.alibaba.com/p-detail/Tryptone-1600311980882.html?spm=a2700.8699010.29.116.678066c3d5KiFt>, 13 - <https://shop.hlr.ua/tvin-80-97586.html>

За підрахунками табл.3.3. видно, що *S. thermophilus* CRL803 має найдорожче середовище для культивування, при цьому концентрація фолату не є найвищою, отже й умовна вартість метаболіту буде значно вищою порівняно з *A. gossypii*. Перерахунок останнього параметру та швидкості синтезу фолату показано в табл.3.4.

Таблиця 3.4

### Порівняння біологічних агентів за економічно важливими показниками

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища, грн	Концентрація фолату, мкг/л	Умовна вартість 1 мг фолату, грн/мкг	Тривалість культивування, год	Кількість утвореного фолату за годину, мкг/год
<i>A. gossypii</i>	11,78	6595	0,0018	72 год	91,5972
<i>L. reuteri</i> 6475:folC	10,87	170 ± 25,6	0,0639	24 год	7,0833

<i>S. thermophilus</i> CRL803	15,2	240 ± 14	0,0633	6 год	40
----------------------------------	------	----------	--------	-------	----

З кінцевої таблиці можна зробити висновок про доцільність застосування пліснявого гриба *A. gossypii* для промислової технології одержання фолієвої кислоти. Незважаючи на те, що цей штам має найдовший час культивування, умовна вартість фолату та швидкість його утворення показують найкращі результати з порівнювальними продуцентами.

Варто відмітити, що умовна вартість обраного метаболіту у *L. reuteri* 6475:folC та *S. thermophilus* CRL803 в загальному є однаковою, проте швидкість утворення кислоти відрізняється в 5,6 разів на користь термофільного стрептокока. Це каже про недоцільність застосування *L. reuteri*6475:folC в промислових масштабах для одержання вітаміну B9, оскільки це економічно не вигідно.

*S. thermophilus* CRL803 має непоганий показник швидкості утворення фолату за 1 годину, проте порівняно з пліснявим грибом різниця сягає в 2,3 рази, а умовна вартість – в 36 разів. Через це, для синтезу фолієвої кислоти біотехнологічним шляхом доцільно обрати *A. gossypii*, як основного продуцента.

### **3.4. Розрахунок потреби у фолієвій кислоті для випуску лікарського засобу та розрахунок річної потреби у культуральній рідині для одержання розрахованої кількості фолієвої кислоти**

Доксорубіцин можна використовувати для лікування сарком м'яких тканин і кісток, раку молочної залози, яєчників, сечового міхура та щитовидної залози. Він також використовується для лікування гострого лімфобластного лейкозу, гострого мієлобластного лейкозу, лімфоми Ходжкіна. Також, він використовується для лікування раку легень, бронх та трахей [102,103].

За останньою наявною статистикою від Національного інституту раку, яка датується 2021-2022 роком, усереднена кількість випадків раку легень, бронх та трахей по Україні становить 29,9 випадків на 100 000 населення [104]. Кількість

населення України станом на 2022 рік становить 34,5 млн [105]. Тоді, кількість випадків на цей регіон становить:

$$\frac{29,9 \times 34\,500\,000}{100\,000} \approx 10\,316 \text{ випадків}$$

Один курс лікування доксорубіцином складає 3 тижні [106]. Курс повторюється через місяць. Кількість циклів для лікування раку легень, бронх та трахей становить 4-6 (усереднено 5) [107]. Середня доза на один курс складає 1,8 мг/кг [106]. При виробництві ін'єкційної форми доксорубіцину на основі гелю, ефективність антрацикліну підвищується в середньому на 30% [1]. Тоді, дозування буде складати:

$$1,8 \times 0,7 = 1,26 \text{ мг/кг}$$

Середня вага українця (усереднені дані між чоловіком та жінкою) становить 75 кг [108]. Отже, добова доза препарату становить:

$$1,26 \times 75 = 94,5 \text{ мг/курс}$$

Враховуючи, що для 1 людини потрібно 5 курсів на рік, кількість доксорубіцину на рік становить:

$$94,5 \times 5 = 472,5 \text{ мг}$$

Отже, середня доза доксорубіцину на день становить:

$$\frac{94,5}{21} = 4,5 \text{ мг/доба}$$

Таку кількість препарату для зручності форми можна виготовляти в 10 мл гелевій ін'єкції. На 10 мл гелю припадає 10 мг фолату [1]. Тоді, для однієї людини кількість доз на 1 рік становить:

$$\frac{472,5}{4,5} = 105$$

Кількість доз, яка потрібна для забезпечення України на рік становить:

$$10\,316 \times 105 = 1\,083\,180 \text{ доз}$$

Кількість фолату, яка необхідна на рік:

$$1\,083\,180 \times 10 = 10\,831\,800 \text{ мг} \approx 10,8 \text{ кг}$$

Оскільки в Україні існують препарати для хіміотерапії, пропонується забезпечувати 20% від загальної потреби. Тому, кількість фолату, яка потрібна на рік, становить:

$$10,8 \times 0,2 = 2,16 \text{ кг}$$

Концентрація фолату в культуральній рідині становить 6595 мкг/л [5]. Тоді, кількість культуральної рідини на рік становить:

$$\frac{2160}{6,595} \approx 327 \text{ м}^3$$

Проте, під час виділення та очищення, будуть втрати вітаміну, що становить близько 30%. Тоді, кількість культуральної рідини на рік становить:

$$\frac{327}{1 - 0,3} = 467 \text{ м}^3$$

Приймаємо, що для отримання 467 м<sup>3</sup> культуральної рідини необхідно 300 робочих трудоднів (Т<sub>рд</sub>). Відповідно кількість культуральної рідини на добу (V<sub>д</sub>) становитиме:

$$V_{\text{д}} = V_{\text{кр}} / T_{\text{рд}} = 467 / 300 \approx 1,5 \text{ м}^3$$

Розрахуємо кількість культуральної рідини за один цикл, (V<sub>крц</sub>):

$$V_{\text{крц}} = K_1 \cdot V_{\text{д}} \cdot T_{\text{цф}} / 24 = 1,1 \cdot 1,5 \cdot 79 / 24 \approx 5,4 \text{ м}^3,$$

де T<sub>цф</sub> - 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 – 72 год, та вивантаження – 0,5 год, і становить 79 години. K<sub>1</sub> – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій (K<sub>1</sub> = 1,1).

## РОЗДІЛ 4

### ОБҐРУНТУВАННЯ ЕТАПІВ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИСТКИ ВІТАМІНУ В9 ДЛЯ ІН'ЄКЦІЙНОГО ГІДРОГЕЛЕВОГО ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ

Водорозчинні та жиророзчинні вітаміни відокремлюють і очищають різними методами, такими як капілярний електрофорез, ВЕРХ і хроматографія. Найпопулярнішою є іонообмінна хроматографія [109]. Дана технологія є доволі поширеною в технології, проте має певні недоліки [110]:

- Довгострокові витрати є високими, коли йдеться про експлуатацію іонообмінного обладнання
- Неможливо ефективно видалити бактерії та їх залишки з води
- Хоча іонообмінні шари можна регенерувати, використана вода під час цього процесу направляється безпосередньо в навколишнє середовище

Тому, іонообмінна хроматографія є дуже дорогим задоволенням для виробництва різних продуктів. Тому, варто розглянути альтернативний варіант виробництва фолієвої кислоти.

В загальному, вітамін В9 синтезується всередині клітини, тобто є ендометаболітом. Тому, першою стадією в будь-якому випадку буде відділення біомаси від культуральної рідини [5,35].

Після того, як біомасу відокремлять, наступним логічним кроком є вивільнення ендометаболітів з клітини, а іншими словами – її руйнування. Проте, перед тим, як зруйнувати біомасу, її ресуспендують у різних розчинах, для збереження та/або очищення від зайвих залишок, на скільки це можливо. Тому, наступною стадією буде саме ресуспендування біомаси [5,111].

Після того, як біомасу ресуспендують, потрібно ретельно підібрати методику руйнування. Для руйнування грибною біомаси використовують зазвичай такі методи: ультразвукову дезінтеграцію, гомогенізацію, застосування хімікатів

різних типів і осмотичний шок. Тому, додатково потрібно буде обґрунтувати

*НУХТ БТЕК 02.02.20 КР ПЗ*

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Тугарева Т.І.			РОЗДІЛ 4	Лім.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Карлаш Ю.В.			ОБҐРУНТУВАННЯ ЕТАПІВ		70	133
Реценз.					ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИСТКИ ВІТАМІНУ	Кафедра БТМ		
Н. Контр.					В9 ДЛЯ ІН'ЄКЦІЙНОГО			
Затверд.		Стабніков В.П.			ГІДРОГЕЛЕВОГО ЛІКАРСЬКОГО			
					ЗАСОБУ			

методику зруйнування клітин, оскільки це буде наступна стадія після ресуспендування [5,112].

Після цього, фолієву кислоту нерідко кип'ятять. Це пов'язано з тим, що вітамін доволі стійкий до високих температур і може спокійно витримати температуру кипіння, але деякі метаболіти з клітини, а також самі залишки клітин не можуть пережити таку обробку. Тому наступною стадією варто зазначити саме кип'ятіння, для видалення частини метаболітів клітини. Після кип'ятіння, в екстракті частина речовин випадає в осад, які також додатково відокремлюють, що потрібно буде також обгрунтувати. Але ці стадії не вирішують усі питання очистки фолату, тому вітамін потрібно і далі очищати за допомогою різних методик [5].

Таким чином, за цими стадіями ми вивільнемо усі необхідні ендометаболіти, а частина з них уже відокремлена кип'ятінням. Проте, в розчині все одно залишається певна кількість речовин, від яких фолат треба відокремити та очистити. Існує методика шляхом обробки розчину фолату різними розчинами, які поступово будуть його очищати від домішок. До цих розчинів відносять N-р-бензоїл-підолідон, 2,4,5-триамідо-6-гідроксипіримідин сірчаної кислоти, солі аміаку, трихлорацетон, та кінцева нейтралізації шляхом видалення кислого розплаву. Хоча за цією методикою в подальшому виходить чистий продукт, він не є стабільним та може піддаватись окисненню. Також, після такої обробки дуже важко видалити зайвий аміак. Ще одним недоліком може стати ціна деяких реагентів, а також їх доступність. Тому, існує інша методика очистки фолієвої кислоти [113].

Інша методика передбачає поступову обробку розчину з фолатом різними реагентами. Першим етапом є обробка лужним розчином. Фолієва кислота розчинна у лугах, а деякі метаболіти можуть під її дією розпастись. При цьому, ця стадія необхідна для подальшого проходження розчину крізь активоване вугілля, на яке буде адсорбуватись більша кількість домішків. Реакція характеризується постійним нагрівом розчину фолату з вугіллям до температури 50-80°C, при цьому відмічається знебарвлення розчину [113].

Після того, як розчин з вітаміном 30 хвилин перемішувався з активованим вугіллям, до них додають антиоксидант, який додатково варто обґрунтувати. Його додають з метою зменшення втрат та окиснення самого вітаміну, що буде дуже небажаною реакцією всього виробництва фолієвої кислоти. При цьому, розчин з вугіллям та антиоксидантом нагрівають ще дужче, до 90-110°C, щоб ще більша частина непотрібних речовин адсорбувалась на вугілля [113].

Після вугільної обробки, вугілля відфільтровують. Зазвичай, вугілля це доволі велика фракція, а тому для його фільтрації нерідко використовують промислові фільтр-преси. Проте, це додатково треба врахувати для належного обґрунтування [113].

Крім того, що в розчині можуть залишитись дрібні фракції вугілля, його потрібно зменшити в об'ємі, тобто, зконцентрувати. Тому, для цих двох цілей можна використовувати додаткову стадію фільтрування на ультрафільтраційній установці. Тому, після фільтрування великих фракцій вугілля буде застосовуватись фільтрування меншої фракції цього ж реагенту, а також концентрування самого розчину [113].

Після цього, до розчину додають концентровану кислоту, щоб очищений фолат випав в осад. Після цього, його відокремлюють від водного розчину та додають воду. При цьому дивляться на значення рН, оскільки фолієва кислота стабільна при рН 4-8 і деградує, якщо його значення нижче [113,114].

Після всіх цих стадій, одержується дуже чистий фолат. Його ступінь становить близько 99,24% [113]. Тому, кінцевою стадією є його сушіння. Враховуючи усі стадії очистки та виділення, можна скласти узагальнену схему етапів:

1. Відділення біомаси від культуральної рідини
2. Ресуспендування біомаси для подальшого руйнування клітин та вивільнення ендометаболітів
3. Деструкція клітин для одержання внутрішньоклітинних метаболітів
4. Кип'ятіння розчину метаболітів для часткового очищення фолату

5. Фільтрування прокип'яченого розчину від осаду з випавших ендометаболітів
6. Розчинення залишкового розчину в лужному розчині
7. Обробка лужного розчину з фолатом за допомогою активованого вугілля та антиоксидантом
8. Відокремлення грубодисперсних частинок вугілля від частково очищеного розчину фолату
9. Концентрування розчину неактивного фолату та відокремлення дрібних частинок вугілля
10. Підкислення розчину фолієвої кислоти з метою одержання його осаду, з подальшим відділенням
11. Розчинення осаду очищеної фолієвої кислоти
12. Сушіння готового продукту

Отже, визначивши загальні етапи для очистки фолату, маємо більш детально розглянути деякі моменти етапів очистки цього вітаміну.

#### **4.1. Обґрунтування відділення біомаси від культуральної рідини**

Відділення біомаси від рідини включає багато технологій, що використовуються залежно від завдання. До них відносяться [113]:

- Осадження - відділення під дією сили тяжіння (при очищенні стічних вод);
- Фільтрація - пропускання суспензії в фільтруючий матеріал, де уловлюються частинки твердої фази-біомаса (виробництво антибіотиків);
- Сепарація, центрифугування - відокремлення під дією відцентрової сили (виробництво кормової біомаси - дріжджів, бактерій).
- мікрофільтрація для пропускання суспензії через мембрану з невеликим діаметром пор для забезпечення вмісту мікробних клітин, ультрафільтрація; ультрафільтрація дозволяє утримувати великі молекули розчинних речовин;
- Коагуляція - додавання реагентів до суспензії для осадження більших клітинних агрегатів та їх відділення від розчину та рідини;

- Флотація - уловлювання мікробної біомаси пінним кулькою і відділення її від фракції піни.

Варто врахувати всі можливі негативні сторони кожного методу. Все, що стосується методу фільтрації, непогано для методу, коли цільовий продукт знаходиться в супернатанті. Це пояснюється тим, що тверда фаза і великі медулярні маси (в разі мікро - і ультрафільтрації) залишаються на фільтруючому матеріалі, але з цього випливає основний недолік, це закупорювання фільтрів, а отже необхідність у їх постійному відмиванні та регенерації, що потребує додаткового часу, а іноді реагентів. Ці недоліки не дають можливості обрати саме ці методики для цієї стадії, через велику кількість біомаси, яка буде сповільнювати процес, а не ітенсифікувати його [115].

Коагуляція, флотація також є хорошими методами, але для розділення біомаси та надосаду потрібно багато часу. Це збільшує час виробництва вітаміну і, відповідно, збільшує кінцеву вартість продукту, що негативно позначається на виробництві. Цей негативний ефект також не дає змоги обрати цю методику за основну для подальшого виділення фолієвої кислоти [115].

Тож, потрібно вибрати між сепарацією та центрифугуванням, оскільки воно базується на одному принципі - використання відцентрової сили для відділення твердої фази від рідини. Сепаратори в даний час широко використовуються в молочній промисловості. Їх головний недолік полягає в тому, що мундштуки і простір між тарілками швидко забиваються механічними включеннями і мертвими клітинами. Що стосується центрифуг, то в даний час вони стали більш поширеними в процесі поділу твердої і рідкофазної біотехнологій і все частіше використовуються для одержання препаратів ферментів. До основних недоліків цього типу обладнання можна віднести можливість механічного пошкодження клітин, але нас цікавлять не клітини, а супернатант [115]. Тому, спираючись на всі позитивні та негативні аспекти обираємо саме центрифугування.

#### **4.2. Обґрунтування розчину для ресуспендування біомаси**

Для одержання фолату з рекомбінантного штаму *A. gossypii* пропонується наступний розчин для ресуспендування: аскорбінова кислота – 2%, 0,1 М фосфатний буфер та 0,1% β-меркаптоетанол. Це розчин частково починає лізувати клітини гриба для лішого вивільнення фолієвої кислоти. Відомо, що аскорбінова кислота у великій концентрації інгібує ріст міцеліальних грибів, а також є доволі токсичною речовиною, що зумовлює залишити цей реагент в розчині для ресуспендування. Крім того, фолієва кислота попереджає окислення речовин, що також стосується зберігання фолату [5,116].

Крім антиоксидантної функції аскорбінової кислоти, цю ж мету, в даному випадку виконує і інший реагент - β-меркаптоетанол. Крім того, він захищає білкові структури від руйнації, яку може спричинити аскорбінова кислота. Проте, білки також будуть згодом відокремлені від вітаміну, як мінімум, шляхом кип'ятіння, тому цей реагент також варто залишити у складі розчину для ресуспендування [5,117].

Фосфатний буфер як раз використовується для денатурації та розчинення білків, які згодом буде дуже легко відокремити як раз таки за допомогою кип'ятіння, тому дану основу необхідно також залишити [5,118].

Отже, залишаємо розчин для ресуспендування незмінним.

### **4.3. Обґрунтування методу руйнування клітинної маси**

Руйнування клітин проводиться фізичними, хімічними і ферментативними методами. Найбільше промислове значення мають фізичні способи дезінтеграції [119]:

- 1) ультразвуком;
- 2) лопаток або вібраційними дезінтеграторами - метод, що часто використовується в пілотних і промислових установках;
- 3) струшуванням зі скляними бусами;
- 4) продавлювання через вузькі отвори під високим тиском;
- 5) роздавлюванням замороженої маси;
- 6) розтиранням в спеціальних ступках;
- 7) за допомогою осмотичного шоку;

8) багаторазовим заморожуванням і розморожуванням;

9) стисненням клітинної суспензії з наступним різким зниженням тиску (декомпресією).

Фізичні способи дезінтеграції відрізняються більшою економічністю в порівнянні з іншими методами. Найпоширенішими є ультразвукова дезінтеграція та руйнування за допомогою гомогенізатора [119].

Перший метод доволі часто використовується в лабораторних установках, рідше – в промисловості через основний недолік, а саме – звук, який негативно впливає на здоров'я співробітника. Для цього додатково закупають засоби індивідуального захисту, у вигляді беруш або спеціальних навушників на вуха, що призводить до додаткових витрат на виробництво кінцевої продукції [119,120].

Щодо гомогенізатора, його частіше можна зустріти в промисловості, ніж соніфікатор (ультразвуковий дезінтегратор), що каже про його більшу значимість та перевагу. Окрім того, дослідники, які очищали фолат з *Ashbya gossypii* використовували для своїх цілей саме гомогенізатор. Цей прилад також непогано руйнує клітини та не видає на стільки неприємного шуму, як ультразвуковий дезінтегратор. Останній апарат дуже часто використовують для виділення та очищення білків, а оскільки наш цільовий продукт – це вітамін, а білки попередньо будуть денатуровані та розчинені, промисловий гомогенізатор ідеально підходить для наших цілей, виділяючи вітамін і частково руйнуючи білки [5,119,120].

Також, можна було б розглянути й інші методи, такі як хімічні, ензиматичні та комбіновані, але є пару припущень, які дозволяють звернути увагу саме на фізичні методи. Перше – закупівля реагентів всіх цих зазначених методик, що є не дуже економічно. Друге – клітини грибів попередньо лізуються в розчині для ресуспендування, що вже частково каже про комбіновану методику, а тому, її додатково розглядати не потрібно [119,120].

Тому, на цій стадії обираємо саме промисловий гомогенізатор, як найкращий варіант у нашому випадку як фізичного методу руйнації клітин.

Після того, як клітини будуть зруйновані, на цій стадії нас цікавить саме клітинний екстракт, а не твердий залишок, який також потрібно відокремити. Тому, звертаючи увагу на п.1.1., пропонується обрати саме центрифугування, для ефективного відокремлення залишків біомаси грибів, а також одержання розчину ендометаболітів.

#### **4.4. Обґрунтування стадії кип'ятіння**

Дана стадія необхідна для часткового очищення фолату від клітинних домішків. Як було сказано раніше, з грибної клітини назовні будуть виділятися білки, більшість з яких не переносять високу температуру, що дозволяє використовувати кипіння як метод їх денатурації та очистки фолієвої кислоти [121].

Крім того, грибна клітина містить в собі велику кількість глюканів, які доволі важко відділити. Під час кипіння глюкани деградують на більш малі молекули, що потім дозволить їх з легкістю видалити за допомогою активованого вугілля [122].

Тож, стадія кипіння необхідна для видалення білків та руйнування глюканів, що буде призводити до більшої очистки кінцевого продукту.

#### **4.5. Обґрунтування методу відокремлення частково очищеного розчину фолату від осаду**

Варто зазначити, що після кип'ятіння в осад може випасти білок, глікопротеїни, частково глюкан, а також інші залишки грибної клітини, які варто відокремити. Оскільки цей осад може бути не великим, використовувати метод центрифугування в даному випадку – не дуже економічно. Це пов'язано з потребою в електроенергії для цього виду апаратів.

