

**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 2022 р.

«До захисту допущено»
Завідувач кафедри
Віктор СТАБНИКОВ
(підпис) (ім'я та прізвище)

« » лютого 2022 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: Біотехнологічні особливості одержання імуностимуляторів
вуглеводної природи

Виконав: здобувач II курсу, групи 02

БАГАТИРЕНКО Дарія Миколаївна
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник: ТЕТЕРІНА Світлана Миколаївна
(прізвище, ім'я та по батькові повністю) (підпис)

Консультанти
(прізвище та ініціали) (підпис)
(прізвище та ініціали) (підпис)
(прізвище та ініціали) (підпис)

Рецензент Катерина ДВОРЩЕНКО
(ім'я та прізвище) (підпис)

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

Здобувач _____
(підпис)

Київ – 2022 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь магістр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

Освітньо-професійна програма «Фармацевтична біотехнологія»

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

біотехнології і мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ

“ 03 ” листопада 2021 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

БАГАТИРЕНКО Дарії Миколаївни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Біотехнологічні особливості одержання імуностимуляторів вуглеводної природи

керівник роботи ТЕТЕРІНА Світлана Миколаївна, к.т.н., доц.

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від “02” листопада 2021 року № 863-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 1 лютого 2022 року

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Saccharomyces cerevisiae*, цільовий продукт- β-глюкан

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) Огляд літературних даних, щодо біотехнологічних особливостей одержання імуностимуляторів вуглеводної природи; Техніко-економічне обґрунтування ; Обґрунтування вибору технологічної схеми біосинтезу субстанції β-глюкану та технологічної схеми виробництва ЛЗ; Опис технологічного процесу виробничого біосинтезу; Опис технологічного процесу виробництва ЛЗ

5. Перелік графічного матеріалу Апаратурна схема виробництва β-глюкану -4 аркуш формату А1, 1 аркуш формату А3. Технологічна схема виробництва β-глюкану -5 аркушів формату А1.

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 03 листопада 2021 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ п/п	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Огляд літературних даних, щодо біотехнологічних особливостей одержання імуностимуляторів вуглеводної природи	03.11.2021 – 15.11.2021	
2	Техніко-економічне обґрунтування	15.11.2021-24.11.2021	
3	Обґрунтування вибору технологічної схеми біосинтезу субстанції β-глюкану та технологічної схеми виробництва ЛЗ	24.11.2021-30.11.2021	
4	Опис технологічного процесу виробничого біосинтезу	30.11.2021-4.12.2021	
5	Опис технологічного процесу виробництва ЛЗ	4.12.2021-10.12.2021	
6	Оформлення пояснювальної записки	10.12.2021-01.02.2022	
7	Виконання графічної частини	10.12.2021-25.01.2022	

Здобувач _____
(підпис)

Дарія БАГАТИРЕНКО
(ім'я та прізвище)

Керівник роботи _____
(підпис)

Світлана ТЕТЕРІНА
(ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Дана кваліфікаційна магістерська робота, присвячена аналізу наукової літератури, щодо особливостей біотехнологічного одержання β -глюкану, а також практичного використання β -глюкану, зокрема у медицині, косметології, фармації та харчової промисловості, а також розробленню технологічної і апаратурної схем виробництва даного полісахариду β -глюкану культивуванням штамму *Saccharomyces cerevisiae TRTH11*, що синтезує 3,5 г/л β -глюкану за 48 годин на середовищі з глюкозою у якості джерела вуглецю, а також розробленню технології виробництва товарної форми β -глюкану, в капсулах. Розрахована потужність виробництва β -глюкану - 1235 кг/рік. β -глюкан використовують для виробництва лікарського препарату в капсулах задля лікування та профілактики імунodefіцитних станів.

Технологічний процес біосинтезу β -глюкану включає наступні допоміжні роботи: приготування і стерилізацію допоміжних розчинів; приготування та стерилізацію поживних середовищ), за тим технологічний процес (виращування посівного матеріалу на чотирьох етапах: а саме, в колбах на качалці, інокуляторах об'ємом 0,02;0,2;2м³, після чого виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 20 м³, відділення біомаси за допомогою таких процесів як: сепарування, концентрування, осадження, фільтрація, сушіння та подрібнення).