Знову ж таки, оскільки кількість осаду буде не дуже великою, можна використати для цього фільтраційну установку. В роботі [5], пропонується використовувати стерилізуючий фільтр на 0,22 мкм. Проте, такий фільтр не підходить для відокремлення молекул фолієвої кислоти, оскільки вони банально більші. Зважаючи, що їх молекулярна маса становить 441 г/моль, тобто близько 0,44 кДа, то це відповідає близько 0,06 нм. Тому, пропонується залишити свій

вибір на фільтраційній установці, з діаметром пор в 0,06 нм для відокремлення розчину фолату від інших речовин. Стосовно установки, з таким діаметром фільтрів варто обрати саме установку зворотнього осмосу, яка дозволить відокремити дуже малі часточки, від доволі великих, оскільки ультрафільтраційна установка використовується до фільтрів в 10 нм [123].

#### 4.6. Обґрунтування лужного розчину для розчинення фолату

В роботі [113], для додаткового розчинення фолату, а також можливої деградації домішок пропонують 30-40% розчин гідроксиду натрію. Альтернативними розчинами можуть бути наступні речовини: гідроксид кальцію, карбонат кальцію, гідроксид магнію, карбонат магнію, цинк карбонат, оксид магнію, гідроксид цинку, оксид кальцію, оксид цинку та карбонат кадмію. Найкращим з цього списку за роботою [124], вважається гідроксид кальцію. Тому, пропонується порівняти 2 основних реагенти для вибору кінцевого лугу з метою одержання лужного розчину.

Таблиця 4.1.

#### Порівняння лугів

Назва	Вартість в Україні, грн/кг	Вартість 1 л 30-% розчину, грн/л	Джерело
Гідроксид натрію	36	10,8	[125]
Гідроксид кальцію	38	11,4	[126]

Дослідники відзначають, що лужний розчин потрібен для адсорбції різноманітних домішок, при цьому, фолієва кислота адсорбуватись не буде, що дозволяє її ретельно очистити [124]. Спираючись на табл.4.1., вигідним варіантом є використання саме гідроксиду натрію. Тому, залишаємо наш вибір саме на цьому реагенті.

#### 4.7. Обґрунтування методу відокремлення вугілля

Вугілля використовується як адсорбент різних речовин, які знаходяться в лужному розчині. Але, його варто відокремити. З врахуванням усіх методів з п.4.1., найліпшим варіантом в даному випадку буде застосування методу

фільтрування [113,119,127]. Якщо використовувати центрифугування, вугілля буде дуже кришитися, через що його буде важко вивантажувати та мити обладнання. Також, можна було б використати метод відстоювання, але це дуже довго, що є небажано.

Тому, пропонується звернути увагу на метод фільтрування, а саме на фільтрування крізь фільтр-прес. Вугілля буде затримуватись у рамках апарату, а з нього буде виходити грубо очищений розчин з фолатом.

#### **4.8. Обґрунтування вибору антиоксиданту**

На думку дослідників з роботи [113], найкращим антиоксидантом на цій стадії є гідросульфід натрію. Проте, також можна використовувати тіосульфат натрію, піросульфід натрію. Додавання антиоксиданту становить від загального об'єму на цій стадії всього 1%. Тому, для кінцевого вибору, пропонується визначити їх економічну доцільність.

*Таблиця 4.2.*

#### **Порівняння антиоксидантів**

Назва	Вартість в Україні, грн/кг	Вартість 1 л 1-% розчину, грн/л	Джерело
Гідросульфід натрію	78	0,78	[128]
Тіосульфат натрію	100	1	[129]
Піросульфід натрію	81	0,81	[130]

Отже, найдешевшим варіантом є гідросульфід натрію, тому залишаємо вибір саме на ньому.

#### **4.9. Обґрунтування методу концентрування очищеного розчину фолієвої кислоти**

Найбільш поширені такі методи концентрування: екстракція та екстракційна хроматографія, співосадження та осадження, дистиляційні методи (відгонка, фракційне випаровування, сублімація), адсорбційна, розподільча, осаджувальна хроматографія, іонний обмін, електроосадження, іонофорез,

електродіаліз, флотація, ультрацентрифугування, мінералізація. Способи проведення концентрування залежать від методу аналізу. Для проведення концентрування в деяких випадках необхідні реактиви високої чистоти (всі види хроматографії, електрохімічні методи) у великій кількості, а іноді й спеціальна апаратура [131].

З врахуванням особливостей нашого вихідного розчину, можна розглядати 2 методи концентрування, це упарювання та фільтрація за допоомгою зворотнього осмосу. Фолат є дуже термостабільним вітаміном, а тому може витримувати доволі високі температури, що дозволяє використовувати методіку упарювання. Щодо фільтрації, її варто розглядати як основний метод відокремлення, через малі залишки вугілля. У такому випадку метод випарювання є недоцільним, оскільки він не прибирає зайві залишки непотрібних речовин [131].

Тому, обираємо фільтрування через зворотній осмос, з врахуванням розміру вітаміну, крізь фільтр 0,06 нм, для відокремлення мікрозалишків вугілля та концентрування розчину фолату.

#### **4.10. Обґрунтування розчину кислоти для одержання осаду чистого фолату**

Щодо кислоти в роботах [113] та [119] рекомендують використовувати саме соляну кислоту в концентрації 30-%. З врахуванням того, що соляну кислоту зазвичай використовують в концентраті 37-%, що доволі зручно для нашого виробництва. Крім того, вона доволі дешева, тому, враховуючи, що в двох роботах підтверджується її дієвість, пропонується залишити цей реагент незмінним [132].

На цій стадії фолат випадає в осад, а тому потрібно передбачити його відокремлення. З врахуванням опису методів відокремлення з п.4.1., пропонується використати технологію центрифугування, оскільки концентрація фолату не настільки велика, щоб використовувати фільтрувальні установки, що спричинить великі втрати, або інші методіки.

Тому, після того, як фолат випаде в осад, його потрібно відцентрифугувати. Після цього, вітамін розчиняють у воді, оскільки він

водорозчинний, для стабілізації рН, щоб вітамін не деградував, та для подальшої можливості сушіння препарату.

#### **4.11. Обґрунтування методу сушіння фолієвої кислоти**

З врахуванням того, що об'єм розчину вітаміну буде не дуже великим, а також через те, що вітамін термостійкий (витримує до 250 °С), варіант використання ліофілізаційної сушарки одразу відпадає. Логічно використовувати сушильні шафи з деко. Недоліки – вивантаження на деко відбувається вручну, але ці шафи дозволяють доволі швидко висушити вітамін конвективним методом, зменшуючи втрати до мінімуму [115].

Тому, сушіння відбуватиметься в конвективній сушарці.

Отже, обґрунтувавши певні моменти виділення та очищення, маємо наступну схему виділення:

1. Відокремлення біомаси від культуральної рідини центрифугуванням
2. Ресуспендування біомаси в розчині з фосфатним буфером, аскорбіною кислотою та  $\beta$ -меркаптоетанолом з частковим лізисом грибних клітин
3. Руйнування грибної біомаси за допомогою промислового гомогенізатора
4. Відокремлення клітинного екстракту від клітинного залишку центрифугуванням
5. Кип'ятіння клітинного екстракту для видалення білків, глікопротеїнів та деструкції глюканів
6. Відокремлення частково очищеного розчину фолату від осаду методом зворотнього осмосу
7. Підлужнення розчину фолату для адсорбції домішок, що залишились
8. Адсорбція домішок до активованого вугілля, а також додавання гідросульфїту натрію як антиоксиданту для фолату
9. Відокремлення грубих частин вугілля за допомогою фільтр-пресса
10. Відокремлення малих частин вугілля та концентрування методом зворотнього осмосу

11. Додавання соляної кислоти до концентрату фолату для його осадження
12. Відокремлення осаду чистого фолату від кислотного розчину методом центрифугування, з подальшим розчиненням вітаміну у воді для його стабілізації
13. Висушування вітаміну в сушильній конвективній шафі

## РОЗДІЛ 5

### ПІДБІР ТЕХНОЛОГІЧНОГО ОБЛАДНАННЯ З ВРАХУВАННЯМ МАТЕРІАЛЬНИХ ПОТОКІВ ПО СТАДІЯХ

Вихідні дані:

1. Об'єм культуральної рідини з однієї ферментації ( $V_{кр}$ ) = 5,4 м<sup>3</sup>;
2. Концентрація біомаси рекомбінантного штаму *A. gossypii* в культуральній рідині ( $C_{біом}$ ) = 5,1 г/л;
3. Концентрація фолату в культуральній рідині становить ( $C_{цекропінуА}$ ) = 6595 мкг/л;
4. Кількість втрат при очистці – 30%.

За один цикл одержується 5,4 м<sup>3</sup> культуральної рідини. Отже, за один цикл можна одержати  $5,4 \times 6595 = 35\ 613$  мг або 35,61 г. Враховуючи втрати, кінцева кількість фолату має становити  $35,61 \times 0,7 = 24,93$  г. Виділення ґрунтується на роботі [5] та [26,27]. Розподіл втрат по усім стадіям виділення і очищення наведено в таблиці 2.1.

*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 30 %)	Вийшло	
1	2	3	4	5	6	7
<b>ТП 4 Зберігання культуральної рідини</b>						
1	Зберігання культуральної рідини	Культуральна рідина	5,4 м <sup>3</sup>	-	5,4 м <sup>3</sup>	Збірник культуральної рідини об'ємом 10 м <sup>3</sup>

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.20 КР ПЗ</i>					
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.	Тугарева Т.І.				РОЗДІЛ 5 ПІДБІР ТЕХНОЛОГІЧНОГО ОБЛАДНАННЯ З ВРАХУВАННЯМ МАТЕРІАЛЬНИХ ПОТОКІВ ПО СТАДІЯХ				82	133
Перевір.	Карлаш Ю.В.							<i>Кафедра БТМ</i>		
Реценз.										
Н. Контр.										
Затверд.	Стабніков В.П.									

<b>ТП 5 Центрифугування культуральної рідини</b>						
2	Центрифугування культуральної рідини	Культуральна рідина	5,4 м <sup>3</sup>	-	-	В проточній центрифугі
		Надосад	5,13 м <sup>3</sup>	-	5,13 м <sup>3</sup>	На утилізацію
		Осад	27,54 кг	2%	26,24 кг	В збірник на 100 л
<b>ТП 6 Ресуспендування біомаси</b>						
3	Ресуспендування біомаси	Осад	26,24 кг	-	-	Збірник на 100 л
		0,1 М фосфатний буфер	26,24 л	-	-	
		Аскорбат натрію	1,05 кг	-	-	
		β-меркаптоетанол	26,6 мл	-	-	
		Ресуспендована біомаса	-	-	53,56 л	До промислового гомогенізатору
<b>ТП 7 Руйнування клітин гомогенізатором</b>						
4	Руйнування клітин гомогенізатором	Ресуспендована біомаса	53,56 л	-	-	В промислового гомогенізаторі
		Зруйнована клітинна суспензія	-	3%	51,95 л	До збірника на 2,5 м <sup>3</sup>
<b>ТП 8 Розведення та обробка клітинного екстракту у фосфатному буфері</b>						
5	Центрифугування зруйнованої клітинної суспензії	Зруйнована клітинна суспензія	51,95 л	-	-	В збірнику на 2,5 м <sup>3</sup>
		0,1 М фосфатний буфер	2258,7 л	-	-	
		Панкреатин	262 г	-	-	
		Розведений клітинний екстракт	-	-	2310,9 л	
<b>ТП 9 Кип'ятіння клітинного екстракту</b>						
6	Кип'ятіння клітинного екстракту	Розведений клітинний екстракт	2310,9 л	-	-	В збірнику на 2,5 м <sup>3</sup>
		Прокип'ячений екстракт	-	5%	2195,4 л	До ультрафільтраційної установки
<b>ТП 10 Фільтрування клітинного екстракту</b>						
7	Фільтрування клітинного екстракту	Прокип'ячений екстракт	2195,4 л	-	-	Ультрафільтраційна установка
		Клітинний осад	-	-	26,24 кг	На утилізацію
		Фільтрат	-	5%	2060,7 л	До збірника на 5 м <sup>3</sup>

<b>ТП 11 Обробка фільтрату лужним розчином</b>						
8	Обробка фільтрату лужним розчином	Фільтрат	2060,7 л	-	-	В збірнику на 5 м <sup>3</sup>
		30-% гідроксид натрію	883,2 л	-	-	
		Лужний розчин	-	-	2943,9 л	
<b>ТП 12 Нагрівання та додавання активованого вугілля</b>						
9	Нагрівання та додавання активованого вугілля	Лужний розчин	2943,9 л	-	-	В збірнику на 5 м <sup>3</sup>
		Активоване вугілля	122,7 кг	-	-	
		Лужний розчин з вугіллям	-	-	3066,6 л	
<b>ТП 13 Додавання гідросульфід натрію з нагріванням</b>						
10	Додавання гідросульфід натрію з нагріванням	Лужний розчин з вугіллям	3066,6 л	-	-	В збірнику на 5 м <sup>3</sup>
		Гідросульфід натрію	30,95 кг	-	-	
		Розчин з антиоксидантом	-	-	3097,55 л	До фільтр-пресу
<b>ТП 14 Фільтрування розчину для відокремлення вугілля</b>						
10	Фільтрування лужного розчину для відокремлення вугілля	Лужний розчин з вугіллям	3097,55 л	-	-	На фільтр-пресі
		Віпрацьоване активоване вугілля	-	-	122,7 кг	На утилізацію
		Відфільтрований розчин	-	5%	2826,1 л	До ультра-фільтраційної установки
<b>ТП 15 Концентрування розчину з фолатом</b>						
12	Фільтрування розчину з фолатом	Відфільтрований розчин	2826,1 л	-	-	Ультра-фільтраційна установка
		Пермеат	-	-	2557,6 л	На утилізацію
		Фільтрат	-	5%	268,5 л	До збірнику на 500 л
<b>ТП 16 Додавання сірчаної кислоти до фільтрату</b>						
13	Додавання сірчаної кислоти до фільтрату	Фільтрат	279,6 л	-	-	В збірнику на 500 л
		30-% сірчана кислота	67,13 л	-	-	
		Кислотний розчин	-	-	346,73 л	
<b>ТП 17 Додавання води до кислотного розчину для стабілізації</b>						
14	Додавання води до кислотного розчину для стабілізації	Кислотний розчин	346,73 л	-	-	В збірнику на 500 л
		Вода знесолена	100 л	-	-	
		Стабілізований розчин фолату	-	-	446,73 л	До розпилювальної сушарки
<b>ТП 18 Сушіння розчину фолату</b>						
15	Сушіння розчину фолату	Стабілізований розчин фолату	446,73 л	-	-	В розпилювальної сушарці
		Порошок фолієвої кислоти	-	5%	24,93 г	В скляну тару на 50 мл на склад

**РОЗДІЛ 6**  
**СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ВИДІЛЕННЯ ТА**  
**ОЧИЩЕННЯ ФОЛІЄВОЇ КИСЛОТИ**

Специфікація апаратурного обладнання для одержання фолієвої кислоти показано в табл.6.1

*Таблиця 6.1.*

**Специфікація обладнання виробництва фолату**

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
ПЗ-1	Повірезабірник	1	Обладнаний металевою сіпкою для видалення механічних забруднень.
Ф - 2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтр повітряний волокнистий класу очистки G4. Матеріал фільтру – поліестер. Робоча температура від -40 до +70 ° С. не регенерується. <sup>1</sup>
Ф-3	Фільтр тонкої очистки	1	Повітряний кишеньковий фільтр класу очистки F9. Матеріал фільтру – поліестер. Пожежонебезпечний клас K1/F1. <sup>2</sup>
Ф-4	HEPA фільтр	1	Фільтри тонкої очистки повітря HEPA класу очистки U16. Матеріал фільтру – скляні волокна діаметром 0,25... 1,0 мкм. Робоча температура до 280 °С. <sup>3</sup>
Т-5	Теплообмінник-нагрівач	1	Пластинчастий теплообмінник THERMAKS PTA (GC) -16. Нагрівуючий елемент – вода або пара. Максимальна робоча температура – 180 °С. <sup>4</sup>
Ф-6 Ф-11	Пісочний фільтр	2	Піщаний фільтр Hayward ProGrid DE4820. Продуктивність фільтрування до 22 м <sup>3</sup> /год. Матеріал корпусу – поліестер. Тип підключення – бокове. <sup>5</sup>
Ф-7	Вугільний фільтр	1	Вугільний промисловий фільтр для очищення води YLD-MF- 1800. Продуктивність до 25 м <sup>3</sup> /год. Матеріал корпусу – поліестер. Тип підключення – вертикальне. <sup>6</sup>
3-8 3-13 3-34	Збірник об'ємом 5000 л	3	Реактор 5000 л GSH 5000. Матеріал – нержавіюча сталь. Швидкість перемішування мішалки – 0-1000 об/хв. Робоча температура від – 135 до + 350 °С. <sup>7</sup>

					<i>НУХТ БТЕК 02.02. КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>	<i>Тугарева Т.І.</i>				<b>РОЗДІЛ 6</b> <b>СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ</b> <b>ДЛЯ ВИДІЛЕННЯ ТА</b> <b>ОЧИЩЕННЯ ФОЛІЄВОЇ</b> <b>КИСЛОТИ</b>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Перевір.</i>	<i>Карлаш Ю.В.</i>						85	133
<i>Реценз.</i>						<b>Кафедра БТМ</b>		
<i>Н. Коитр.</i>								
<i>Затверд.</i>	<i>Стабніков В.П.</i>							

Продовження табл. 6.1.

Д-9 Д-15 Д-18 Д-21 Д-36	Ваговий дозатор	5	Ваговий дозатор від Артмаш. Мінімальна межа дозування: 0,2 кг. Дискретність: 0,005 г Продуктивність: 800-1200 кг / год. <sup>8</sup>
Н-10 Н-32 Н-37	Відцентровий насос	3	Насос відцентровий М-400В. Продуктивність – 10 м <sup>3</sup> /год. Максимальний робочий тиск – 8 бар. Корпус виконано з чавуну, а ротор – з нержавіючої сталі. <sup>9</sup>
УЗ-12	Установка зворотнього осмосу	1	Промислова система зворотного осмосу OSFIL-3000. Продуктивність – 3 м <sup>3</sup> /год. Ступінь видалення солей з очищеної води - до 99,9%. <sup>10</sup>
3-14	Збірник об'ємом 3000 л	1	Реактор 3000 л GSH 3000. Матеріал – нержавіюча сталь. Швидкість перемішування мішалки – 0-1000 об/хв. Робоча температура від – 135 до + 350 °С. <sup>7</sup>
Д-16 Д-19 Д-22 Д-27 Д-31 Д-35 Д-41 Д-42	Об'ємно-ваговий дозатор	8	Дозатор для вди і рідин. Встановлення дозування від 10 мл до 9999 л. Похибка дозування не більше 0,5%. Робочий тиск від 0,5 атм до 10 атм. <sup>11</sup>
3-17	Збірник об'ємом 1000 л	1	Реактор 1000 л GSH 1000. Матеріал – нержавіюча сталь. Швидкість перемішування мішалки – 0-1000 об/хв. Робоча температура від – 135 до + 350 °С. <sup>7</sup>
3-20 3-26	Збірник об'ємом 100 л	2	Реактор 100 л JSR-100L. Матеріал – нержавіюча сталь SS304. Швидкість перемішування мішалки – 0-600 об/хв. Робочий тис від -1 до 0,49 МПа. <sup>12</sup>
3-23	Збірник об'ємом 10000 л	1	Реактор 10000 л GSH 10000. Матеріал – нержавіюча сталь. Швидкість перемішування мішалки – 0-1000 об/хв. Робоча температура від – 135 до + 350 °С. <sup>7</sup>
Н-24	Відцентровий насос	1	Відцентровий насос Aquaviva LX SEQ750. Продуктивність до 100 м <sup>3</sup> /год. Потужність: 4 кВт. Під'єднання – фланцеве. <sup>13</sup>
Ц-25	Проточна центрифуга	1	Проточна центрифуга GF/GQ150. Продуктивність 800-1000 л/год. Максимальна швидкість ротора – 16000 об/хв. <sup>14</sup>
Н-28 Н-43	Насос перистальтичний	2	Перистальтичний насос MP-1136-22. Продуктивність – 630 л/год. Робочий тиск до 8 бар. Двигун - 0,55 кВт. <sup>15</sup>

Закінчення табл. 6.1.