Особливості процесу культивування *Saccharomyces cerevisiae TRTH11*: температура 30°C, рН 5, швидкість перемішування - 3000 об/хв., швидкість подачі аераційного повітря - 2 л/хв., рівень розчинного кисню 40%, тривалість – 48 год.

Технологічна схема виробництва β -глюкану в даному випадку в капсулах включає допоміжні роботи: санітарна підготовка виробництва (підготовка персоналу, технологічного одягу, дезінфікуючих засобів, приміщень, обладнання), підготовка вентиляційного повітря, підготовка води очищеної, підготовка сировини), технологічний процес (підготовка маси для наповнення капсул, саме наповнення капсул), а також стадії пакування, маркування,

відвантаження (фасування капсул у флакони, пакування флаконів у картонні пачки та пакування пачок у групову тару).

Кваліфікаційна робота викладена на 184 сторінках друкованого тексту, містить у своєму складі 25 таблиць, 15 рисунків та складається зі вступу, 6 розділів, списку використаної літератури (120 джерел) і графічної частини (7 креслень формату A1, 1 креслення формату A3).

Ключові слова: *Saccharomyces cerevisiae*, β -глюкан, полісахарид, капсули, лікарський засіб, біосинтез.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	8
РОЗДІЛ 1. Виробництво імуностимуляторів за участі мікроорганізмів.....	9
РОЗДІЛ 2. Актуальні методи одержання β-глюкану.....	25
РОЗДІЛ 3.ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ.....	41
3.1.Передумови вирощування ЛЗ	41
3.1.1Аналіз фармакологічних властивостей цільового ЛЗ, галузей використання.....	43
3.1.2Обсяг ринку та очікувані темпи його розвитку.....	43
3.1.3Вибір форми випуску лікарського засобу.....	44
3.1.4Опис лікарського засобу згідно АНД	46
3.1.5Розрахунок річної потужності вирощування ЛЗ та кількості серій на рік.....	46
3.2Розрахунок потреби у субстанції для ЛЗ.....	48
3.2.1Перелік виробників кінцевого продукту і виробників (постачальників)субстанції.....	49
3.2.2Розрахунок річної потужності виробництва субстанції, об'єму ферментера та кількості виробничих ЛЗ.....	50
РОЗДІЛ 4. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ СУБСТАНЦІЇ β-ГЛЮКАНУ ТА ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА ЛЗ.....	55
4.1.Обґрунтування вибору біологічного агента, поживного середовища для його культивування.....	56
4.2.Обґрунтування вибору способу культивування та типу ферментера...57	
4.3.Обґрунтування стадій виділення і очищення субстанції для виробництва ЛЗ.....	59
4.4 Обґрунтування вибору класів чистоти виробничих приміщень виробництва ЛЗ	60

РОЗДІЛ 5. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ.....	133
5.1. Специфікація обладнання ділянки виробничого біосинтезу.....	135
5.2. Опис технологічної схеми ділянки виробничого біосинтезу.....	140
5.3. Контроль ділянки виробничого біосинтезу.....	159
РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ ВИРОБНИЦТВА ЛЗ.....	160
6.1. Специфікація обладнання ділянки виробництва ЛЗ.....	166
6.2. Опис технологічної схеми ділянки виробництва ЛЗ.....	169
6.3. Контроль ділянки виробництва ЛЗ.....	170
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	174

ВСТУП

Під імунною недостатністю (або імунодефіцитним станом, імунодефіцитом) розуміють вроджений або набутий дефект імунної системи, що виражається нездатністю організму чинити опір будь-яким інфекціям. Імунодефіцит характеризується зниженням кількості або активності імунокомпетентних клітин, зумовлених впливом як екзоантигенів, так і ендоантигенів. Наявність імунної недостатності клінічно характеризується тривалим перебігом запальних процесів, схильністю до їх рецидування, персистенцією інфекційних агентів[1-5].

У зв'язку із зростанням патології імунної системи населення, більшої значущості набувають імуно-коригуючі засоби. В області застосування нових імуномодуляторів відмічається повільний, але неухильний прогрес та відбувається помітне зрушення – перехід від використання препаратів, отриманих хімічним шляхом, в напрямку сполук природного походження або їх аналогів[3,4].

На сьогодні, в Україні досить гостро стоїть проблема погіршення стану здоров'я значної частини населення внаслідок порушення функціонування імунної системи[7,8].

До основних факторів зростання патології імунної системи слід віднести: екологічне забруднення, застосування вакцин і сироваток, стресові ситуації, зловживання алкоголем, куріння, застосування наркотиків, вірусні інвазії, в тому числі, ВІЛ-інфекція.

Імунна система що має забезпечувати генетичну постійність внутрішнього середовища організму, захист макроорганізму від екзогенних та ендогенних патогенів, унаслідок різноманітних причин може порушуватися її функція. Зниження функціональної активності основних компонентів імунної системи що спричинює порушення захисту організму від мікробів і

					НУХТ 02.02.01 БТЕК КР ПЗ						
Зм.	Арк	№ докум.	Підпис	Дата	Вступ			Літера	Аркуш	Аркушів	
Розробив.	Багатиренко Д.										
Консульт.									8	191	
Керівник	Тетеріна С.М							Кафедра БТМ ⁸			
Н. Контр.											
Зав.	Стабніков В.П										

супроводжується підвищеною інфекційною захворюваністю, нині розглядається як імунодефіцитний стан[9-36,38,49].

Особливо науковці приділяють увагу імуностимуляторам полісахаридної природи, крім того в наукових працях [18-26,28-37] описано, що саме полісахариди є найбезпечнішим класом імуностимуляторів (клас *generally recognized as safe (GRAS)*), що є найважливішим фактором для організму людини. Економічна ж доцільність використання мікробних полісахаридів визначається їхньою високою продуктивністю синтезу на дешевих субстратах. На відміну від хімічних полімерів (поліакриламід) мікробні полісахариди стійкі до температурної, окисної, механічної деструкції, і є нетоксичними, що робить екологічно безпечним їх застосування[21-33]. Мікробні полісахариди (β -глюкан, продигіозан, зимозан, курдлан і т.д) мають і ряд переваг порівняно з полісахаридами рослин, зокрема злакових культур. Так, ці біополімери можна отримувати в потрібних об'ємах незалежно від пори року і кліматичних умов[21-30].

Наразі широко відомі вітчизняні і закордонні біопрепарати на основі полісахаридів: "β-глюкан", "Імунсил", "Бета-іmun", "Бестатин", "Летинан", "Пірогенал", "ОРВІ Актив" і т.д, створені на основі різних штамів мікроорганізмів, а саме: *Bacillus thuringiensis*, *Candida albicans*, *Alcaligenes faecalis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Asprgilus niger*, *Streptomyces violaceus*, *Streptomyces lucensis*, *Aureobasidium pullulans*, *Euglena gracilis* і т.д [19-50].

β-глюкан – клас полісахаридів мономерів D-глюкози, з'єднаних за допомогою β-глікозидних зв'язків, відрізняються між собою молекулярною масою, тривимірною структурою. Його біологічна активність багатовекторна і залежить від багатьох факторів, перш за все, від типу і конфігурації зв'язків між складовими залишками цукрів, ступеня розгалуженості бічних ланцюгів біополімерів, молекулярної маси полісахаридів, розчинності у воді [1-4]. Найактивнішою в біологічному відношенні формою β-глюканів є β-1,3 / 1,6-глюкан, в молекулі якого глюкоза прив'язана до позицій 1 і 3, а також молекула має відгалуження в позиціях 1 і 6[1-3]. Саме даний тип β-глюканів міститься в

стінках дріжджів (*Saccharomyces cerevisiae*), що є найпростішим еукаріотичним організмом, в плані біологічного агенту[1-4].

Актуальність теми. Більшість патологічних станів людини зумовлено порушенням імунного статусу, у зв'язку з чим більшої значущості набувають імуно-коригуючі засоби, особливо природного походження. Особливий інтерес в цьому відношенні представляють β -1,3-1,6—глюкани, основними джерелами яких є дріжджі, представники яких використовуються як мультимодальні імуномодулятори біологічної активності організму людини при лікуванні онкологічних захворювань, гіпертонічної хвороби, для зниження рівня холестерину в крові, алергії, в профілактиці гіперглікемії при цукровому діабеті.