Г-29	Промисловий гооенізатор	1	Гомогенізатор високого тиску (мікрофлюїдазер) М-815. Гомогенізатор проточного типу. Продуктивність 1000 мл/хв. Досягає тиску обробки до 2068 бар. <sup>16</sup>
3-30	Збірник об'ємом 2500 л	1	Реактор 2500 л GSH 2500. Матеріал – нержавіюча сталь. Швидкість перемішування мішалки – 0-1000 об/хв. Робоча температура від – 135 до + 350 °С. <sup>7</sup>
УФ-33 УФ-39	Ультрафільтраційна установка	2	Ультрафільтраційна установка BTS-MF5000. Продуктивність – до 5000 л/год. Оснащується керамічними фільтрами. Матеріал обладнання – нержавіюча сталь SUS316. <sup>17</sup>
Ф-38	Фільтр-прес	1	Фільтр-прес СНУАО. Продуктивність до 5000 л/год. Матеріал – сталь SS304, SS316L. Фільтри регенерувального типу. Матеріал фільтру – антисептична фарба з вуглецевої сталі, SS304/316. <sup>18</sup>
3-40	Збірник об'ємом 500 л	1	Реактор 500 л GSH 500. Матеріал – нержавіюча сталь. Швидкість перемішування мішалки – 0-1000 об/хв. Робоча температура від – 135 до + 350 °С. <sup>7</sup>
С-44	Розпилювальна сушарка	1	Розпилююча сушарка CSD-150L. Продуктивність – 150 л/год. Матеріал – нержавіюча сталь SS304/316. <sup>19</sup>

Примітка: 1 - <https://ventfilter.kiev.ua/goods/filtr-vozdushniy-voloknistiy-fvv/>, 2 - <https://ventfilter.kiev.ua/goods/filtr-vozdushniy-karmanniy-fvk/>, 3 - <https://ventfilter.kiev.ua/goods/filtr-tonkoy-ochistki-vozduha-ftov-hepa-hepa/>, 4 - [https://opeks.ua/ua/plastinchastij-teploobminnik-thermaks-rta-gc-16/?utm\\_source=google&utm\\_medium=ua&device=c&utm\\_campaign=performance&gclid=CjwKCAjwyqWk BhBMEiwAp2yUFlrrYiec6b-T6H1OQkVBIILXfoN3F5M2ORQVfmffz4WcnCEh3iXDRoCxlkQAvD BwE](https://opeks.ua/ua/plastinchastij-teploobminnik-thermaks-rta-gc-16/?utm_source=google&utm_medium=ua&device=c&utm_campaign=performance&gclid=CjwKCAjwyqWk BhBMEiwAp2yUFlrrYiec6b-T6H1OQkVBIILXfoN3F5M2ORQVfmffz4WcnCEh3iXDRoCxlkQAvD BwE), 5 - [https://tbpool.com.ua/p/filtr-hayward-progrid-de4820-22-m3-ch-d660/?utm\\_source=google&utm\\_medium=cpc&utm\\_campaign=Google Shopping&utm\\_content=5265640873 62&utm\\_term= &gclid=CjwKCAjw-b-kBhB-EiwA4fvKrDQedpq439Mumh0pKfmmgQiUq7ZDASgLYlpvdVLq7tmF wJpoXMTuRoCAxMQAvD BwE](https://tbpool.com.ua/p/filtr-hayward-progrid-de4820-22-m3-ch-d660/?utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=Google Shopping&utm_content=5265640873 62&utm_term= &gclid=CjwKCAjw-b-kBhB-EiwA4fvKrDQedpq439Mumh0pKfmmgQiUq7ZDASgLYlpvdVLq7tmF wJpoXMTuRoCAxMQAvD BwE), 6 - <https://yldwater.en.made-in-china.com/product/xMameLPYqCAo/China-High-Flow-Activated-Carbon-Filter-System-of-Industrial-Water-Treatment.html>, 7 - [https://www.alibaba.com/product-detail/WHGCM-New-Hot-5000L-Industrial-Scale\\_1600792548494.html?s=p](https://www.alibaba.com/product-detail/WHGCM-New-Hot-5000L-Industrial-Scale_1600792548494.html?s=p), 8- <https://artmash.uaprom.net/ua/p1266899555-vesovoj-doзатор-dlya.html>, 9 - <https://geyser.com.ua/ru/nasos-tsentrobezhnyy-m-400b-15-kvt-saer/>, 10 - <https://osmosfilter.com.ua/ua/p1170952660-promyshlennaya-sistema-obratnogo.html>, 11 - <https://agroteh.com.ua/ua/p370228267-doзатор-vody-zhidkostej.html>, 12 - [https://www.alibaba.com/product-detail/High-pressure-jacketed-stainless-steel-reactor\\_1600481496986.html](https://www.alibaba.com/product-detail/High-pressure-jacketed-stainless-steel-reactor_1600481496986.html), 13 - <https://aquapolis.ua/ua/nasos-aquaviva-lx-seq750-380v-100-m3-ch-7-5hp.html?gclid=CjwKCAjw-b-kBhB-EiwA4fvKrBbCs7BSsl8dhSbCAjRZjXF6QJ0iAFGtZT00gLYAc4BJpirYKIEO8RoCXDAQAvD BwE>, 14 - [https://www.alibaba.com/product-detail/continuous-flow-centrifuge-\\_60021532084.html](https://www.alibaba.com/product-detail/continuous-flow-centrifuge-_60021532084.html), 15 - [https://www.debem.com.ua/nasos/peristalticheskie\\_nasosy/mp-11/](https://www.debem.com.ua/nasos/peristalticheskie_nasosy/mp-11/), 16 - <https://www.macrolab.com.ua/catalog/microfluidics/pilot-microfluidics/M815>, 17 - [https://bts.net.ua/eng/membrane\\_filter/membrane\\_system/ustanovka-s-keramicheskoy-membranoy-mikrofiltracii-dlya-proizvodstva-belogo-vina/](https://bts.net.ua/eng/membrane_filter/membrane_system/ustanovka-s-keramicheskoy-membranoy-mikrofiltracii-dlya-proizvodstva-belogo-vina/), 18 - [https://www.alibaba.com/product-detail/China-automatic-grech-pond-bio-press\\_1600530045804.html](https://www.alibaba.com/product-detail/China-automatic-grech-pond-bio-press_1600530045804.html), 19 - [https://www.bio-equip.cn/en/show\\_l equip.asp?equipid=127994](https://www.bio-equip.cn/en/show_l equip.asp?equipid=127994)

## РОЗДІЛ 7

### ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНОГО ВИДІЛЕННЯ І ОЧИЩЕННЯ ВІТАМІНУ В9 ДЛЯ ІН'ЄКЦІЙНОГО ГІДРОГЕЛЕВОГО ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ

Виробництво вітаміну В9 вимагає ряд допоміжних робіт, до яких відноситься підготовка повітря для розпилувальної сушарки, підготовка води знесоленої, приготування 0,1М фосфатного буферу, 30-% розчину гідрату натрію та 30-% розчину сірчаної кислоти. Після цих операцій розпочинається технологічний процес.

*ДР 1. Підготовка повітря для розпилувальної сушарки*

*ДР 1.1. Забір атмосферного повітря*

Атмосферне повітря забирають через повітрязабірник на висоті 10 м, де концентрація пилових часток і мікроорганізмів є мінімальною.

*ДР 1.2. Груба очистка повітря*

Дану операцію виконують з метою уникнення потрапляння бруду до готового порошку, оскільки той слугує основою для ін'єкцій. Очистку повітря від пилу та механічних часток здійснюють у Ф-2, з затримуючою здатністю 90%.

*ДР 1.3. Тонка очистка повітря*

Оскільки препарат дуже мати прямий контакт з рослинними культурами і навіть продуктами, даний етап очистки є необхідним для зменшення мікробного навантаження. Повітря пропускають через Ф-3, з затримуючою здатністю 95%.

*ДР 1.4. Надочищення повітря для сушіння*

Дана стадія є останньою перед нагріванням готового повітря. Попередня фільтрація здійснюється задля уникнення великого навантаження на цю стадію та подовження життя Ф-4, яки затримує до 99,995% бруду.

*ДР 1.5. Нагрівання повітря*

З метою запобігання утворення зайвого конденсату, охолоджене повітря у

					<b>НУХТ БТЕК 02.02.20 КР ПЗ</b>			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Тугарєва Т.І.				РОЗДІЛ 7 ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНОГО ВИДІЛЕННЯ І ОЧИЩЕННЯ ВІТАМІНУ В9 ДЛЯ ІН'ЄКЦІЙНОГО ГІДРОГЕЛЕВОГО ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.	Карлаш Ю.В.						88	133
Реценз.						<b>Кафедра БТМ</b>		
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							

теплообміннику Т-5 нагрівають до температури 140 °С.

## *ДР 2. Приготування води знесолоної*

### *ДР 2.1. Механічна фільтрація*

Очищення водопровідної води (3 м<sup>3</sup>) від механічних домішок здійснюється на піщаних фільтрах (Ф-6), які забезпечують видалення більших частинок розміром 5 мкм.

### *ДР 2.2. Глибинна фільтрація*

На цьому етапі вода очищається від механічних домішок розміром 1-3 мкм. Цей процес відбувається на вугільних фільтрах (Ф-7), які працюють паралельно або по черзі.

### *ДР 2.3. Пом'якшення води*

Пом'якшення води здійснюється методом відстоювання. Іони кальцію та магнію перетворюються на важкорозчинні сполуки шляхом додавання у воду розрахункових кількостей гідрату оксиду кальцію – 609 г, каустичної соди – 397,5 г, а на ваговому дозаторі (Д-8) - кристалічного карбонату натрію – 4,5 кг (З-9). Після трьох годин взаємодії накипоутворюючих сполук при 90 °С із зазначеними реагентами утворюються осади, які потім видаляють відстоюванням або фільтрацією. Для фільтрації використовується піщаний фільтр (Ф-11), до якого вода поступає за допомогою перистальтичного насоса (Н-10).

### *ДР 2.4. Зворотній осмос*

Потім отриману воду пропускають через напівпроникну мембрану під впливом зовнішнього тиску. Робочий надлишковий тиск розчину солі значно перевищує осмотичний тиск. Зворотньо осмотична установка зазвичай складається з насоса високого тиску, пермеатора (мембранної установки) і блоку управління, що підтримує оптимальний режим роботи (УФ-12). Тривалість – 3 години. Одержана вода подається до збірника (З-13).

## *ДР 3. Приготування додаткових розчинів для виділення та очищення*

### *ДР 3.1. Приготування 0,1 М фосфатного буферу*

Фосфатний буфер містить в собі 2 компоненти. Для запропонованого виробництва кінцеве рН має становити 6,1. Рецептатура 0,1 М буфера з таким значенням рН є наступною (г/л) [28]:

Натрію фосфат двоосновний гептагідрат – 4,852,

Одноосновний моногідрат фосфату натрію – 11,301

Згідно розділу 2, кількість цього буфера на виділення та очищення становить майже 2285 л.

Отже, в збірник (З-14) за допомогою вагового дозатора (Д-15) подається 11,09 кг натрію фосфат двоосновного гептагідрату та 25,82 кг одноосновного моногідрату фосфату натрію. Після перенесення солей в сам збірник, до компонентів, за допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-16) доливають 2248,1 л води знесоленої від ДР 2.4. Після цього, вмикається мішалка і вміст збірнику перемішується протягом 15 хв при 100 об/хв. Після гомогенізації компонентів, вимірюється рН за допомогою датчику контролю, яким обладнано збірник, яке має становити 6,1. Також, визначається концентрація розчину кондуктометричним методом аналізу, яка має становити 0,1 М.

### *ДР 3.2. Приготування 30-% гідроксиду натрію*

Згідно розділу 2, кількість цього розчину має становити 883,2 л. Пропонується приготувати 885 л.

До збірнику (З-17) за допомогою вагового дозатора (Д-18) зважують 265,5 кг гідроксиду натрію. Після цього, порошок подають до збірника. До нього, за допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-19) доливають 619,5 л води знесоленої від ДР 2.4. Після цього, вмикається мішалка і вміст збірнику перемішується протягом 15 хв при 100 об/хв. Концентрацію визначають кондуктометричним методом, вона має становити 30%.

### *ДР 3.3. Приготування 30-% сірчаної кислоти*

Кількість розчину, яка необхідна для цієї стадії становить 67,13 л. Пропонується приготувати 68 л для зручності.

До збірника (З-20) за допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-21) доливають 21,7 л води знесоленої від ДР 2.4. Після цього, за допомогою об'ємно-

вагового дозатора (Д-22) доливають 46,3 л 44-% концентрату сірчаної кислоти. Після цього, вмикається мішалка і вміст збірника перемішується протягом 15 хв при 100 об/хв. Концентрацію визначають кондуктометричним методом, вона має становити 30%.

#### *ТП 4. Зберігання культуральної рідини*

Культуральну рідину зберігають у З-23 при 4-8 °С. Щоб уникнути осідання біомаси, періодично вмикають мішалку на 100 об/хв протягом 15 хв.

#### *ТП 5. Центрифугування культуральної рідини*

Зі збірника (З-23) за допомогою відцентрового насосу (Н-24) до проточної центрифуги (Ц-25) подають культуральну рідину. Встановлюється швидкість ротора – 10000 об/хв. Тривалість відокремлення супенатанту від біомаси становить 6 годин. Супернатант передають на утилізацію, а біомасу вручну вивантажують до збірника (З-26).

#### *ТП 6. Ресуспендування біомаси*

До збірника (З-26) за допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-27) подають 26,24 л фосфатного буферу від ДР 3.1. також, на технічних вагах зважують 1,05 кг аскорбату натрію та вносять до збірника. Окремо, під витяжкою та в масці (оскільки реагент дуже смердить), відміряють 26,6 мл  $\beta$ -меркаптоетанолу за допомогою мірного циліндру на 50 мл і переливають у збірник. Після цього, вмикається мішалка і вміст збірника перемішується протягом 15 хв при 100 об/хв. Одержану суспензію подають на наступну стадію.

#### *ТП 7. Руйнування клітин гомогенізатором*

За допомогою перистальтичного насосу (Н-28) клітинна суспензія від ТП 6 подається до промислового гомогенізатору (Г-29). Гомогенізатор виставляється на максимальну виробничу потужність. Тривалість лізису становить 1 година. Після цього, гомогенізатор за допомогою влаштованого в ньому насосу подає клітинну зруйновану суспензію до збірника (З-30).

#### *ТП 8. Розведення та обробка клітинного екстракту у фосфатному буфері*

До збірника (З-30) за допомогою об'ємно-вагового дозатору (Д-31) подають 2258,7 л фосфатного буферу від ДР 3.1. Також, на технічних вагах

зважають 262 г панкреатину і також додають збірнику. Після цього, вмикається мішалка і вміст збірнику перемішується протягом 15 хв при 100 об/хв. Розведена зруйнована клітинна суспензія залишається у збірнику. Суміш витримують при 37 °С протягом 3 годин, шляхом подачі до сорочки глухої пари та холодної води.

#### *ТП 9. Кип'ятіння клітинного екстракту*

Температуру збірника (З-30) врегульовують за допомогою зміни подачі глухої пари та води охолодженої. Встановлюється температура кипіння – 105 °С. Тривалість процесу складає 30 хв.

#### *ТП 10. Фільтрування клітинного екстракту*

Прокип'ячений екстракт за допомогою відцентрованого насосу (Н-32) подають на ультрафільтраційну установку (УФ-33) з керамічними фільтрами з діаметром пор 0,45 кДа. Тривалість фільтрації становить 1 година. Після цього, клітинний залишок передають на утилізацію, керамічні фільтри на регенерацію, а одержаний розчин подається на наступну стадію.

#### *ТП 11. Обробка фільтрату лужним розчином*

До фільтрату, що було передано до збірнику (З-34), за допомогою об'ємного дозатора (Д-35) доливають 883,2 л гідроксиду натрію від ДР 3.2. Після цього, вмикається мішалка і вміст збірника перемішується протягом 15 хв при 100 об/хв. Суміш залишається в збірнику.

#### *ТП 12. Нагрівання та додавання активованого вугілля*

До сорочки збірника (З-34) подають глуху пару та охолоджену воду а встановлюють температуру розчину 60 °С. Після цього, на ваговому дозаторі (Д-36) зважують 122,7 кг активованого вугілля та подають до збірника. Суміш з вугіллям перемішують 15 хв при 100 об/хв. Суміш залишається в збірнику.

#### *ТП 13. Додавання гідросульфїту натрію з нагріванням*

Розчин в збірнику (З-34) нагрівають ще більше, до 100 °С. Після цього, на ваговому дозаторі (Д-36) зважують 30,95 кг гідросульфїту натрію. Суміш з вугіллям перемішують 1 годину при 100 об/хв. Суміш подається на фільтр-прес для відокремлення вугілля від фільтрату.

#### *ТП 14. Фільтрування розчину для відокремлення вугілля*

За допомогою відцентрового насосу (Н-37) суміш зі збірника (З-34) подається на фільтр-прес (Ф-38). Тривалість фільтрування – 1 година. Вугілля подається на утилізацію, а фільтрат передається на концентрування на наступну стадію.

*ТП 15. Концентрування розчину з фолатом*

До ультрафільтраційної установки (УФ-39) поступає фільтрат на концентрування. Ступінь концентрування становить 10 разів. Тривалість концентрування – 5 годин. Для цього використовуються керамічні фільтри з діаметром пор 0,45 мкм. Перемеат подають на утилізацію, а концентрат на подальшу стадію до збірника (З-40).

*ТП 16. Додавання сірчаної кислоти до концентрату*

До збірника (З-40) за допомогою об'ємно-вагового дозатору (Д-41) доливають 67,13 л сірчаної кислоти. Суміш перемішують 15 хв при 100 об/хв. Суміш залишають у збірнику.

*ТП 17. Додавання води до кислотного розчину для стабілізації*

За допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-42) до збірника (З-40) доливають 100 л води знесолено від ДР 2.4. Суміш перемішують 10 хв при 100 об/хв. Після цього, розчин витримують протягом 30 хв.

*ТП 18. Сушіння розчину фолату*

Після витримки, розчин зі збірника (З-40) за допомогою перистальтичного насосу (Н-43) подають до розпилюючої сушарки (С-44). До апарату подають підігріте повітря від ДР 1.5. Встановлюється температура 135 °С. Тривалість сушіння 3 години. Після цього, вологість порошку має становити не більше 5%, а його маса - 24,23 г. Порошок пересипають у скляну ємність на 50 мл та передають на склад на зберігання.

## РОЗДІЛ 8

### КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА ВІТАМІНУ В9 ДЛЯ ІН'ЄКЦІЙНОГО ГІДРОГЕЛЕВОГО ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ

#### 8.1. Визначення об'єму рідин

Об'єм рідини традиційно визначають за допомогою рівнемірів. Для фармацевтичного виробництва важливим є мінімізація контакту виробничих речовин для уникнення можливих небажаних реакцій. З цього виходить, що для забезпечення наших потреб виробництва варто передбачити безконтактний рівнемір безперервної дії, для постійного контролю.

LevelWave LR01 – це радарний рівнемір, який вимірює об'єм рідини безконтактно та на постійній основі. Рівнемір LR01 не схильний до впливу температури, густини і тиску вимірюваного середовища, не потребує додаткової калібрування забезпечує високонадійне вимір при низьких витратах на обслуговування [133].

Температура вимірюваного середовища від  $-50$  до  $+ 300$  ° С. Тиск середовища від  $-1$  до  $40$  бар. Точність вимірювання:  $\pm 10$  мм [133].



Рис.8.1. Рівнемір LevelWave LR01 [133]

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.20 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>РОЗДІЛ 8 КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА ВІТАМІНУ В9 ДЛЯ ІН'ЄКЦІЙНОГО ГІДРОГЕЛЕВОГО ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ</i>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розроб.</i>	<i>Тугарева Т.І.</i>						<i>94</i>	<i>133</i>
<i>Перевір.</i>	<i>Карлаш Ю.В.</i>					<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Реценз.</i>								
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>	<i>Стабніков В.П.</i>							

## 8.2. Визначення концентрації додаткових розчинів та жорсткості води

Кондуктометрия - електрохімічний метод аналізу, заснований на вимірюванні електричної провідності розчинів. Вона є неселективним кількісним методом аналізу [134].

Для кондуктометрії характерні широкий частотний діапазон зондуючого електромагнітного поля, робота в широкому інтервалі температур, великий діапазон вимірюваної вимірювання питомої електропровідності. Ці властивості дозволяють широко використовувати кондуктометричний метод в задачах контролю речовин, матеріалів і виробів [134].

При розчиненні в воді електроліту він дисоціює з утворенням іонів, отже, концентрація носіїв зарядів у воді збільшується, що призводить до зменшення її електричного опору і збільшення вимірювання питомої електропровідності. Звідси випливають два обмеження кондуктометричного методу - аналіз тільки розчинів електролітів і невибірковість методу. Наявність цих недоліків не впливають на ефективність визначення жорсткості води, концентрацій сірчаної кислоти, гідроксиду натрію та фосфатного буферу [134].

Для визначення усіх вищезгаданих можна використовувати кондуктометр МАРК-603. Апарат виконує вимірювання електропровідності, еквівалентного солевмісту і температури води і водних розчинів, в тому числі, деонізованої та надочищеної води [135].



Рис. 8.2. Кондуктометр МАРК-603 [135]

### 8.3. Визначення ваги фолієвої кислоти

Вагу можна визначити за допомогою електронних лабораторних ваг. З врахуванням кінцевої маси, для визначення ваги можна використовувати ваги ТВЕ-0,21-0,001-N-а. Дискретність – 0,001 г. Номінальна вага зважування – 210 г [136].



Рис. 1.3. Ваги нержавіючі для лабораторії ТВЕ-0,21-0,001-N-а [136]

### 8.4. Визначення вологості фолієвої кислоти

Визначення вологи визначають за допомогою аналізаторів вологості. Зазвичай висушування здійснюють при 105 °С. Пропонується для аналізу використати аналізатор вологості (вологомір) RADWAG MA 210/Y/P - 15-00002. Дискретність визначення вологості 0,001 %. Точність виставлення температури 1 °С [137].



### **8.5. Ідентифікація фолієвої кислоти**

Ідентифікацію вітаміну щонайменше варто проводити для того, щоб бути точно впевненим, що кінцевий виділений та очищений продукт – це бажана сполука.

До об'єму ін'єкції, еквівалентного приблизно 100 мг фолієвої кислоти, додають воду, щоб отримати приблизно 25 мл. Доводять соляною кислотою до рН 3,0, охолоджують до 5 °С, потім фільтрують та промивають осад фолієвої кислоти холодною водою, поки останнє промивання не покаже відсутність хлориду. Потім, осад промивають ацетоном і висушують при 80 °С протягом 1 години: УФ-спектр поглинання (280 нм) розчину фолієвої кислоти 1 на 100 000, отриманого таким чином у розчині гідроксиду натрію (1 на 250), демонструє максимуми та мінімуми на тих самих довжинах хвиль (200-400 нм), що й у аналогічний розчин фолієвої кислоти, вимірюваний одночасно. Співвідношення  $A_{256}/A_{365}$  становить від 2,80 до 3,00 [138].

Для цього визначення можна використовувати спектрофотометр Shimadzu UV-1280-104-00008. Спектрофотометр Shimadzu UV-1280, розроблений для кількісного аналізу, дозволяє проводити вимірювання в УФ і видимому діапазоні спектру від 190 до 1100 нм [139].



*Рис.8.5. Shimadzu UV-1280-104-00008 [139]*

## РОЗДІЛ 9

### ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОДЕРЖАННЯ ГІДРОГЕЛЕВИХ ІН'ЄКЦІЙ ДЛЯ ХІМІОТЕРАПІЇ

#### 9.1. Розрахунок річної потужності виробництва гідрогелевих ін'єкцій на основі фолієвої кислоти та кількості серій на рік

За рік одержується 2,16 кг фолієвої кислоти. Для виготовлення 10 мл гідрогелю використовується 10 мг фолієвої кислоти. Одна доза як раз складає 10 мл. Тоді, річна потужність складає:

$$\frac{2\,160\,000}{10} = 216\,000 \text{ доз}$$

За один цикл одержується 24,93 г очищеної фолієвої кислоти. Тоді, кількість доз за одну серію становить:

$$\frac{24\,930}{10} = 2\,493 \text{ дози}$$

Знаючи річну потужність, а також кількість доз, яка припадає на одну серію, визначаємо кількість серій на рік:

$$\frac{216\,000}{2\,473} \approx 87 \text{ серій}$$

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

##### 9.2.1. Вибір класу чистоти та вентиляційного повітря

Ін'єкційні препарати вводяться безпосередньо в організм людини, тому вони повинні бути надзвичайно чистими. Навіть невелика кількість домішок може призвести до серйозних ускладнень, таких як алергічні реакції, інфекції або навіть смерть [140].

Клас чистоти А є найвищим класом чистоти для ін'єкційних препаратів. Він вимагає, щоб препарат був повністю вільний від мікроорганізмів, включаючи бактерії, віруси та гриби. Крім того, препарат повинен бути вільним

Від					будь-яких			
					<i>НУХТ БТЕК 02.02. КР ПЗ</i>			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Тугарева Т.І.			РОЗДІЛ 9 ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОДЕРЖАННЯ ГІДРОГЕЛЕВИХ ІН'ЄКЦІЙ ДЛЯ ХІМІОТЕРАПІЇ	Лім.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Карлаш Ю.В.					98	133
Реценз.						<i>Кафедра БТМ</i>		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

інших домішок, які можуть бути шкідливими для людини [140].

Впровадження класу чистоти А для ін'єкційних препаратів є важливим кроком для підвищення безпеки лікування. Це допоможе захистити пацієнтів від небезпечних ускладнень, пов'язаних з ін'єкційними препаратами [140].

Ось деякі конкретні переваги впровадження класу чистоти А для ін'єкційних препаратів [140]:

- Зниження ризику алергічних реакцій. Домішки в ін'єкційних препаратах можуть викликати алергічні реакції у деяких людей. Клас чистоти А допомагає зменшити ризик таких реакцій.
- Зниження ризику інфекцій. Бактерії, віруси та гриби можуть бути присутніми в ін'єкційних препаратах. Клас чистоти А допомагає запобігти інфікуванню пацієнтів.
- Зниження ризику інших ускладнень. Деякі домішки в ін'єкційних препаратах можуть викликати інші ускладнення, такі як запалення або утворення тромбів. Клас чистоти А допомагає зменшити ризик таких ускладнень.

Впровадження класу чистоти А є складним завданням. Воно вимагає значних інвестицій у технологію виробництва та контролю якості. Однак це завдання є важливим для підвищення безпеки лікування [140].

В Україні впровадження класу чистоти А для ін'єкційних препаратів передбачено Законом України "Про лікарські засоби". Цей закон вимагає, щоб всі ін'єкційні препарати, які виробляються або імпортуються в Україну, виготовляли в класі чистоти А [140].

Клас чистоти А визначається за кількістю частинок в одиниці об'єму повітря. У класі чистоти А кількість частинок розміром більше 0,5 мкм не повинна перевищувати 100 частинок на кубічний метр повітря [140, 141].

- Для забезпечення класу чистоти А в виробничих приміщеннях використовуються спеціальні заходи, такі як:

- Вентиляція. Повітря в виробничих приміщеннях класу чистоти А постійно фільтрується за допомогою вискоєфективних фільтрів типу HEPA.
- Контроль доступу. До виробничих приміщень класу чистоти А допускаються тільки співробітники, які пройшли спеціальну підготовку.
- Використання чистих матеріалів. У виробничих приміщеннях класу чистоти А використовуються тільки чисті матеріали, які не містять домішок.

Виробництво ін'єкційних препаратів класу чистоти А є складним і дорогим процесом. Однак це необхідно для забезпечення безпеки пацієнтів.

Очищення повітря в приміщеннях класу А є важливим завданням, оскільки ці приміщення призначені для виробництва стерильного продукту або проведення стерильних операцій [140, 141].

Очищення повітря в цих приміщеннях проходить у три етапи [140, 141]:

- Фільтри грубої очистки. Перший ступінь відділяє забруднення, що містяться в зовнішньому (атмосферному) повітрі. Для цього використовуються фільтри грубої очистки, які затримують частинки розміром понад 5 мкм.
- Фільтри тонкої очистки. Другий ступінь забезпечує чистоту приточувань повітроводів від забруднення. Для цього використовуються фільтри тонкої очистки, які затримують частинки розміром від 1 до 3 мкм.
- HEPA фільтр. Третій ступінь забезпечує чистоту повітря, що поступає безпосередньо в приміщення. Для цього використовуються HEPA-фільтри, які затримують до 99,97% частинок розміром до 0,3 мкм.

Використовується однонаправлений потік повітря. Це досягається установкою фільтрів HEPA/ULPA по всій площі стелі і фальшпідлоги (підлога з

перфорацією). Повітря рухається вертикально від стелі до підлоги, видаляється через перфорацію у витяжну камеру під підлогою. Потім рециркуляційне повітря по периферійних рециркуляційних трубопроводах знову подається в приміщення [140, 141].

Для зменшення впливу меблів та устаткування на чистоту приміщення необхідно розміщати їх так, щоб не утворювалися застійні зони з нагромадженням пилу. Таке очищення повітря забезпечує високий рівень чистоти в приміщеннях класу А, необхідний для виробництва стерильного продукту або проведення стерильних операцій [140, 141].

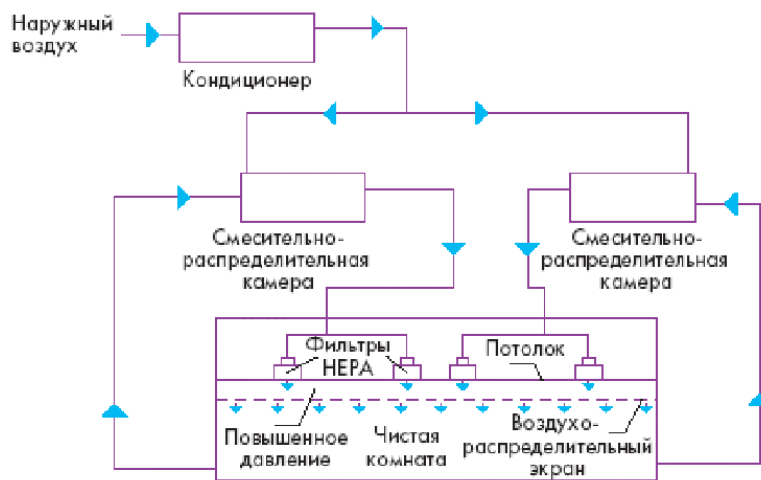
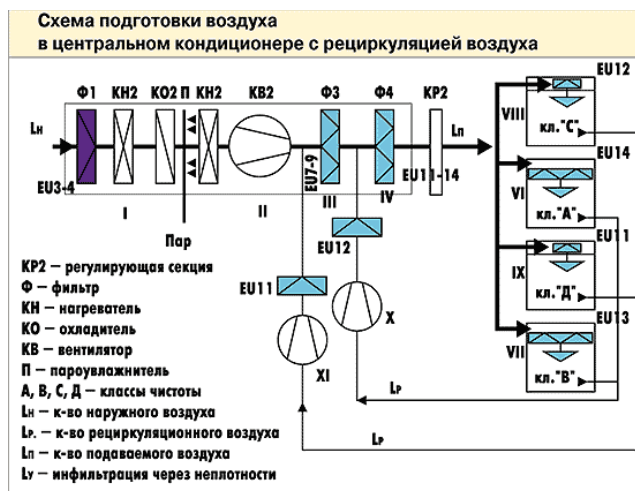


Рис.9.1. Приклад схеми проектування чистого приміщення з вентиляцією класу чистоти А [141]

Для фармацевтичної промисловості запропонована узагальнена схема підготовки повітря для приміщень класів А,В,С,Д (рис.9.2) [141].



*Рис.9.2. Загальна схема підготовки вентиляційного повітря для приміщень класів А,В,С,Д [141]*

Тож, при підготовці вентиляційного повітря, будемо спиратися на загальні схеми та положення, які передбачають використання 3 фільтрів, грубої, тонкої та надтонкої очистки. Останній фільтр обов'язково має бути типу HEPA з класом чистоти H14.

### **9.2.2. Підготовка персоналу**

Підготовка персоналу до роботи в класі чистоти А є важливою частиною забезпечення безпеки пацієнтів. Персонал, який працює в класі чистоти А, повинен мати глибокі знання про технологію виробництва, контроль якості та стерильності, а також навички, необхідні для роботи в чистому середовищі [141].

Підготовка персоналу до роботи в класі чистоти А зазвичай включає в себе наступні етапи [141]:

- **Освіта.** Персонал повинен мати освіту, яка відповідає вимогам посади, на яку він претендує. Для роботи в класі чистоти А необхідна базова освіта в галузі фармації, біологічних наук або інженерії.
- **Практична підготовка.** Персонал повинен пройти практичну підготовку під керівництвом досвідченого фахівця. Практична підготовка включає в себе навчання основам технології виробництва, контролю якості та стерильності. Персонал повинен навчитися, як правильно одягати чистий одяг, як працювати в чистому середовищі та як уникати забруднення.
- **Оцінка.** Персонал повинен пройти оцінку, щоб перевірити його знання та навички. Оцінка може включати в себе письмовий тест, практичне завдання або інтерв'ю.

Підготовка персоналу до роботи в класі чистоти А є постійною. Персонал повинен регулярно проходити навчання, щоб відповідати новим стандартам та технологіям [141].

Ось деякі конкретні теми, які повинні бути охоплені в програмі підготовки персоналу для роботи в класі чистоти А [141]:

- Технологія виробництва ін'єкційних препаратів. Це включає в себе знання про різні методи виробництва, такі як асептична технологія.
- Контроль якості ін'єкційних препаратів. Це включає в себе знання про різні методи контролю якості, такі як мікробіологічний аналіз, фізичний аналіз та хімічний аналіз.
- Стерильність. Це включає в себе знання про принципи стерилізації та методи забезпечення стерильності.
- Безпека в чистому середовищі. Це включає в себе знання про ризики, пов'язані з роботою в чистому середовищі, такі як забруднення та алергічні реакції.

Підготовка персоналу до роботи в класі чистоти А є важливою частиною забезпечення якості та безпеки ін'єкційних препаратів.

Вимоги до персоналу в класі чистоти А є суворими. Це пов'язано з тим, що клас чистоти А є найвищим класом чистоти для ін'єкційних препаратів. Він вимагає, щоб препарат був повністю вільний від мікроорганізмів, включаючи бактерії, віруси та гриби [141].

До персоналу в класі чистоти А пред'являються такі вимоги [141]:

- Здоров'я. Персонал повинен бути здоровим і не мати інфекційних захворювань.
- Гігієна. Персонал повинен дотримуватися строгих правил гігієни, включаючи щоденний душ, чистий одяг і регулярне миття рук.
- Одяг. Персонал повинен носити спеціальний чистий одяг, який забезпечує захист препарату від забруднення.
- Поводження. Персонал повинен дотримуватися строгих правил поведінки в чистому середовищі, щоб уникнути забруднення.

Ось деякі конкретні правила поведінки в класі чистоти А [141]:

- Персонал повинен говорити тихо, щоб не створювати повітряних потоків.
- Персонал повинен уникати рухів, які можуть спричинити забруднення, таких як розмахування руками або потирання обличчя.

- Персонал повинен одягатися і роздягатися в спеціально призначених для цього місцях.
- Персонал повинен регулярно мити руки з милом і водою.

Персонал, який не відповідає цим вимогам, може бути відсторонений від роботи в класі чистоти А.

### **9.2.3. Вибір дезінфікуючих засобів**

Дезинфекційні методи для фармацевтичного виробництва має одну велику класифікацію [142]:

- Хімічні дезінфікуючі засоби. Ці засоби містять хімічні речовини, які мають бактерицидну, фунгіцидну та віруліцидну дію. До них відносяться:
  - Спиртовмісні. Алкоголі, такі як етанол і ізопропіловий спирт, є ефективними проти широкого спектра мікроорганізмів. Вони є швидкодіючими та мають низьку токсичність.
  - Хлоровмісні засоби. Хлоровмісні засоби, такі як хлорамін і гіпохлорит натрію, є ефективними проти широкого спектра мікроорганізмів, включаючи віруси. Вони є недорогими та доступними.
  - Йодвмісні засоби. Йодовмісні засоби, такі як йодополій, є ефективними проти широкого спектра мікроорганізмів, включаючи віруси. Вони є ефективними проти мікроорганізмів, які є стійкими до інших дезінфікуючих засобів.
  - Альдегіди. Альдегіди, такі як формальдегід і глутаральдегід, є ефективними проти широкого спектра мікроорганізмів, включаючи віруси. Вони є ефективними проти мікроорганізмів, та нерідко використовуються в засобах для миття.
  - Фосфорорганічні сполуки. Фосфорорганічні сполуки, такі як гексахлорофенол і дихлорбензиловий спирт, є ефективними проти широкого спектра мікроорганізмів, включаючи віруси. Вони є ефективними проти мікроорганізмів, та використовуються для миття та дезінфекції поверхонь та обладнання.

- Пероксиди. Пероксиди, такі як пероксид водню і пероксимоносульфат натрію, є ефективними проти широкого спектра мікроорганізмів, включаючи віруси. Вони є ефективними проти мікроорганізмів, а також є доволі дешевими.
- Фізичні дезінфікуючі засоби. Ці засоби використовують фізичні фактори для знищення мікроорганізмів. До них відносяться:
  - Тепло. Тепло є ефективним методом дезінфекції. Воно може використовуватися для дезінфекції поверхонь, інструментів та обладнання.
  - Промивка водою. Промивка водою може бути ефективним методом дезінфекції для видалення мікроорганізмів з поверхонь.
  - Ультрафіолетове випромінювання. Ультрафіолетове випромінювання є ефективним методом дезінфекції для знищення мікроорганізмів. Воно може використовуватися для дезінфекції поверхонь, повітря та води.
  - Озон. Озон є ефективним методом дезінфекції для знищення мікроорганізмів. Він може використовуватися для дезінфекції поверхонь, повітря та води.

Вибір дезінфікуючого засобу залежить від виду мікроорганізмів, які необхідно знищити, типу поверхні або об'єкта, який необхідно дезінфікувати, а також умов дезінфекції [142].

Для фармацевтичного виробництва найчастіше використовують хімічні дезінфікуючі засоби. Вони є ефективними проти широкого спектра мікроорганізмів, включаючи віруси. Крім того, вони є доступними та простими у використанні [142].

При виборі хімічного дезінфікуючого засобу для фармацевтичного виробництва необхідно враховувати такі фактори [142]:

- Діюча речовина. Діюча речовина дезінфікуючого засобу визначає його ефективність проти різних видів мікроорганізмів.

- Концентрація. Концентрація дезінфікуючого засобу впливає на його ефективність.
- Час контакту. Час контакту дезінфікуючого засобу з мікроорганізмами також впливає на його ефективність.
- Умови дезінфекції. Умови дезінфекції, такі як температура і рН, можуть впливати на ефективність дезінфікуючого засобу.

Важливо використовувати дезінфікуючі засоби відповідно до інструкції виробника. Це допоможе забезпечити ефективність дезінфекції та безпеку персоналу та пацієнтів [142].

У фармацевтичному виробництві ін'єкцій найчастіше використовують такі 3 групи хімічних дезінфікуючих засобів [142]:

- Алкоголі, такі як етанол і ізопропіловий спирт, є ефективними проти широкого спектра мікроорганізмів, включаючи віруси. Вони є швидкодіючими та мають низьку токсичність. Алкоголі часто використовують для дезінфекції поверхонь, інструментів та обладнання в фармацевтичному виробництві ін'єкцій.
- Альдегіди, такі як формальдегід і глутаральдегід, є ефективними проти широкого спектра мікроорганізмів, включаючи віруси. Вони є ефективними проти мікроорганізмів, які є стійкими до інших дезінфікуючих засобів. Альдегіди часто використовують для дезінфекції поверхонь, інструментів та обладнання, які контактують з ін'єкційними препаратами.
- Йодвмісні засоби, такі як йодополій, є ефективними проти широкого спектра мікроорганізмів, включаючи віруси. Вони є ефективними проти мікроорганізмів, які є стійкими до інших дезінфікуючих засобів.

Спираючись на вище наведену інформацію, а також з врахуванням того, що виробництво працюватиме майже весь рік, треба обрати 3 різні за діючою речовиною препарати, щоб зменшити ризик утворення стійкості біологічних контамінуючих агентів навколишнього середовища, а також добитися ефективної

обробки поверхонь та обладнання для одержання якісного та безпечного лікарського засобу.

Порівняння показано в табл.9.1.

## Порівняння дезінфікуючих засобів для фармацевтичного виробництва ін'єкційного препарату

Тип препарату	Назва	Вміст діючої речовини	Ціна за 1 л концентрату, грн	Концентрація робочого розчину, %	Ціна за 1 л робочого розчину, грн	Об'єми, в яких випускається препарат, л	Джерело
Алкоголі	Велідез	2-пропанол - 10,0 ±1,0%	420	0,1	0,042	1; 5	[143]
	CD-AMIN	етанол - 10,0%	595	0,01	0,006	1; 5	[144]
	Gigasept® Instru AF	Феноксипропаноли - 35,0%	410	0,1	0,041	0,1; 1; 2; 5	[145]
Альдегіди	ЛАСЕПТ Форте	глутаровий альдегід – 11,0%	288	0,25	0,072	0,5; 1; 5; 10; 20	[146]
	Септодор Форте	глутаровий альдегід - 12,5%	1283	0,05	0,064	1	[147]
	Лізоформін 3000	глутаровий альдегід - 9,5 %	560	0,25	0,14	0,02; 1	[148]
Йодовмісні	Дезйод	Йод-повідон – 21%	492	0,5	0,246	1; 5; 10; 20; 50;	[149]
	Санойод	Йод-повідон – 0,8%	440	5	2,2	1; 5	[150]
	Йодель	Йод-повідон – 2 %	327,5	5	1,64	1; 5	[151]

Тож, маємо обрати 3 дезінфікуючі засоби, по одному з кожної групи, для запропонованого виробництва. Щодо спиртовмісних, логічно обрати CD-AMIN, який є найдешевшим серед усіх зазначених препаратів цієї групи, а також випускається у каністрах 5 л. Щодо альдегідних, хоча найдешевшим препаратом є Септодор Форте, але він випускається в об'ємі по 1 л, що не дуже підходить для великої промисловості. Тому, пропонується обрати трошки дорожчий препарат - ЛАСЕПТ Форте, але який випускається в каністрах по 5, 10 та 20 літрів, що є вигідним для використання на великих площах. З йодовмісних препаратів пропонується обрати Дезйод через його дешевизну, а також великооб'ємні випуски самого препарату.

Тож, за фінальним порівнянням було обрано CD-AMIN, ЛАСЕПТ Форте, Дезйод.

### **9.3. Обґрунтування вибору підготовки первинної упаковки**

Оскільки для виробництва не передбачається готової первинної упаковки, а використовується технологія BFS, яка передбачає формування пластикових флаконів безпосередньо в системі, підготовки первинної упаковки не відбувається. Технологія BFS передбачає утворення стерильної упаковки, оскільки пластик спочатку проходить екструдер, який передбачається в більшості апаратах BFS, тим самим знезаражуючи поверхню пластику під високою температурою, а також використовує підготовлене повітря для класу чистоти А для видування та формування флаконів. Через це, підготовку первинної упаковки не передбачається.

### **9.4. Обґрунтування вибору підготовки води**

Для запропонованого виробництва необхідно передбачити найчистішу за ступенем воду, а саме воду для ін'єкцій. Ця вода буде використовуватись для миття обладнання, а також для виробництва самого лікарського засобу [140].

На рис.8.3. показано узагальнену схему одержання води різних ступенів чистоти. Спочатку воду перевіряють на її жорсткість, після чого її пом'якшують шляхом додавання окису кальцію, їдкою натрію та кристалічного карбонату

натрію. Після чого, воду фільтрують крізь піщаний фільтр для видалення нерозчинних осадів [140].



Рис.9.3. Загальна схема одержання різних типів води [140]

Після того, як воду пом'якшують, її знесолюються. Для цього в промислових умовах використовують установки зворотнього осмосу. Важливим показником роботи установки зворотнього осмосу є коефіцієнт обороту, тобто частка отриманого пермеату і концентрату. На оптимальних установках вихід пермеату складає близько 75% від вихідної води, утворений концентрат складає 25% [140].

Після цього, одержують воду очищену шляхом дистиляції. Після дистиляції, воду очищену проганяють крізь ультрафільтраційну установку з діаметром форм фільтру 0,22 мкм. Таким чином одержується вода для ін'єкцій. Тож, для запропонованого виробництва будемо використовувати наведену схему очистки [140].

### 9.5. Вибір технологічних стадій та операцій, обладнання

Початковою технологічною стадією є приготування самого гідрогелю. За серію використовується 24,93 г фолієвої кислоти. Відомо, що на 10 мг фолієвої кислоти припадає 1 мл 0,1 М натрій фосфатного буферу при рН 7,0 [152]. Тоді, на серію потрібно приготувати:

$$\frac{24\,930}{10} \times 10 = 24\,930 \text{ мл} \approx 25 \text{ л буферу}$$

На одну дозу (10 мг фолату) додають 16 мг глюконо-d-лактону [152]. Тоді, кількість цього компоненту, яку потрібно додати становить:

$$\frac{24\,930}{10} \times 16 = 39\,888 \text{ мг} \approx 39,9 \text{ г}$$

Тож, для виробництва самого лікарського засобу потрібно передбачити реактор-змішувач об'ємом 30 л. Для цих потреб підійде реактор об'ємом 30 л SS-30L. Апарат виготовлено зі сталі нержавіючої SS316. Оснащений перемішувачем та подвійною сорочкою, що дуже треба для зазначеного виробництва, оскільки обладнання мусить бути стерильним, а також можливість підтримки температури в 30 °С для гідролізу [152]. Швидкість обертів мішалки – 0-600 об/хв [153].



*Рис.9.4.* Реактор SS-30L [153]

За технологією одержання гідрогелю, фолієву кислоту спочатку додають до буферу, перемішують до повного розчинення, а після цього додають глюконо-d-лактон, витримують 3 години при температурі 30 °С щоб отримати гідрогель [152]. Гідрогель неможливо піддати термічній стерилізації, оскільки він одразу розпадається, та не можна простерилізувати холодною фільтрацією, оскільки він втратить всі свої властивості та навряд чи профільтрується. Тому, пропонується простерилізувати сухі порошки фолієвої кислоти, доксорубіцину та глюконо-d-лактону при 180 °С протягом 30 хв (як вказано за технологією одержання

стерильних порошків для ін'єкцій). Стерилізація відбувається в сухожарі. Тому, треба підібрати сухожар невеликого розміру для цієї операції [154].

Для цього можна використати настільний сухожар об'ємом 5 л, що обладнаний 3 полицками WX-12C. Об'єм внутрішньої камери – 5 л. Максимальна робоча температура – 200 °С. Оптимальним є використання саме 3 полицок через те, що порошки не можна змішувати, інакше гідрогель не утвориться. Через це, порошки будуть сушитись на двох окремих полицках [155].



*Рис.9.5.* Сухожар WX-12C [155]

Наступною стадією, після приготування лікарського засобу, є формування, наповнення та запаювання ампул за технологією BFS. Отже, треба підібрати апарат, який задовольнить потреби виробництва. Для цього може підійти машина серії PBM. Продуктивність апарату – 5400 ампул/год. Діаметр ампули об'ємом 10 мл – 12,5 мм. Апарат обладнаний внутрішнім екструдером, а тому використовує гранули для утворення флаконів [156].



*Рис.9.6. Апарат BFS серії PBM [156]*

Після того, як одержимо флакони, їх потрібно інспектувати на герметичність та наявність сторонніх включень. Для цього можна використати автомат SV. Його продуктивність – 100 флаконів/хв. Спочатку автомат перевіряє ампули на герметичність під тиском 0,6 МПа (нагнітач повітря передбачено в конструкції апарату) [157].



*Рис.9.7. Інспекційна машина для ампул SV [157]*

Після інспекції, ампули направляються на етикування. Проте, варто враховувати, що препарат випускатиметься по 5 з'єднаних ампул об'ємом 10 мл. Для цього, можна використати спеціальну маркувальну машину для системи BFS, а саме від компанії Inel. Продуктивність машини – 150 ампул/хв [158].



*Рис.9.8. Маркувальна машина від компанії Inel [158]*

Після маркування, ампули вкладають в коробку. Оскільки вони пластикові та з'єднані один між одним, додаткового вкладиша не використовується. Для заданої цілі підійде автоматична лінія wd-zhj06. Продуктивність – 10 коробок/хв [159].



*Рис.9.9. Пакувальна автоматична лінія wd-zhj06 [159]*

Через велику кількість коробок лікарського препарату потрібно передбачити машину групового пакування, для полегшення технологічного процесу. Для цього можна використати від фірми KEGEL. Продуктивність – до 5 групових коробок/хв [160].



*Рис.9.10.* Машина групового пакування від фірми KEGEL [160]

## РОЗДІЛ 10

### МАТБАЛАНС НА СЕРІЮ ГІДРОГЕЛЕВОГО ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ НА ОСНОВІ ФОЛІЄВОЇ КИСЛОТИ

Потрібно врахувати кожен етап втрат, яка впливає на кінцеву кількість препарату. Перший етап, на якому будуть відбуватись втрати – це зважування фолату, доксорубіцину та глюконо-d-лактону. З врахуванням точності ваг та людського фактору, кількість втрат на цій стадії складає близько 0,5%. Також, втрати будуть спостерігатись під час перекачування гідрогелю до стадії формування, наповнення та запаювання ампул. На цьому етапі передбачається також близько 0,5% втрат. Під час наповнення ампул також можуть виникати втрати, оскільки до ампул потрапляє гідрогель, а не рідкий розчин, тому приблизна кількість втрат на цій стадії становитиме 1%. Останньою стадією, на якій можуть відбуватись втрати – це стадія інспекції ампул, оскільки не всі ампули можуть пройти контроль на герметизацію та сторонніх включень. Тому, на цій стадії будемо вважати кількість втрат до 1 %. Знаючи ці дані, можемо скласти матеріальний баланс.

*Таблиця 10.1.*

#### Матеріальний баланс на виготовлення гідрогелевих ін'єкцій на основі фолієвої кислоти

Надійшло		Використано	
Назва сировини, матеріалів та напівпродуктів	Кількість,г	Назва сировини, матеріалів та напівпродуктів	Кількість ,г
1	2	3	4
<b>Зважування сировини, г</b>			
Фолієва кислота	24,93	Фолієва кислота	24,8
Глюконо-d-лактон	39,9	Глюконо-d-лактон	39,7
Доксорубіцин	1,2	Доксорубіцин	1,19
<b>Всього:</b>	<b>66,03</b>	<b>Втрати (0,5%)</b>	<b>1,34</b>
		<b>Всього:</b>	<b>66,03</b>

<b>НУХТ БТЕК 02.02.20 КР ПЗ</b>				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.	Тугарєва Т.І.			
Перевір.	Карлаш Ю.В.			
Реценз.				
Н. Контр.				
Затверд.	Стабніков В.П.			
РОЗДІЛ 10 МАТБАЛАНС НА СЕРІЮ ГІДРОГЕЛЕВОГО ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ НА ОСНОВІ ФОЛІЄВОЇ КИСЛОТИ			Лім.	Арк.
			114	133
			<b>Кафедра БТМ</b>	

<b>Змішування компонентів</b>			
Фолієва кислота	24,8 г	Лікарський засіб	25,1 л
Глюкозо-d-лактон	39,7 г		
Доксорубіцин	11,9 г		
Натрій фосфатний буфер	25 л		
<b>Всього:</b>	<b>25,1 л</b>	<b><u>Втрати(0%)</u></b>	-
		<b>Всього:</b>	<b>25,6 л</b>
<b>Перекачування лікарського засобу</b>			
Лікарський засіб	25,1 л	Лікарський засіб	24,97 л
<b>Всього:</b>	<b>25,1 л</b>	<b><u>Втрати (0,5%)</u></b>	<b><u>0,13 л</u></b>
		<b>Всього:</b>	<b>25,1 л</b>
<b>Наповнення ампул</b>			
Лікарський засіб	24,97 л	Лікарський засіб	24,72
<b>Всього:</b>	<b>24,97 л</b>	<b><u>Втрати (1%):</u></b>	<b><u>0,25</u></b>
		<b>Всього:</b>	<b>24,97 л</b>
Ампули	2497 шт.	Ампули	2497 шт.
<b>Всього:</b>	<b>2497 шт.</b>	<b><u>Втрати (0%):</u></b>	-
		<b>Всього:</b>	<b>2497 шт.</b>
<b>Інспекція ампул</b>			
Ампули	2497 шт.	Ампули	2472 шт.
<b>Всього:</b>	<b>2497 шт.</b>	<b><u>Втрати (1%):</u></b>	<b><u>25 шт.</u></b>
		<b>Всього:</b>	<b>2497 шт.</b>

Сумарні втрати складають 3%.

**РОЗДІЛ 11**  
**СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ВИРОБНИЦВА**  
**ГІДРОГЕЛЕВИХ ІН'ЄКЦІЙ**

Специфікація апаратурного обладнання для одержання гідрогелевого лікарського засобу показано в табл.11.1

*Таблиця 11.1.*

**Специфікація обладнання виробництва гідрогелевого лікарського засобу**

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
ПЗ-1	Повітрязбірник	1	Обладнаний металевою сіткою для видалення механічних забруднень.
Ф-2	Фільтр грубої очистки	1	Фільтр повітряний волокнистий класу очистки G4. Матеріал фільтру – поліестер. Робоча температура від -40 до +70 ° С. не регенерується. <sup>1</sup>
В-3	Вентилятор повітря	1	Відцентровий вентилятор AYAS OBRS 200-2К-М. Продуктивність – до 800 м <sup>3</sup> /год. Частота обертання – 2800 об/хв. <sup>2</sup>
К-4	Калорифер	1	Повітряний електричний калорифер REN/AREN 200/3,0. Продуктивність – до 200 м <sup>3</sup> /год. Потужність – 3 кВт. Габарити: 480x200x280,7 мм. <sup>3</sup>
П-5	Парозволожувач	1	Парозволожувач МНДМ-6D. Потужність – 4,5 кВт. Габарити: 620x240x260 мм. <sup>4</sup>
Ф-6	Фільтр тонкого очищення	1	Фільтр коміркового типу тонкого очищення. Клас чистоти – F9. Оснащений оцинкованою рамкою. Кількість карманів – 8. Габарити: 592x490x600 мм. <sup>5</sup>
Ф-7	Фільтр надочищення	1	Панельний НЕПА фільтр. Клас очистки – Н14. Фільтрувальний матеріал – мікротонкі скляні волокна. Габарити: 610x610x78 мм. <sup>6</sup>
Д-8 Д-22	Дозатор для води	2	Дозатор для води і рідин. Встановлення дозування від 10 мл до 9999 л. Похибка дозування не більше 0,5%. Робочий тиск від 0,5 атм до 10 атм. <sup>7</sup>

<b>НУХТ БТЕК 02.02.20 КР ПЗ</b>				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.		Тугарева Т.І.		
Перевір.		Карлаш Ю.В.		
Реценз.				
Н. Контр.				
Затверд.		Стабніков В.П.		
РОЗДІЛ 11 СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ВИРОБНИЦВА ГІДРОГЕЛЕВИХ ІН'ЄКЦІЙ			Літ.	Арк.
				116
			Аркушів 133	
<b>Кафедра БТМ</b>				

3-9 3-13 3-16 3-19	Збірник для пом'якшення води Збірник для зберігання води	4	Реактор BLD0-11-380-7.5kw-1000L. Об'єм – 1000 л. Виготовлено зі сталі нержавіючої SS316. Містить мішалку та подвійну сорочку. Габарити: 2000x1980x1680 мм. <sup>8</sup>
H-10 H-14 H-17 H-20	Насос відцентровий	4	Насос відцентровий M-700B SAER. Продуктивність – 10 м <sup>3</sup> /год. Температура робочого розчину – -15 - +50°C. Робочий тиск – 6 бар. <sup>9</sup>
Ф-11	Фільтр піщаний	1	Піщаний фільтр мішкового типу Raifil BFH-1 2. Продуктивність – до 20 м <sup>3</sup> /год. Габарити: 860 x 320 x 320 мм. Робочий тиск – 10 атм. <sup>10</sup>
ЗО-12	Установка зворотнього осмосу	1	Установка зворотнього осмосу NN-RO4-1000. Продуктивність – 1 м <sup>3</sup> /год. Містить 4 мембрани. Станина – метал. <sup>11</sup>
Д-15	Дистиляційна установка	1	Дистиляційна установка LNDS-1001. Об'єм заповнення – 1 м <sup>3</sup> . Виконано зі сталі типу SS316L та червоної міді T2. <sup>12</sup>
УФ-18	Ультрафільтраційна установка	1	Ультрафільтраційна установка, оснащена керамічними фільтрами BTS-CMS-MF1. Діаметр фільтрів – 0,22 мкм. Продуктивність – до 16 м <sup>3</sup> /год. Виконано зі сталі типу SS316L. <sup>13</sup>
С-21	Сухожар	1	Сухожар WX-12С. Оснащений 3 полицками та піддонами. Максимальна робоча температура – 200 °С. <sup>14</sup>
3-23	Збірник для утворення гідрогелю	1	Реактор-змішувач SS-25L. Об'єм 25 л. Виконано зі сталі нержавіючої типу SS316L. Оснащений подвійною сорочкою та мішалкою. Швидкість мішалки – 0-600 об/хв. <sup>15</sup>
H-24	Насос перистальтичний	1	Перистальтичний насос PDP TEC100 100-00. Продуктивність – 10-100 л/год. Робочий тиск – 2 бар. Габарити: 230x138x186 мм. <sup>16</sup>
БФС-25	Система BFS	1	Система BFS серії PBM. Продуктивність до 5400 ампул/год. Оснащений екструдером. Використовує гранули для виробництва ампул. Габарити: 3580x2040x2850 мм. <sup>17</sup>
I-26	Інспекційна машина	1	Інспекційна машина для ампул SV. Продуктивність – 100 ампул/хв. Габарити: 1880 x 1580 x 1700 мм. <sup>18</sup>
M-27	Маркувальна машина	1	Маркувальна машина від компанії Inel. Продуктивність – 150 ампул/хв. Оснащений модулем друку та поклейки етикеток. <sup>19</sup>

Закінчення табл.11.1.

П-28	Пакувальний апарат	1	Пакувальна машина для ампул wd-zhj06. Продуктивність – до 10 коробок/хв. Габарити: 3188 x 1519 x 1645 мм. <sup>20</sup>
Г-29	Машина групового пакування	1	Машина групового пакування від фірми KEGEL. Продуктивність – до 5 групових коробок/хв. Габарити: 2100 x 1300 x 1900 мм. <sup>21</sup>

Примітка: 1 - <https://ventfilter.kiev.ua/goods/filtr-vozdushniy-voloknistiy-fvv/>, 2 - <https://olvent.ua/ayas-obrs-200-2k-m/>, 3 - <https://prom.ua/ua/p9754679-elektricheskij-kalorifer-aerostar.html?&primelead=MS44>, 4 - <https://7-vz.com/ua/category/kanalnyy-parouvlazhritel-mycond/>, 5 - <https://asfilter.com.ua/catalog/karmannye-filtry/karmanny-filtr-592kh490kh600-8-f9/>, 6 - <https://aff.in.ua/ua/p1194228229-610h610h78-h14-hepa.html>, 7 - <https://agro-teh.com.ua/ua/p370228267-doзатор-vody-zhidkostej.html>, 8 - [https://www.alibaba.com/product-detail/Jacketed-Reactor-reaction-1000L-Liquid-Stirring\\_1600319111290.html](https://www.alibaba.com/product-detail/Jacketed-Reactor-reaction-1000L-Liquid-Stirring_1600319111290.html), 9 - <https://termozona.com.ua/nasos-tsentrobezhnyi-m-700b-1.5kvt-saer-10-m3-ch-52-m/>, 10 - [https://aquapure.com.ua/filtr-meshochnogo-tipa-raifil-bfh-1-2/?gclid=CjwKCAiA-vOsBhAAEiwAIWR0TYkxBHphqNAWdJ83XbCzIeEn\\_o\\_AZ7CqDl4RxOoVZiqnFwn0AqeO7RoC-xkQAvD\\_BwE&utm\\_source=google&utm\\_medium=cpc&utm\\_campaign=g\\_20312642144&utm\\_term=&utm\\_content=5025\\_uk](https://aquapure.com.ua/filtr-meshochnogo-tipa-raifil-bfh-1-2/?gclid=CjwKCAiA-vOsBhAAEiwAIWR0TYkxBHphqNAWdJ83XbCzIeEn_o_AZ7CqDl4RxOoVZiqnFwn0AqeO7RoC-xkQAvD_BwE&utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=g_20312642144&utm_term=&utm_content=5025_uk), 11 - <https://hydro.in.ua/ua/p1156425121-ustanovka-obratnogo-osmosa.html>, 12 - <https://lenotank.en.made-in-china.com/product/GwdQDRlAhihb/China-1000-L-Home-Distilling-Distillery-Alcohol-Still-Distillation-Column-Alcohol.html>, 13 - [https://bts.net.ua/ua/membrane\\_filter/membrane\\_system/m-krof-ltrac-yna-ustanovka-na-keram-chnikh-membranakh-bts-cms-mf1/](https://bts.net.ua/ua/membrane_filter/membrane_system/m-krof-ltrac-yna-ustanovka-na-keram-chnikh-membranakh-bts-cms-mf1/), 14 - [https://limonad.ua/suhozharovoy-sterilizator-wx-12s-new-5000-ml-1000-vt.html?gclid=CjwKCAiA-vOsBhAAEiwAIWR0TV7Oge9w-eT40tt\\_19YW3nFDxHWjzUzXQN-GU4efTE5fYmRiAi0uUBoCHkAQAvD\\_BwE](https://limonad.ua/suhozharovoy-sterilizator-wx-12s-new-5000-ml-1000-vt.html?gclid=CjwKCAiA-vOsBhAAEiwAIWR0TV7Oge9w-eT40tt_19YW3nFDxHWjzUzXQN-GU4efTE5fYmRiAi0uUBoCHkAQAvD_BwE), 15 - <https://www.aliexpress.us/item/3256803876558089.html?gatewayAdapt=glo2usa4itemAdapt>, 16 - [https://prom-nasos.com.ua/ua/catalog/pumps-by-type/peristaltic\\_pumps/peristaltichniy-nasos-pdp-tec100-100-00-90-260v-santoprene/](https://prom-nasos.com.ua/ua/catalog/pumps-by-type/peristaltic_pumps/peristaltichniy-nasos-pdp-tec100-100-00-90-260v-santoprene/), 17 - <https://www.shinvaglobal.com/01-pbm-series-bfs-machine-product/>, 18 - <https://www.cmp-pharma.it/sv.html>, 19 - [https://inel.com/ru/b/ /4/43/bfs\\_blow\\_fill\\_seal\\_printing\\_machine/](https://inel.com/ru/b/ /4/43/bfs_blow_fill_seal_printing_machine/), 20 - [https://www.alibaba.com/product-detail/Automatic-Condom-Cartoning-Packing-Machine-Ampoule\\_62105491896.html](https://www.alibaba.com/product-detail/Automatic-Condom-Cartoning-Packing-Machine-Ampoule_62105491896.html), 21 - <https://kegelmachines.com/en/kegel-machines/145730-automatic-carton-packaging-machine-.html>

## РОЗДІЛ 12

### ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА ГІДРОГЕЛЕВИХ ІН'ЄКЦІЙ ДЛЯ ХІМІОТЕРАПІЇ

#### *ДР 1. Підготовка вентиляційного повітря*

##### *ДР 1.1. Забір атмосферного повітря*

Атмосферне повітря для потреб підприємства забирається з висоти 20 метрів за допомогою труби (ПЗ-1). Тиск повітря в трубі становить 0,01-0,03 атмосфери.

##### *ДР 1.2. Перший ступінь очищення повітря*

Повітря ззовні, яке забруднене пилом, вологою та мікроорганізмами, за допомогою фільтрів грубого очищення (Ф-2) очищається від великих частинок. Коефіцієнт проскоку твердих частинок становить не більше 10%. Потім повітря за допомогою вентилятора (В-3) подається на електрокалорифер (К-4). Там воно нагрівається або охолоджується, залежно від потреб. Якщо потрібно нагріти повітря, то теплообмінник в приточном каналі працює як конденсатор. Він віддає теплоту повітря, і воно нагрівається. Якщо потрібно охолодити повітря, то теплообмінник в приточном каналі працює як випарник. Він забирає теплоту у повітря, і воно охолоджується. Нагріте або охолоджене повітря надходить на парозволожувач (П-5). Там воно зволожується до ступеня  $W=60\%$ .

##### *ДР 1.3. Другий ступінь очищення повітря*

Після зволоження на парозволожувачі (П-5) повітря надходить на фільтр тонкого очищення (Ф-6). Це другий етап очищення повітря, який дозволяє видалити до 99,97% всіх часток розміром від 0,1 до 0,3 мікрона. Фільтр має велику активну фільтруючу поверхню, яка затримує частинки розміром до 0,1 мікрона. Через високу щільність фільтра повітря проходить з великою швидкістю (15-35 м/с). Тому система повинна мати велику площу поверхні,

що б забезпечити достатній потік повітря.					<i>НУХТ БТЕК 02.02.20 КР ПЗ</i>			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Тугарева Т.І.				РОЗДІЛ 12 ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА ГІДРОГЕЛЕВИХ ІН'ЄКЦІЙ ДЛЯ ХІМІОТЕРАПІЇ	Лім.	Арк.	Аркушів
Перевір.	Карлаш Ю.В.						119	133
Реценз.						<i>Кафедра БТМ</i>		
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							

#### *ДР 1.4. Третій ступінь очищення повітря*

Відповідно до апаратурної схеми, повітря подається до фільтра типу НЕРА у класі чистоти А (Ф-7). Фільтр затримує 99,9995% частинок розміром до 0,22 мікрона. Цей етап очищення є завершальним і дозволяє видалити з повітря навіть найдрібніші частинки, такі як пил, дим, бактерії та віруси.

#### *ДР 2. Одержання води для ін'єкцій*

Для забезпечення потреб виробництва треба одержати воду для ін'єкцій, для миття обладнання та для створення гідрогелю.

##### *ДР 2.1. Пом'якшення води*

Вода подається до збірника (З-9) за допомогою дозатора (Д-8). Дозатор регулює подачу води в збірник, забезпечуючи її постійний рівень. Вода в збірнику нагрівається до температури 100 °С. Кип'ятіння триває 1 годину. Під час кип'ятіння відбувається часткова нейтралізація солей жорсткості. Після кип'ятіння, не чекаючи охолодження, до води додають 102 г гідро оксиду кальцію та 66 г їдкою натрію та 25 г кристалічного карбонату натрію. Ці реагенти повністю нейтралізують солі жорсткості. Суміш реагентів і води перемішують протягом 30 хвилин. Це забезпечує рівномірне перемішування і розчинення реагентів. Після перемішування суміші вода подається на піщаний фільтр (Ф-11) за допомогою відцентрового насоса (Н-10). Піщаний фільтр затримує нерозчинні осадки, що утворилися в результаті розкладання солей жорсткості.

##### *ДР 2.2. Знесолення води*

Профільтрована вода подається до установки зворотного осмосу (ЗО-12) за допомогою насоса (Н-14). Насос забезпечує постійний потік води через мембрани. Вода проходить через напівпроникні мембрани, які пропускають лише воду. Солі та інші розчинені речовини затримуються на мембранах. Тривалість фільтрування становить 1 годину. За цей час вода повністю звільняється від солей та інших розчинених речовин. Одержана вода подається до збірника (З-13). Збірник забезпечує накопичення води та її рівномірну подачу до наступної стадії. Збірник

(З-13) з водою підключений до насоса (Н-14). Насос перекачує воду до наступної стадії.

#### *ДР 2.3. Дистиляція води з метою одержання води очищеної*

До дистиляційної установки (Д-15) подається знесолена вода. Встановлюється температура – 100 °С. Тривалість дистиляції – 3 години. Очищена вода напряму підводиться патрібками до збірнику (З-16). Після цього, очищена вода подається на наступну стадію за допомогою насосу (Н-17).

#### *ДР 2.4. Ультрафільтрація для одержання води для ін'єкцій*

До ультрафільтраційної установки (УФ-18) поступає вода очищена. Вода проходить крізь 4 мембранні напівпроникні керамічні фільтри діаметром пор 0,22 мкм. Тривалість одержання води для ін'єкцій становить 30 хв. Одержана вода поступає до збірнику (З-19). Вода подається до обладнання на миття за допомогою насосу (Н-20).

#### *ДР 3. Підготовка сухих порошоків для ін'єкцій*

На технічних вагах зважують 24,93 г фолієвої кислоти, 39,9 г глюконо-d-лактону та 1,2 г доксорубіцину. Кожну наважку висипають на попередньо промиті та продезінфіковані металеві піддони, які ставлять до сухожару (С-21). Встановлюється температура 180 °С. Тривалість сушіння – 30 хв. Після цього, порошки подають на технологічну стадію виготовлення гідрогелю (ТП 5).

#### *ДР 4. Приготування 0,1 М натрій-фосфатного буферу*

До збірнику (З-23) за допомогою дозатора (Д-22) подається вода для ін'єкцій від ДР 2.4 в кількості 24,5 л. Після цього, на технічних вагах зважують 387 г фосфату натрію двоосновного та 146 г фосфату натрію моноосновного. Після цього, вміст реактора перемішують до повного розчинення та закривають кришку. Перевіряють рівень рН на дисплеї, він маж становити 7,0. Встановлюється температура стерилізації – 131 °С, 0,15 МПа, тривалість стерилізації – 20 хв. Після стерилізації чекають, поки буфер охолоне.

#### *ТП 5. Приготування гідрогелю*

До збірника. Що вже містить в собі стерильний натрій фосфатний буфер – від ДР 4, спочатку вносять стерильний порошок фолієвої кислоти. Вмикають

мішалку до повного перемішування розчину. Після цього, до реактору додають порошко глюконо-d-лактону та порошок доксорубіцину. До сорочки подають воду гарячу та воду охолоджену для встановлення 30 °С та перемішують розчин 3 години для утворення суспензії. Після цього, гідрогель подають до наступної стадії за допомогою перистальтичного насосу (Н-24).

### ***ТП 6. Видування, наповнення та запаювання ампул***

Гранулована пластмаса поліетилену подається до системи БФС-25. Внутрішній екструдер починає переплавляти гранули в пластикові трубочки. Пластикові трубочки подаються до прес-форми. Нижня частина трубочок запаюється. До трубочок подається повітря, яке нагрівається у відповідному модулі БФС-25. Повітря починає формувати флакони відповідно до прес-форми. Після формування основи флаконів повітря видаляється. Через форсунку розливу подається готовий лікарський засіб. Флакони наповнюються по 10 мл. Після того, як наповняться 5 з'єднаних флаконів, наступна прес-форма запаює верхню частину наповнених флаконів, формуючи герметичний флакон з кришкою. Кількість ампул має становити 2497 шт. Тривалість процесу – 30 хв.

### ***ТП 7. Інспектування ампул***

Флакони з минулої стадії подаються до інспекційної машини (І-26) за допомогою конвеєру. Спочатку, флакони перевіряються на герметичність шляхом подачі повітря під надлишковим тиском 0,6 МПа від компресора (ДР 1.7). Нагнітач повітря встановлено в самій інспекційній машині. Після цього, герметичні флакони потрапляють до світлового модуля, де оптичний прилад перевіряє їх на різноманітні вклучення. Тривалість перевірки становить – 20 хв. Після цього, конвеєром, перевірені флакони потрапляють на наступну стадію. Кількість флаконів на цій стадії складає 2472 шт.

### ***ПМФ 8. Марування, фасування, пакування***

#### ***ПМФ 8.1 Маркування ампул***

Готові флакони з лікарським препаратом подаються до маркувальної машини (М-27) за допомогою конвеєру. На відповідну бабину чіпляють рулонну стрічку з клейовими етикетками, на які апарат наносить наступну інформацію:

назва препарату, вміст діючої речовини, реєстраційний номер препарату, дата виготовлення та дата закінчення терміну придатності. Машина клеїть маркери одразу на 5 з'єднаних флаконів. Тривалість етикування становить – 20 хв. Після чого, промарковані ампули конвеєром переносяться до фасувального апарату.

### *ПМВ 8.2 Фасування ампул у коробки*

Фасувальна машина (Ф-20) складає картонні заготовки, з відповідною інформацією та вкладає в них заготовки з 5 з'єднаних пластикових ампул та інструкцію в кожну коробку, після чого її закриває. Також, апарат на готовий лікарський препарат наносить інформацію про номер реєстрації препарату, номер серії, його дату виготовлення та дату закінчення терміну придатності. Тривалість фасування складає – 1 год. Готові коробки лікарського препарату подаються на групове пакування.

### *ПМВ 8.3 Групове пакування коробок з ампулами*

Конвеєром до машини групового пакування (Г-21) подаються коробки лікарського препарату. Автомат вкладає по 100 коробок лікарського препарату в картонну коробку, яку попередньо самостійно складає. Після цього, машина заклеює коробку скотчем. Тривалість пакування становить 10 хв. Після одержання групових коробок, уповноважена особа наносить інформацію за допомогою штампів щодо назви препарату, його серії та дати виготовлення. Коробки відправляються на склад на зберігання при температурі не вище 25 °С.

## РОЗДІЛ 13

### ОПИС ІН'ЕКЦІЙНОГО ПРЕПАРАТУ НА ОСНОВІ ФОЛІЄВОЇ КИСЛОТИ ЗГІДНО АНД

Ця аналітично нормативна документація поширюється на медичний препарат Доксорубіцин-Фолат, який являє собою готовий ін'екційний гідрогель, який містить доксорубіцин як діючу речовину.

#### Склад:

Діючі речовини:

10 мл розчину містить 4,5 мг доксорубіцину

Допоміжні речовини:

Фолієва кислота

Глюкозо-*d*-лактон

Вода для ін'екцій

**Призначення.** Хіміотерапія раку легень, бронх та трахей.

**Форма випуску.** Ампули по 10 мл №5

Таблиця 13.1.

#### Специфікація на ін'екційний препарат «Доксорубіцин-Фолат»

Найменування показників контролю	Встановлені значення	Методи контролю
1	2	3
Опис	Прозорий гідрогель помаранчевого відтінку	За п. 1 АНД, візуально
Ідентифікація	Спектрофотометричний аналіз	За п. 2 АНД
Прозорість	Непрозора	За п. 3 АНД, ДФУ 2.2.1, вид. 1
Кольоровість	Помаранчеве забарвлення	За п. 4 АНД, ДФУ 2.2.2, вид. 1

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.20 КР ПЗ</i>					
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата						
Розроб.		Тугарева Т.І.			<b>РОЗДІЛ 12 ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА ГІДРОГЕЛЕВИХ ІН'ЕКЦІЙ ДЛЯ ХІМІОТЕРАПІЇ</b>					
Перевір.		Карлаш Ю.В.						Лім.	Арк.	Аркушів
Реценз.									124	133
Н. Контр.								<i>Кафедра БТМ</i>		
Затверд.		Стабніков В.П.								

<b>pH</b>	5,0-5,5	За п. 5 АНД, ДФУ 2.2.3, вид. 1
<b>Супровідні домішки</b>	На хроматограмі випробовуваного розчину площа будь-якого піка не має перевищувати площу піка фолієвої кислоти та доксорубіцину на хроматограмі розчину порівняння	За п. 6 АНД, ДФУ 2.2.29, вид. 1
<b>Однорідність дозованих одиниць</b>	Препарат має в середньому містити 85 - 115 % дозованості одиниці	За п. 7 АНД
<b>Об'єм, що витягається</b>	10 мл	За п. 8 АНД, ДФУ 2.9.17, вид. 1
<b>Стерильність</b>	Має витримувати випробування на стерильність	За п. 9 АНД, ДФУ 2.6.1, вип. 1
<b>Бактеріальні ендотоксини</b>	Менше 2,2 МО/мг	За п. 10 АНД, ДФУ 2.6.14, вип. 1
<b>Аномальна токсичність</b>	Має витримувати випробування на аномальну токсичність	За п. 11 АНД, ДФУ 2.6.9, вип. 1
<b>Механічні включення</b>	Мають бути відсутні	За п. 12 АНД, ДФУ 2.9.19, вид. 1
<b>Кількісне визначення</b>	Порівняння піків на хроматограмі	За п. 13 АНД, ДФУ 2.2.29, вид. 1

### Методи контролю

#### 1. Опис

Прозорий гідрогель помаранчевого кольору. Визначають візуально.

#### 2. Ідентифікація

До об'єму ін'єкції, еквівалентного приблизно 100 мг фолієвої кислоти, додають воду, щоб отримати приблизно 25 мл. Доводять соляною кислотою до pH 3,0, охолоджують до 5 °С, потім фільтрують та промивають осад фолієвої кислоти холодною водою, поки останнє промивання не покаже відсутність хлориду. Потім, осад промивають ацетоном і висушують при 80 °С протягом 1 години: УФ-

спектр поглинання (280 нм) розчину фолієвої кислоти 1 на 100 000, отриманого таким чином у розчині гідроксиду натрію (1 на 250), демонструє максимуми та мінімуми на тих самих довжинах хвиль (200-400 нм), що й у аналогічний розчин фолієвої кислоти, вимірюваний одночасно. Співвідношення A256/A365 становить від 2,80 до 3,00 [47].

### 3. Прозорість

Для визначення прозорості і ступеня каламутності рідин та гідрогелів використовують однакові пробірки з безбарвного прозорого нейтрального скла з плоским дном, що мають внутрішній діаметр від 15 мм до 25 мм. 40-мм шар випробовуваної рідини порівнюють із 40-мм шаром свіжоприготованого, як описано нижче, еталона. Порівняння гідрогелю проводять у розсіяному денному світлі через 5 хв після приготування еталона, переглядаючи зразки вздовж вертикальної осі пробірок на чорному фоні. Розсіяння світла має бути таким, щоб еталон I легко відрізнявся від води, а еталон II легко відрізнявся від еталона I.

Випробовувану рідину вважають непрозорою, якщо вона не витримує порівняння з водою.

Таблиця 6.2.

#### Еталонні розчини

	Еталон (мл)			
	I	II	III	IV
Основна суспензія	5	10	30	50
Вода	95	90	70	50

### 4. Кольоровість

Визначають згідно з ДФУ 2.2.2. вип 1.

2,0 мл випробовуваного гідрогелю порівнюють з 2,0 мл води, використовуючи однакові пробірки з безбарвного прозорого нейтрального скла з зовнішнім діаметром 12 мм. Порівняння забарвлення проводять у розсіяному денному світлі, переглядаючи зразки горизонтально (перпендикулярно вісі пробірок) на білому фоні.

## 5. рН

Значення рН має становити 5,0-5,5 одиниць. Визначають згідно ДФУ 2.2.3, вид. 1.

Вимірювальним приладом є вольтметр з вхідним опором принаймні у 100 разів більшим за опір N використовуваних електродів. Прилад звичайно градується в одиницях рН і повинен мати таку чутливість, щоб можна було виявити відмінність принаймні 0.05 одиниць рН або 0.003 В.

Усі виміри проводять при тій самій температурі в інтервалі від 20 °С до 25 °С. Прилад калібрують за допомогою буферного розчину калію гідрофталату і одного з буферних розчинів з іншим значенням рН. Показання приладу для третього буферного розчину з проміжним значенням рН не мають відрізнятися більш як на 0.05 одиниць рН від табличного значення рН цього розчину. Електроди занурюють у випробовуваний розчин і вимірюють рН у тих самих умовах, що і для буферних розчинів. Якщо прилад використовують часто, його калібрування проводять регулярно. У противному разі калібрування приладу має проводитися перед кожним виміром.

Усі випробовувані розчини і стандартні буферні розчини мають бути приготовані на воді, вільній від діоксиду вуглецю.

### Приготування стандартних буферних розчинів

0.05 М розчин калію тетраоксалату. 12.61 г  $K_2C_2O_4 \cdot 2H_2O$  розчиняють у воді Рі доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 1000 мл.

0.05 М розчин калію гідрофталату. 10.3 г  $KHC_8H_4O_4$ , попередньо висушеного при температурі від 110 °С до 135 °С до постійної маси, розчиняють у воді Рі доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 1000 мл.

0,01 М розчин натрію тетраборату. 3.80 г  $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$  розчиняють у воді Рі доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 1000 мл. Зберігають, захищаючи від діоксиду вуглецю.

## 6. Однорідність дозованих одиниць

Використовуюючи підхожу аналітичну методику, визначають вміст діючої речовини в кожній з 10 дозованих одиниць лікарського засобу, відібраних за статистично обгрунтованою схемою.

Препарат витримує випробування, якщо вміст у кожній його однодозовій одиниці перебуває в межах 85 - 115 % від середнього вмісту. Препарат не витримує випробування, якщо вміст у більш як одній одиниці виходить за вищезазначені межі або якщо вміст хоча б в одній одиниці виходить за межі 75 - 125 % від середнього вмісту. Якщо вміст в одній одиниці препарату виходить за межі 85 - 115 %, але перебуває у межах 75 - 125 %, визначають вміст у кожній з 20 додаткових однодозових одиниць препарату, відібраних за статистично обгрунтованою схемою. Препарат витримує випробування, якщо вміст не більш як в одній з проаналізованих 30 одиниць виходить за межі 85 - 115 % і в жодній одиниці не виходить за межі 75 - 125 % від середнього вмісту.

## **7. Супровідні домішки**

Визначають згідно ДФУ 2.2.19, вид. 1

Обладнання звичайно складається з системи подавання рухомої фази, блока вводу проби (з використанням шприца або петлевого дозатора), хроматографічної колонки, детектора і реєструючого пристрою. Рухома фаза звичайно подається під тиском з однієї або декількох посудин і протікає через блок вводу проби, колонку, а потім через детектор із заданою швидкістю.

Температуру хроматографічної колонки підтримують постійною. Склад рухомої фази, залежно від зазначеного в окремій статті, може або залишатися постійним протягом всього аналізу (ізократичне елюювання),

або може змінюватися відповідно до заданої програми (градієнтне елюювання). Використовуваний детектор має забезпечувати визначення

тих кількостей аналізованих речовин, які елюються з колонки. Звичайно для детектування використовують абсорбційну спектрофотометрію; використовують також диференціальну рефрактометрію, флуориметрію, спалювання і електрохімічні методи.

Колонку врівноважують при зазначеному складі рухомої фази. Готують випробовуваний розчин і розчин(и) порівняння, як зазначено в окремій статті. Розчини не мають містити твердих часток. Використовуючи розчини порівняння, настроюють прилад і підбирають об'єми проб, що вводяться, які дозволяють одержати необхідний (адекватний) сигнал. Виконують повторні введення для перевірки збіжності сигналу і перевіряють, якщо необхідно, число теоретичних тарілок. Вводять розчини і реєструють результати хроматографування. Для перевірки збіжності сигналу виконують повторні введення. Визначають площі піків аналізованих компонентів. У випадку, якщо коефіцієнт симетрії, обчислений, як описано нижче, має значення від 0.8 до 1.20, допускається проводити визначення за висотою піків. При використанні градієнтного елюювання необхідно проводити визначення за площами піків. При використанні внутрішнього стандарту треба переконатися, що жоден з піків аналізованої речовини або його домішки не маскується піком внутрішнього стандарту. З одержаних значень обчислюють вміст визначуваного компонента або компонентів.

Коефіцієнт симетрії піка може бути обчислений за формулою:

$$\frac{b_{0,05}}{2A}$$

де:  $b_{0,05}$  - ширина піка на одній двадцятій висоти піка:

2A- відстань між перпендикуляром, опущеним з максимуму піка, і передньою межею піка на одній двадцятій висоти піка.

#### **8. Об'єм, що витягається**

Визначають згідно з ДФУ 2.9.17. вип 1.

Відбирають одну ампулу. Переносять вміст у сухий мірний циліндр такої місткості, щоб визначуваний об'єм заповнив не менше 40 % номінального об'єму циліндра. Вимірюють об'єм, що витягається. Об'єм, що витягається, має бути не меншим за номінальний об'єм зазначений на флаконі.

#### **9. Стерильність**

Визначають згідно ДФУ 2.6.1, вип. 1

Випробування на стерильність проводять за асептичних умов, використовуючи, наприклад, ламінар – бокс класу А, розташований у чистому приміщенні класу В або ізолятор. Заходи, що вживаються для попередження мікробного забруднення, не мають чинити впливу на мікроорганізми, які можуть бути виявлені у зразку в результаті випробування. Умови треба регулярно контролювати шляхом аналізу проб, відібраних відповідним чином у робочій зоні.

Для проведення випробування на стерильність можуть бути використані живильні середовища, наведені нижче. Тіогліколеве середовище призначене для вирощування анаеробних бактерій, однак може бути також використане для виділення аеробних бактерій. Соево-казеїнове середовище призначене для вирощування аеробних бактерій, а також може бути використане для виявлення грибів.

**Тіогліколеве середовище (г/л)**

Гідролізат казеїну - 15,00

Дріжджовий екстракт - 5,00

Глюкоза - 5,50

Натрію хлорид - 2,50

L-цистин - 0,50

Натрію тіогліколят - 0,50

Резазурін - 0,001

Агар-агар - 0,75

Кінцеве значення рН (при 25°C)  $7,1 \pm 0,2$

**Соево-казеїнове живильне середовище (г/л)**

Панкреатичний гідролізат казеїну - 17

Папаїновий гідролізат соєвої муки - 3

Натрію хлорид - 5

Дикалію гідрофосфат – 2,5

Глюкози моногідрат – 2,5

Агар-агар - 0,75

рН після стерилізації  $7.3 \pm 0.2$

Декілька чашок Петрі з живильним середовищем інкубують при наступних температурах: 30-35 °С для визначення бактерій, 20-25 °С для виявлення грибів. Визначення триває протягом 14 діб. Після закінчення періоду інкубації не має спостерігатися ріст мікроорганізмів.

#### **10. Бактеріальні ендотоксини**

Визначають згідно з ДФУ 2.6.14. вип 1.

Хромогенний метод відноситься до інструментальних спектрофотометричних методів кількісного визначення бактеріальних ендотоксинів. Принцип хромогенного кінетичного методу заснований на вимірюванні часу реакції, необхідного для розвитку певної інтенсивності забарвлення після звільнення барвника завдяки лізису хромогенного пептиду в присутності ендотоксинів. Концентрація бактеріальних ендотоксинів у розчині визначається за логарифмом часу реакції за допомогою калібрувального графіка. Чим вище концентрація ендотоксину, тим швидше протікає біохімічна реакція, та тим менше часу потрібно, щоб оптична густина досягла граничного значення. Вимірювання проводяться за допомогою спектрофотометра за довжини хвилі 405 нм.

#### **11. Аномальна токсичність**

Визначають згідно з ДФУ 2.6.9. вип 1.

Кількість випробовуваного лікарського засобу, зазначену в окремій статті, вводять внутрішньовенно кожній із п'яти здорових мишей масою від 17 г до 22 г. Розчин вводять протягом інтервалу часу від 15 с до 30 с. якщо немає інших зазначень в окремій статті. Зразок витримує випробування, якщо жодна з мишей не гине в межах 24 год або протягом часу, зазначеного в окремій статті. Якщо більш як одна тварина гине, зразок не проходить випробування. У випадку загибелі однієї тварини випробування повторюють. Зразок витримує випробування, якщо жодна з тварин у другій групі не гине в межах зазначеного інтервалу часу.

#### **12. Механічні включення**

Визначають згідно ДФУ 2.9.19, вид. 1

Для контролю використовують прилад, заснований на принципі світлоблокування, який дозволяє автоматично вимірювати кількість і розмір часток. Прилад калібрують, використовуючи дисперсійні зависі ФСЗ сферичних часток розміром від 5 мкм до 25 мкм. Стандартні частки дисперговані у воді, вільній від часток. Необхідно уникати агрепції часток дисперсійної фази.

Перемішують вміст зразка, повільно і безперервно перевертаючи контейнер п'ять разів. Якщо необхідно, обережно видаляють етикетки і ковпачки. Зовнішні поверхні контейнера, який розкривають, очищають струменем води, вільної від часток. Після розкривають контейнер, уникаючи внесення будь-якого забруднення. Для видалення бульбашок повітря дають відстоятися розчину протягом 2 хв.

Відбирають чотири проби, не менше 5 мл кожна, і визначають кількість часток з розмірами, що дорівнюють або перевищують значення, зазначені у відповідному нормативному документі. Виключають результат, одержаний для першої проби, і обраховують середню кількість часток у випробовуваному зразку.

### **13. Кількісне визначення**

Методика продовжує метод ідентифікації. Після одержання оптичної густини, концентрацію зразка порівнюють з калібрувальним графіком.

### **14. Зберігання**

У стерильному повітронепроникному контейнері з контролем першого розкриття. Зберігати при температурі не вище 25 °С у захищеному від світла та недоступному для дітей місці.

### **15. Маркування**

Маркування із зазначенням серії, дати виготовлення, та терміну придатності. Окремо зазначається:

- субстанція стерильна;
- субстанція вільна від бактеріальних ендотоксинів.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Panja A., Das S., Chakraborty A., Chakraborty P., Pal S., Nandi A. K. Injectable Hydrogel of Vitamin B9 for the Controlled Release of Both Hydrophilic and Hydrophobic Anticancer Drugs. *ChemMedChem*. 2018, 13(22): 2427-2436. <http://dx.doi.org/10.1002/cmdc.201800562>
2. Mandal A., Clegg J. R., Anselmo A. C., Mitragotri S. Hydrogels in the clinic. *Bioengineering & Translational Medicine*. 2020, 5(2): e10158. <https://doi.org/10.1002/btm2.10158>
3. Norouzi M., Nazari B., Miller D. W. Injectable hydrogel-based drug delivery systems for local cancer therapy. *Drug discovery today*. 2016, 21(11): 1835-1849. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.07.006>
4. Ledesma-Amaro R., Santos M. A., Jiménez A., Revuelta J. L. Microbial production of vitamins. In *Microbial production of food ingredients, enzymes and nutraceuticals*. Woodhead Publishing. 2013. P. 571-594. <https://doi.org/10.1533/9780857093547.2.571>
5. Serrano-Amatriain C., Ledesma-Amaro R., López-Nicolás R., Ros G., Jiménez A., Revuelta J. L. Folic acid production by engineered *Ashbya gossypii*. *Metabolic engineering*. 2016, 38: 473-482. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2016.10.011>
6. Gu Q., Li P. Biosynthesis of vitamins by probiotic bacteria. *Probiotics and prebiotics in human nutrition and health*. 2016: 135-148. <https://doi.org/10.5772/63117>
7. Hati S., Patel M., Mishra B. K., Das S. Short-chain fatty acid and vitamin production potentials of *Lactobacillus* isolated from fermented foods of Khasi Tribes, Meghalaya, India. *Annals of microbiology*. 2019, 69(11): 1191-1199. <https://doi.org/10.1007/s13213-019-01500-8>
8. Kim J. Y., Choi E. J., Lee J. H., Yoo M. S., Heo K., Shim J. J., Lee J. L. Probiotic potential of a novel vitamin B2-overproducing *Lactobacillus plantarum* strain, HY7715, isolated from Kimchi. *Applied Sciences*. 2021, 11(13): 5765. <https://doi.org/10.3390/app11135765>

9. Gu Q., Zhang C., Song D., Li P., Zhu X. Enhancing vitamin B12 content in soy-yogurt by *Lactobacillus reuteri*. *International journal of food microbiology*. 2015, 206: 56-59. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.033>
10. De Angelis M., Bottacini F., Fosso B., Kelleher P., Calasso M., Di Cagno R., et al. *Lactobacillus rossiae*, a vitamin B12 producer, represents a metabolically versatile species within the genus *Lactobacillus*. *PloS one*. 2014, 9(9): e107232. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107232>
11. Hamzehlou P., Sepahy A. A., Mehrabian S., Hosseini F. Production of vitamins B3, B6 and B9 by *Lactobacillus* isolated from traditional yogurt samples from 3 cities in Iran, winter 2016. *Applied Food Biotechnology*. 2018, 5(2): 107-120. <http://dx.doi.org/10.22037/afb.v4i3.15014>
12. Walhe R. A., Diwanay S. S., Patole M. S., Sayyed R. Z., Al-Shwaiman H. A., Alkhulaifi M. M., et al. Cholesterol reduction and vitamin B12 production study on *Enterococcus faecium* and *Lactobacillus pentosus* isolated from yoghurt. *Sustainability*. 2021, 13(11): 5853. <https://doi.org/10.3390/su13115853>
13. Liu Y., Van Bennekom E. O., Zhang Y., Abee T., Smid E. J. Long-chain vitamin K2 production in *Lactococcus lactis* is influenced by temperature, carbon source, aeration and mode of energy metabolism. *Microbial Cell Factories*. 2019, 18(1): 1-14. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1179-9>
14. Mahdinia E., Demirci A., Berenjian A. Effects of medium components in a glycerol-based medium on vitamin K (menaquinone-7) production by *Bacillus subtilis* natto in biofilm reactors. *Bioprocess and biosystems engineering*. 2019, 42: 223-232. <https://doi.org/10.1007/s00449-018-2027-8>
15. Zhao C., Wan Y., Tang G., Jin Q., Zhang H., Xu Z. Comparison of different fermentation processes for the vitamin K2 (Menaquinone-7) production by a novel *Bacillus velezensis* ND strain. *Process Biochemistry*. 2021, 102: 33-41. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.11.029>
16. Papadaki E., Mantzouridou F. T. Natural  $\beta$ -carotene production by *Blakeslea trispora* cultivated in Spanish-style green olive processing wastewaters. *Foods*. 2021, 10(2): 327. <https://doi.org/10.3390/foods10020327>

17. Naz T., Nosheen S., Li S., Nazir Y., Mustafa K., Liu Q., et al. Comparative analysis of  $\beta$ -carotene production by *Mucor circinelloides* strains CBS 277.49 and WJ11 under light and dark conditions. *Metabolites*. 2020, 10(1): 38. <https://doi.org/10.3390/metabo10010038>
18. Kallscheuer N. Engineered microorganisms for the production of food additives approved by the European Union—A systematic analysis. *Frontiers in microbiology*. 2018, 9: 1746. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01746>
19. Bøe C. A., Holo H. Engineering *Lactococcus lactis* for increased vitamin K2 production. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2020, 8: 191. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00191>
20. Solopova A., Bottacini F., Venturi degli Esposti E., Amaretti A., Raimondi S., Rossi M., Van Sinderen D. Riboflavin Biosynthesis and Overproduction by a Derivative of the Human Gut Commensal *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ATCC 15697. *Frontiers in Microbiology*. 2020, 11: 573335. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.573335>
21. Naz T., Nazir Y., Nosheen S., Ullah S., Halim H., Fazili A. B. A., et al. Redirecting metabolic flux towards the mevalonate pathway for enhanced  $\beta$ -carotene production in *M. circinelloides* CBS 277.49. *BioMed Research International*. 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/8890269>
22. Wang G., Shi T., Chen T., Wang X., Wang Y., Liu D., et al. Integrated whole-genome and transcriptome sequence analysis reveals the genetic characteristics of a riboflavin-overproducing *Bacillus subtilis*. *Metabolic engineering*. 2018, 48: 138-149. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.05.022>
23. [Rosa J. C. C., Colombo L. T., Alvim M. C. T., Avonce N., Van Dijck P., Passos F. M. L. Metabolic engineering of \*Kluyveromyces lactis\* for L-ascorbic acid \(vitamin C\) biosynthesis. \*Microbial Cell Factories\*. 2013, 12: 1-13. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-59>](https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-59)
24. Kuivanen J., Penttilä M., Richard P. Metabolic engineering of the fungal D-galacturonate pathway for L-ascorbic acid production. *Microbial Cell Factories*. 2015, 14(1): 1-9. <https://doi.org/10.1186/s12934-014-0184-2>

25. Sun L., Kwak S., Jin Y. S. Vitamin A production by engineered *Saccharomyces cerevisiae* from xylose via two-phase *in situ* extraction. *ACS synthetic biology*. 2019, 8(9): 2131-2140. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.9b00217>
26. Hu, Q., Zhang, T., Yu, H., Ye, L. (2022). Selective biosynthesis of retinol in *S. cerevisiae*. *Bioresources and Bioprocessing*, 9(1), 22. <https://doi.org/10.1186/s40643-022-00512-8>
27. Shen B., Zhou P., Jiao X., Yao Z., Ye L., Yu H. Fermentative production of Vitamin E tocotrienols in *Saccharomyces cerevisiae* under cold-shock-triggered temperature control. *Nature communications*. 2020, 11(1): 5155. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18958-9>
28. Andreieva Y., Lyzak O., Liu W., Kang Y., Dmytruk K., Sibirny A. SEF1 and VMA1 genes regulate riboflavin biosynthesis in the flavinogenic yeast *Candida famata*. *Cytology and Genetics*. 2020, 54: 379-385. <https://doi.org/10.3103/S0095452720050023>
29. Qu L., Xiu X., Sun G., Zhang C., Yang H., Liu Y., et al. Engineered yeast for efficient de novo synthesis of 7-dehydrocholesterol. *Biotechnology and Bioengineering*. 2022, 119(5): 1278-1289. <https://doi.org/10.1002/bit.28055>
30. Guo X. J., Xiao W. H., Wang Y., Yao M. D., Zeng B. X., Liu H., et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for 7-dehydrocholesterol overproduction. *Biotechnology for biofuels*. 2018, 11: 1-14. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1194-9>
31. Liu Y., Ren L., Zhao J., Xia Y., Zhang Z., Guan X., et al. Ergosterol production at elevated temperatures by Upc2-overexpressing *Kluyveromyces marxianus* using Jerusalem artichoke tubers as feedstock. *Bioresource Technology*. 2022, 362: 127878. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127878>
32. Mata-Gómez, L. C., Montañez, J. C., Méndez-Zavala, A., Aguilar, C. N. (2014). Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. *Microbial cell factories*, 13(1), 1-11. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-12>
33. López J., Cataldo V. F., Peña M., Saa P. A., Saitua F., Ibaceta M., Agosin E. Build your bioprocess on a solid strain— $\beta$ -carotene production in recombinant

*Saccharomyces cerevisiae*. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. 2019, 7: 171. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00171>

34. Zhang K., Tong M., Gao K., Di Y., Wang P., Zhang C., et al. Genomic reconstruction to improve bioethanol and ergosterol production of industrial yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2015, 42(2): 207-218. <https://doi.org/10.1007/s10295-014-1556-7>

35. Revuelta J. L., Ledesma-Amaro R., Jiménez A. Industrial production of vitamin B2 by microbial fermentation. *Industrial biotechnology of vitamins, biopigments, and antioxidants*. 2016: 15-40. <https://doi.org/10.1002/9783527681754.ch2>

36. Marie S. J., Lacroix C., Stevens M. J. Vitamin B12—physiology, production and application. *Industrial biotechnology of vitamins, biopigments, and antioxidants*. 2016: 129-159. <https://doi.org/10.1002/9783527681754.ch6>

37. Pappenberger G., Hohmann H. P. Industrial production of L-ascorbic acid (vitamin C) and D-isoascorbic acid. *Biotechnology of food and feed additives*. 2014: 143-188. [https://doi.org/10.1007/10\\_2013\\_243](https://doi.org/10.1007/10_2013_243)

38. Berenjian A., Mahanama R., Kavanagh J., Dehghani F. Vitamin K series: current status and future prospects. *Critical reviews in biotechnology*. 2015, 35(2): 199-208. <https://doi.org/10.3109/07388551.2013.832142>

39. Biscaro Pedrolli D., Jankowitsch F., Schwarz J., Langer S., Nakanishi S., Frei E., Mack M. Riboflavin analogs as antiinfectives: occurrence, mode of action, metabolism and resistance. *Current pharmaceutical design*. 2013, 19(14): 2552-2560. <https://doi.org/10.2174/1381612811319140006>

40. Heal K. R., Qin W., Ribalet F., Bertagnolli A. D., Coyote-Maestas W., Hmelo L. R., et al. Two distinct pools of B12 analogs reveal community interdependencies in the ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2017, 114(2): 364-369. <https://doi.org/10.1073/pnas.1608462114>

41. Khillan J. S. Vitamin A/retinol and maintenance of pluripotency of stem cells. *Nutrients*. 2014, 6(3): 1209-1222. <https://doi.org/10.3390/nu6031209>

42. Abdulkadir M. Q., Abdulhadi S. L., Hadi M. K., Abd Aljabar Z. R. Retinoids and rexinoids as vitamin A analogs. *Biochem. Cell. Arch.* 2020, 20 (2): 3761-3767, 2020
43. Avalos J., Pardo-Medina J., Parra-Rivero O., Ruger-Herreros M., Rodríguez-Ortiz R., Hornero-Méndez D., Limón M. C. Carotenoid biosynthesis in *Fusarium*. *Journal of Fungi*. 2017, 3(3): 39. <https://doi.org/10.3390/jof3030039>
44. Kedishvili N. Y. Retinoic acid synthesis and degradation. *The Biochemistry of Retinoid Signaling II: The Physiology of Vitamin A-Uptake, Transport, Metabolism and Signaling*. 2016: 127-161. [https://doi.org/10.1007%2F978-94-024-0945-1\\_5](https://doi.org/10.1007%2F978-94-024-0945-1_5)
45. Leysens C., Verlinden L., Verstuyf A. The future of vitamin D analogs. *Frontiers in physiology*. 2014, 5: 122. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00122>
46. Mora-Lugo R., Stegmüller J., Mack M. Metabolic engineering of roseoflavin-overproducing microorganisms. *Microbial Cell Factories*. 2019, 18(1): 1-13. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1181-2>
47. Dudko D., Milker S., Holtmann D., Buchhaupt M. Identification of vitamin B12 producing bacteria based on the presence of bluB/cobT2 homologues. *Biotechnology Letters*. 2023: 1-10. <https://doi.org/10.1007/s10529-023-03362-2>
48. Torres A. C., Vannini V., Bonacina J., Font G., Saavedra L., Taranto M. P. Cobalamin production by *Lactobacillus coryniformis*: biochemical identification of the synthesized corrinoid and genomic analysis of the biosynthetic cluster. *BMC microbiology*. 2016, 16: 1-9. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0854-9>
49. Torres A. C., Elean M., Hebert E. M., Saavedra L., Taranto M. P. Metabolic shift in the production of corrinoid compounds by *Lactobacillus coryniformis* in the absence of purines. *Biochimie*. 2020, 168: 185-189. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.11.003>
50. Yang H., Liu Y., Li J., Liu L., Du G., Chen J. Systems metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for efficient biosynthesis of 5-methyltetrahydrofolate. *Biotechnology and Bioengineering*. 2020, 117(7): 2116-2130. <https://doi.org/10.1002/bit.27332>

51. Wang Y., Zhang M., Li L., Yi J., Liang J., Wang S., Xu P. Biosynthesis of L-5-methyltetrahydrofolate by genetically engineered *Escherichia coli*. *Microbial Biotechnology*. 2022, 15(11): 2758-2772. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.14139>
52. Mo Q., Song W., Xue Z., Yuan J. Multi-level engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the synthesis and accumulation of retinal. *Green Chemistry*. 2022, 24(21): 8259-8263. <https://doi.org/10.1039/D2GC03073J>
53. Han M., Lee P. C. Microbial production of bioactive retinoic acid using metabolically engineered *Escherichia coli*. *Microorganisms*. 2021, 9(7): 1520. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071520>
54. Zinder R., Cooley R., Vlad L. G., Molnar J. A. Vitamin A and wound healing. *Nutrition in Clinical Practice*. 2019, 34(6): 839-849. <https://doi.org/10.1002/ncp.10420>
55. Hemilä H. Vitamin C and infections. *Nutrients*. 2017, 9(4): 339. <https://doi.org/10.3390/nu9040339>
56. Bouillon R., Van Schoor N. M., Gielen E., Boonen S., Mathieu C., Vanderschueren D., Lips P. Optimal vitamin D status: a critical analysis on the basis of evidence-based medicine. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2013, 98(8): E1283-E1304. <https://doi.org/10.1210/jc.2013-1195>
57. Bikle D. D. Vitamin D metabolism, mechanism of action, and clinical applications. *Chemistry & biology*. 2014, 21(3): 319-329. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.12.016>
58. [Suwannasom N., Kao I., Pruß A., Georgieva R., Bäuml H. Riboflavin: the health benefits of a forgotten natural vitamin. \*International Journal of Molecular Sciences\*. 2020, 21\(3\): 950. <https://doi.org/10.3390/ijms21030950>](https://doi.org/10.3390/ijms21030950)
59. Field M. S., Stover P. J. Safety of folic acid. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2018, 1414(1): 59-71. <https://doi.org/10.1111/nyas.13499>
60. Shea B., Swinden M. V., Ghogomu E. T., Ortiz Z., Katchamart W., Rader T., et al. Folic acid and folinic acid for reducing side effects in patients receiving methotrexate for rheumatoid arthritis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2013, (5). <https://doi.org/10.1002/2F14651858.CD000951.pub2>

61. Rizvi S., Raza S. T., Ahmed F., Ahmad A., Abbas S., Mahdi F. The role of vitamin E in human health and some diseases. *Sultan Qaboos University Medical Journal*. 2014, 14(2): e157.
62. Azuma K., Ouchi Y., Inoue S. Vitamin K: novel molecular mechanisms of action and its roles in osteoporosis. *Geriatrics & Gerontology International*. 2014, 14(1): 1-7. <https://doi.org/10.1111/ggi.12060>
63. Adewuyi E. O., Auta A. Medical injection and access to sterile injection equipment in low-and middle-income countries: a meta-analysis of Demographic and Health Surveys (2010–2017). *International health*. 2020, 12(5): 388-394. <https://doi.org/10.1093/inthealth/ihz113>
64. Rysavy M. A., Li L., Tyson J. E., Jensen E. A., Das A., Ambalavanan N., et al. Should vitamin A injections to prevent bronchopulmonary dysplasia or death be reserved for high-risk infants? Reanalysis of the National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network randomized trial. *The Journal of pediatrics*. 2021, 236: 78-85. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2021.05.022>
65. Tolia V. N., Murthy K., McKinley P. S., Bennett M. M., Clark R. H. The effect of the national shortage of vitamin A on death or chronic lung disease in extremely low-birth-weight infants. *JAMA pediatrics*. 2014, 168(11): 1039-1044. <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2014.1353>
66. Tysl K. Vitamin C and microvascular dysfunction in systemic inflammation. *Antioxidants*. 2017, 6(3): 49. <https://doi.org/10.3390/antiox6030049>
67. Wabaidur S. M., Alam S. M., Lee S. H., Allothman Z. A., Eldesoky G. E. Chemiluminescence determination of folic acid by a flow injection analysis assembly. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2013, 105: 412-417. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2012.11.078>
68. Buesing S., Costa M., Schilling J. M., Moeller-Bertram T. Vitamin B12 as a treatment for pain. *Pain physician*. 2019, 22(1): E45.
69. Galior K., Grebe S., Singh R. Development of vitamin D toxicity from overcorrection of vitamin D deficiency: a review of case reports. *Nutrients*. 2018, 10(8): 953. <https://doi.org/10.3390/nu10080953>

70. Ng E., Loewy A. D. Guidelines for vitamin K prophylaxis in newborns. *Paediatrics & child health*. 2018, 23(6): 394-397. <https://doi.org/10.1093/pch/pxy082>
71. Фолієва кислота. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/3533/kislota-folijeva>
72. Фолієва кислота. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://dila.ua/labdir/287.html>
73. Вітамін В9 (Фолієва кислота). [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://globaltest.ua/vitamin-b9.html>
74. Фолієва кислота. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://doctorthinking.org/2020/06/vitamin-b9/>
75. Суперечливе відкриття: вчені назвали вітамін, який пришвидшує розвиток раку. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://glavcom.ua/country/health/superechlive-vidkrittya-vcheni-nazvali-vitamin-yakiy-prishvidshuje-rozvitok-raku-806375.html>
76. Folic Acid Market: Global Industry Analysis and Forecast (2022-2029). [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.maximizemarketresearch.com/market-report/global-folic-acid-market/67081/>
77. Cancer. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
78. Cancer. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.aihw.gov.au/reports/australias-health/cancer>
79. Chemotherapy. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.mayoclinic.org/tests-procedures/chemotherapy/about/pac-20385033>
80. Лікарські форми для ін'єкцій. [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://stud.com.ua/27638/meditsina/likarski\\_formi\\_inyektsiy](https://stud.com.ua/27638/meditsina/likarski_formi_inyektsiy)
81. Pharma IQ Glossary: Bioavailability. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.pharma-iq.com/glossary/bioavailability>

82. ІН'ЄКЦІЙНЕ ТА ІНФУЗІЙНЕ ВВЕДЕННЯ ЛІКІВ. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://profimed.com.ua/likuval-no-profilaktychnyy-pidrozdil/sestryns-ki-manipuliatsii/in-iektsiyne-ta-infuziyne-vvedennia-likiv/>
83. Лікарські форми для ін'єкцій (Formae medicamentorum pro injectionibus). [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://pidru4niki.com/68415/meditsina/likarski\\_formi\\_dlya\\_inyektsiy\\_formae\\_medicamentorum\\_pro\\_injectionibus](https://pidru4niki.com/68415/meditsina/likarski_formi_dlya_inyektsiy_formae_medicamentorum_pro_injectionibus)
84. Внутрішньовенні ін'єкції. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://naurok.com.ua/vnutrishnovenni-in-ekci-prezentaciya-278327.html>
85. Рідкі лікарські форми. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://naurok.com.ua/ridki-likarski-formi-133182.html>
86. Folic Acid Vial - Uses, Side Effects, and More. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.webmd.com/drugs/2/drug-4146/folic-acid-injection/details>
87. Фолієва кислота. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://tabletki.ua/uk/%D0%A4%D0%BE%D0%BB%D0%B8%D0%B5%D0%B2%D0%B0%D1%8F-%D0%BA%D0%B8%D1%81%D0%BB%D0%BE%D1%82%D0%B0/>
88. Rasi A., Zamanian A., Mehran G., Ezati A., Rastin V., Karimi S. Comparing the effect of injectable vitamin B with conventional oral treatment on aphthous stomatitis. *Journal of Skin and Stem Cell*. 2018: 5(1-2). <https://doi.org/10.5812/jssc.69052>
89. Каустична сода. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://prom.ua/ua/p1622448791-soda-kausticheskaya-natrij.html?&primelead=My42>
90. Carraretto A. R., Curi E. F., Almeida C. E. D. D., Abatti R. E. M. Glass ampoules: risks and benefits. *Revista Brasileira de Anestesiologia*. 2011, 61: 517-521. [http://dx.doi.org/10.1016/S0034-7094\(11\)70059-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0034-7094(11)70059-9)
91. Технология BFS – выдув-наполнение-запайка. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://butlerpartner.com/ua/stati/farmatsevtika-i-kosmetika/237-tekhnologiya-bfs-vyduv-napolnenie-zapajka>

92. Blow-Fill-Seal. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://gmpua.com/Equipment/Sterile/BlowFillSeal/index.html>
93. "Blow-Fill-Seal". [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://nikopharm.ua/proizvodstvo/tehnologiya/>
94. РЕКОРМОН раствор для инъекций 2000 МЕ шприц-тюбик 0,3 мл, с иглами 27 G1/2 №6. [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://apteka1.net/ru/catalog/medikamenty/rekormon\\_r-r\\_d\\_in\\_2000](https://apteka1.net/ru/catalog/medikamenty/rekormon_r-r_d_in_2000)
95. Бонвива раствор 3 мг/3 мл шпр.-тюб. №1. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://medtabletka.online/oporno-dvigatelnyj-apparat/bonviva-rastvor-3-mg3-ml-shpr-tyub-1>
96. ТОВАРОЗНАВЧИЙ АНАЛІЗ ІНСТРУМЕНТІВ ТА АПАРАТІВ ДЛЯ ПРОКОЛІВ, ІН'ЄКЦІЙ І ТРАНСФУЗІЙ. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://tovaroved.nuph.edu.ua/wp-content/uploads/2020/06/Inyektsijni-zasobi.pdf>
97. [Meucci A., Rossetti L., Zago M., Monti L., Giraffa G., Carminati D., Tidona F. Folate biosynthesis by Streptococcus thermophilus during growth in milk. Food microbiology. 2018, 69: 116-122. https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.08.001](#)
98. [Engevik M. A., Morra C. N., Röth D., Engevik K., Spinler J. K., Devaraj S., et al. Microbial metabolic capacity for intestinal folate production and modulation of host folate receptors. Frontiers in microbiology. 2019: 2305. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02305](#)
99. [Laiño J. E., del Valle M. J., de Giori G. S., LeBlanc J. G. J. Applicability of a Lactobacillus amylovorus strain as co-culture for natural folate bio-enrichment of fermented milk. International journal of food microbiology. 2014, 191: 10-16. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.08.031](#)
100. [Laiño J. E., Levit R., de LeBlanc A. D. M., de Giori G. S., LeBlanc J. G. Characterization of folate production and probiotic potential of Streptococcus gallolyticus subsp. macedonicus CRL415. Food microbiology. 2019, 79: 20-26. https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.10.015](#)
101. [Laiño J. E., del Valle M. J., Hébert E. M., de Giori G. S., LeBlanc J. G. Folate production and fol genes expression by the dairy starter culture Streptococcus](#)

[thermophilus CRL803 in free and controlled pH batch fermentations. LWT-Food Science and Technology. 2017, 85: 146-150.](#)  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2017.07.004>

102. Johnson-Arbor K., Dubey R. Doxorubicin. StatPearls Publishing. 2022.

103. Gupta C., Jaipuria A., Gupta N. Inhalable Formulations to Treat Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC): Recent Therapies and Developments. *Pharmaceutics*. 2022, 15(1): 139. <https://doi.org/10.3390%2Fpharmaceutics15010139>

104. Злоякісні новоутворення трахеї, бронхів, легені. [Електронний ресурс]. Режим доступу: [http://www.ncru.inf.ua/publications/BULL\\_24/PDF/leg.pdf](http://www.ncru.inf.ua/publications/BULL_24/PDF/leg.pdf)

105. Населення України скоротилось до 34,5 мільйона – Держстат. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.the-village.com.ua/village/city/city-news/330587-naselennya-ukrayini-skorotilos-do-34-5-milyona-derzhstat>

106. Doxorubicin Solution for Injection. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.medicines.org.uk/emc/product/6184/smpc#gref>

107. Лікування раку легенів хіміотерапією. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://spizhenko.clinic/uk/blog-uk/himioterapiya-rak-legkih>

108. Вага і зріст українців у 2020 році – вражаюча інформація від Держстату. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.5.ua/dv/life/220966>

109. Kumar P. S., Joshiba G. J. Separation and purification of vitamins: vitamins B1, B2, B6, C and K1. *Applications of Ion Exchange Materials in Biomedical Industries*. 2019: 177-187. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-06082-4\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-030-06082-4_9)

110. The Process of Ion Exchange and its Industrial Applications. [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://sensorex.com/ion-exchange-and-industrial-applications/#Ion\\_Exchange\\_Industrial\\_Applications](https://sensorex.com/ion-exchange-and-industrial-applications/#Ion_Exchange_Industrial_Applications)

111. Singla M., Bhardwaj M., Dogra R. Destructive distillation of biomass. *IJCS*. 2017, 5(5), 345-348.

112. Klimek-Ochab M., Brzezińska-Rodak M., Żymańczyk-Duda E., Lejczak B., Kafarski P. Comparative study of fungal cell disruption—scope and limitations of

- the methods. *Folia microbiologica*. 2011, 56: 469-475.  
<https://doi.org/10.1007%2Fs12223-011-0069-2>
113. Patent of China CN106749257A. The purification process of folic acid / Xin J., Liu H. Publ. 31.05.2017.
114. De Brouwer V., Zhang G. F., Storozhenko S., Van Der Straeten D., Lambert W. E. pH stability of individual folates during critical sample preparation steps in prevision of the analysis of plant folates. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*. 2007, 18(6): 496-508.  
<https://doi.org/10.1002/pca.1006>
115. [Карлаш Ю.В., Красінько В.О. Основи проєктування біотехнологічних виробництв: Навч. посібник. –К.:НУХТ, 2022. –373 с.](#)
116. Noor A., Little C. R. Evaluating the Role of Exogenously Applied Ascorbic Acid in Rescuing Soybean Plant Health in The Presence of Pathogen-Induced Oxidative Stress. *Pathogens*. 2022, 11(10): 1117.  
<https://doi.org/10.3390/pathogens11101117>
117. Reducing agent - 2-Mercaptoethanol. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.clinisciences.com/en/buy/cat-reducing-agent-2-mercaptoethanol-3305.html>
118. The Protein Man's Blog | A Discussion of Protein Research. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://info.gbiosciences.com/blog/different-types-of-extraction-buffers-and-when-to-use-them>
119. Методи руйнування клітин. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://um.co.ua/8/8-7/8-7174.html>
120. Рибалкін М. В. Визначення оптимального методу дезінтеграції клітин грибів *Candida albicans* та *Candida tropicalis*. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*. 2014, (2): 71-75. <https://doi.org/10.14739/2409-2932.2014.2.26169>
121. Gorania M., Seker H., Haris P. I. Predicting a protein's melting temperature from its amino acid sequence. In 2010 Annual International Conference of the IEEE

Engineering in Medicine and Biology (pp. 1820-1823). IEEE.  
<https://doi.org/10.1109/iembs.2010.5626421>

122. Klimek-Ochab M., Brzezińska-Rodak M., Żymańczyk-Duda E., Lejczak B., Kafarski P. Comparative study of fungal cell disruption—scope and limitations of the methods. *Folia microbiologica*. 2011, 56: 469-475.  
<https://doi.org/10.1007%2Fs12223-011-0069-2>

123. Marine Geochemistry - Laboratory Methods. [Електронний ресурс].  
Режим доступу: <https://www.sedgeochem.uni-bremen.de/dalton.html>

124. U.S. Patent No. 2,662,081. Purification of synthetic folic acid / Hanze A.  
R. Publ. 08.12.1953

125. Каустична сода. [Електронний ресурс]. Режим доступу:  
<https://prom.ua/ua/p1622448791-soda-kausticheskaya-natrij.html?&primelead=My42>

126. Гідроокис кальцію. [Електронний ресурс]. Режим доступу:  
[https://klebrig.com.ua/ua/p1741572649-gidrookis-kaltsiya-klebrig.html?source=merchant\\_center&utm\\_source=google&utm\\_medium=cpc&utm\\_campaign=Perf\\_Max-Turboweb&gclid=CjwKCAjw7c2pBhAZEiwA88pOF0\\_k3g1-xUQ0vIw-Csfy0YcCvRNOMps1KfHIND2LsrGhliXOiY-KBoC40cQAvD\\_BwE](https://klebrig.com.ua/ua/p1741572649-gidrookis-kaltsiya-klebrig.html?source=merchant_center&utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=Perf_Max-Turboweb&gclid=CjwKCAjw7c2pBhAZEiwA88pOF0_k3g1-xUQ0vIw-Csfy0YcCvRNOMps1KfHIND2LsrGhliXOiY-KBoC40cQAvD_BwE)

127. Замицький О. В., Бондар Н. В., Крадожон С. О. Лабораторні дослідження комбінованого методу зневоднення внутрішніми джерелами теплоти в умовах електричного нагріву. *Вісник Вінницького політехнічного інституту*. 2022, (1): 21-27. <https://doi.org/10.31649/1997-9266-2022-160-1-21-27>

128. Гидросульфат натрия. [Електронний ресурс]. Режим доступу:  
[https://snabhim.com.ua/gidrosulfat-natrija-him?gclid=CjwKCAjw7c2pBhAZEiwA88pOFxVTucvJUZOzrNjAxCE6Q1NBRlrScCrH2nxaHzj6FD5dItpQFtXk1xoCLJkQAvD\\_BwE](https://snabhim.com.ua/gidrosulfat-natrija-him?gclid=CjwKCAjw7c2pBhAZEiwA88pOFxVTucvJUZOzrNjAxCE6Q1NBRlrScCrH2nxaHzj6FD5dItpQFtXk1xoCLJkQAvD_BwE)

129. Тіосульфат натрію. [Електронний ресурс]. Режим доступу:  
[https://mendeleev-shop.com.ua/p1030614208-tiosulfat-natriya-539.html?source=merchant\\_center&gclid=CjwKCAjw7c2pBhAZEiwA88pOF2amZpLa7bGm1IQfq4AmPrq1Y5OT4xB\\_M33rawiCnd5oELKZp83TSBoCZKsQAvD\\_BwE](https://mendeleev-shop.com.ua/p1030614208-tiosulfat-natriya-539.html?source=merchant_center&gclid=CjwKCAjw7c2pBhAZEiwA88pOF2amZpLa7bGm1IQfq4AmPrq1Y5OT4xB_M33rawiCnd5oELKZp83TSBoCZKsQAvD_BwE)

130. Піросульфїт Натрію. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://prom.ua/ua/p1693829346-pirosulfite-natriya-klebrig.html>
131. Концентрування в аналітичній хімії. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/3678/koncentruvannya-v-analitichnij-ximii>
132. Чистая соляная кислота 37%. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.products.pcc.eu/ru/id/1137766/cistaa-solanaa-kislota-37/>
133. Безконтактний радарний рівнемір LR01. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://altem.com.ua/uk/products/beskontaktnyy-radarnyy-urovner-ir01-275.html>
134. Кондуктометричний метод аналізу. [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://stud.com.ua/180291/ekologiya/konduktometricnij\\_metod\\_analizu](https://stud.com.ua/180291/ekologiya/konduktometricnij_metod_analizu)
135. Кондуктометр МАРК-603. [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://labdepo.com.ua/konduktometr-mark-603\\_ua](https://labdepo.com.ua/konduktometr-mark-603_ua)
136. Ваги нержавіючі для лабораторії ТВЕ-0,21-0,001-Н-а. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.avtoves.ua/ukr/catalog/laboratornyye-vesy/product.html?id=4531>
137. Вологомір RADWAG MA 210/Y/P - 15-00002. [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://chemtest.com.ua/ua/vlagomeri-radwag-ma\\_210yp-ua](https://chemtest.com.ua/ua/vlagomeri-radwag-ma_210yp-ua)
138. Folic Acid Injection. [Електронний ресурс]. Режим доступу: [http://ftp.uspbper.com/v29240/usp29nf24s0\\_m34240.html#usp29nf24s0\\_m34240](http://ftp.uspbper.com/v29240/usp29nf24s0_m34240.html#usp29nf24s0_m34240)
139. Shimadzu UV-1280-104-00008. [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://chemtest.com.ua/spektrofotometr\\_uv-1280](https://chemtest.com.ua/spektrofotometr_uv-1280)
140. Карлаш Ю.В., Красінько В.О. Основи проектування біотехнологічних виробництв: Навч. посібник. –К.:НУХТ, 2022. –373 с.
141. Поводзинський В.М. Основи проектування: Конспект лекцій для студ. спец. 6.092900 “Промислова біотехнологія” та 6.092902 “Біотехнологія біологічно активних речовин”, напряму 0929 “Біотехнологія” ден. форми навч. – К.: НУХТ, 2005.

142. Дезінфекція у медзакладі: види і методи. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://medplatforma.com.ua/article/497-vidi-y-metodi-dezinfektsii-v-zoz>

143. ВЕЛІДЕЗ. [Електронний ресурс]. Режим доступу: [http://www.xn--80aaolbmrsqje.com.ua/ua/catalog\\_item?attr\\_id=24056](http://www.xn--80aaolbmrsqje.com.ua/ua/catalog_item?attr_id=24056)

144. ЗАСІБ УНІВЕРСАЛЬНИЙ ДЛЯ ДЕЗІНФЕКЦІЇ «CD-АМІН», КОНЦЕНТРАТ 1Л. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.greenpax.com.ua/uk-ua/dezinfektanty/0111198-zasib-universalnyj-dlya-dezinfekciyi-cd-amin-koncentrat-1l>

145. ГИГАСЕПТ ИНСТРУ АФ U, 100 МЛ, 2Л. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://mudrakova.com.ua/magic/gigasept-instru-af-u-100-ml-2l/>

146. Ласепт форте 1 л. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://33korovy.in.ua/product/lasept-forte-1-l>

147. Септодор Форте, 1000 мл. [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://hlorka.in.ua/p610886216-septodor-forte-1000.html?utm\\_source=google.pm&utm\\_medium=cpc&utm\\_campaign=performance\\_max\\_ua&utm\\_content=&utm\\_term=&gad\\_source=1&gclid=CjwKCAiA-vOsBhAAEiwAIWR0TS2gKiu4-0MYFzMINTHfa0DZoFraYApIRUWJ1vbQTryZthFGJMKEDxoCxxv8QAvD\\_BwE](https://hlorka.in.ua/p610886216-septodor-forte-1000.html?utm_source=google.pm&utm_medium=cpc&utm_campaign=performance_max_ua&utm_content=&utm_term=&gad_source=1&gclid=CjwKCAiA-vOsBhAAEiwAIWR0TS2gKiu4-0MYFzMINTHfa0DZoFraYApIRUWJ1vbQTryZthFGJMKEDxoCxxv8QAvD_BwE)

148. Лізоформін 3000. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://biovet.ua/ua/dezinfitsiruushchee-sredstvo-lizoformin-3000/>

149. ДЕЗйод. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://prom.ua/p1648374360-deziod-dezinfitsiruyuschee-sredstvo.html>

150. Санойод. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://prom.ua/p1839166801-sanoiod.html>

151. Йодель. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://med1.ltd/tovary-medicinskogo-naznacheniya/dezinfekciya/yodel-11-78030.html>

152. Panja, A., Das, S., Chakraborty, A., Chakraborty, P., Pal, S., & Nandi, A. K. (2018). Injectable Hydrogel of Vitamin B9 for the Controlled Release of Both

Hydrophilic and Hydrophobic Anticancer Drugs. ChemMedChem, 13(22), 2427-2436.

<https://doi.org/10.1002/cmdc.201800562>

153. High Pressure Stainless Steel Chemical Reactor 3L 5L 1L/2L 500ml durable. [Электронный ресурс]. Режим доступа:

<https://www.aliexpress.us/item/3256803876558089.html?gatewayAdapt=glo2usa4itemAdapt>

154. СТЕРИЛЬНІСТЬ. [Электронный ресурс]. Режим доступа:

<https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/645/sterilnist>

155. Сухожаровой стерилизатор WX-12C NEW 5000 мл 1000 Вт. [Электронный ресурс]. Режим доступа:

[https://limonad.ua/suhozharovoy-sterilizator-wx-12s-new-5000-ml-1000-vt.html?gclid=CjwKCAiA-vOsBhAAEiwAIWR0TV7Oge9w-eT40tt\\_19YW3nFDxHWjzUzXQN-GU4etTE5fYmRiAi0uUBoCHkAQA\\_vD\\_BwE](https://limonad.ua/suhozharovoy-sterilizator-wx-12s-new-5000-ml-1000-vt.html?gclid=CjwKCAiA-vOsBhAAEiwAIWR0TV7Oge9w-eT40tt_19YW3nFDxHWjzUzXQN-GU4etTE5fYmRiAi0uUBoCHkAQA_vD_BwE)

156. PBM Series BFS Machine. [Электронный ресурс]. Режим доступа:

<https://www.shinvaglobal.com/01-pbm-series-bfs-machine-product/>

157. SEMI-AUTOMATIC INSPECTION MACHINE FOR AMPOULES, VIALS OR CARTRIDGES. [Электронный ресурс]. Режим доступа:

<https://www.cmp-pharma.it/sv.html>

158. BFS printing machine (маркировка BFS). [Электронный ресурс]. Режим доступа:

[https://inel.com/ru/b/\\_/4/43/bfs\\_blow\\_fill\\_seal\\_printing\\_machine/](https://inel.com/ru/b/_/4/43/bfs_blow_fill_seal_printing_machine/)

159. Автоматическая машина для упаковки ампул, картонных коробок. [Электронный ресурс]. Режим доступа:

[https://www.alibaba.com/product-detail/Automatic-Condom-Cartoning-Packing-Machine-Ampoule\\_62105491896.html](https://www.alibaba.com/product-detail/Automatic-Condom-Cartoning-Packing-Machine-Ampoule_62105491896.html)

160. AUTOMATIC CARTON PACKAGING MACHINE. [Электронный ресурс]. Режим доступа:

<https://kegelmachines.com/en/kegel-machines/145730-automatic-carton-packaging-machine-.html>