Новизною теми є використання для синтезу β -глюкану штаму *Saccharomyces cerevisiae* НІІЗ1[4], який у порівнянні з іншими продуцентами (*Euglena gracilis*(штам не вказаний)[5], *Streptomyces lucensis* ВКПМ Ас-1743[6] β -глюкану, здатен продукувати 3,5 г/л полісахариду, за 48 годин культивування. *Streptomyces lucensis*2,3-72 ВКПМ Ас-1743, *Euglena gracilis* продукують (2,3 та 8,35 г/л β -глюкану відповідно) за довший час (72 години,120 годин відповідно).

Крім того, перевагою продуцента *Saccharomyces cerevisiae* НІІЗ1, є простий склад поживного середовища[4] для його культивування, що робить найбільш економічно-вигідним виробництво β -глюкану. Аналіз даних, стосовно існуючих технологій виділення і очищення субстанції β -глюкану з подальшим розробленням найбільш раціональної технології отримання високоочищеного продукту. Надання β -глюкану товарної форми у вигляді капсул, як найбільш зручної та ефективної лікарської форми, що підтверджено науково -медициними джерелами[7-10,32-38].

Літературний огляд

Розділ 1. Виробництво імуностимуляторів за участі мікроорганізмів.

За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ) поширеність імунодефіцитних станів продовжує збільшуватися в усьому світі. За даними Українського науково-дослідного центру клінічної імунології та імунопрофілактики НАМН та МОЗ України кількість хворих з виявленими первинними генетично детермінованими імунодефіцитами становить близько 1% населення, станом на 2021 рік[8], 38% дорослого населення України та з них 10 % дітей, має серйозні порушення імунної системи, що в свою чергу тягне за собою ряд патологій[8].

З огляду на різноманіття факторів, які потенційно можуть призвести до дизфункції імунної системи, логічно припустити, що практично кожна людина протягом свого життя піддається тривалому впливу тих чи інших факторів і реальному ризику розвитку порушень імунного статусу. Таким чином, потенційною цільовою аудиторією для призначення імуномодуючої терапії або ж для профілактики імунодефіцитних станів є практично кожний українець[8].

Тому проблема розширення арсеналу таких лікарських засобів та подальше з'ясування відомостей про імуотропні властивості вже відомих речовин вважається неабияк актуальним питанням[9].

На сьогоднішній день багато дослідників вивчають можливості синтезу імуностимуляторів полісахаридної природи (зимозану, β -глюкану, продигіозану, декстану, курдлану та ін., за участю різноманітних мікроорганізмів (*Candida albicans*, *Alcaligenes faecalis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger*, *Streptomyces violaceus*, *Streptomyces lucensis*, *Aureobasidium pullulans*, *Euglena gracilis* і т.д)[19-54], як вже було згадано вище та підбір оптимальних комбінацій різних параметрів культивування продуцентів.

					НУХТ БТЕК 02.02.01 КР ПЗ			
Зм.	Арк	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив.	Багатиренко				Розділ 1. Виробництво імуностимуляторів за участі мікроорганізмів.	Літера	Аркуш	Аркушів
Консульт							11	191
Керівник	Тетеріна С.М					11 Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Зав.Кафедр	Стабніков В.П							

Оптимізація технології одержання мікробних полісахаридів повинна бути пов'язана з правильним вибором субстрату (зазвичай для одержання мікробних полісахаридів використовують вуглеводні субстрати) задля високої концентрації виходу кінцевого продукту [17-25].

1.1 Переваги застосування імуностимуляторів полісахаридної природи мікробного походження, як перспективних агентів для біотехнології.

Мікробні імуностимулятори полісахаридної природи мають здатність долати гематоенцефалітичний бар'єр на відміну від інших. Лікувальна або профілактична дія таких речовин має довготривалий ефект.

Імуностимулятори природнього походження, зокрема полісахаридної природи мають помірну модулюючу властивість. Мікробні імуностимулятори полісахаридного походження мають широкий спектр використання[15-22].

Авторами Rosy A. та Chorostowska-Wynimko J. [21] було описано загальну характеристику імуностимуляторів на основі бактеріальних лізатів (див. табл.1.1).

Таблиця 1.1

Характеристика імуностимуляторів бактеріальної природи

Назва препарату	Лікарська форма	Склад	Країна виробник
1	2	3	4
Бронхо-мунал	Капсули	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Streptococcus viridians</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i>	Словенія
Постеризан	Супозиторії	Інактивовані фенолом мікробні клітини <i>Escherichia coli</i>	Германія

1	2	3	4
Імудон	Капсули	<i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>Candida albicans</i>	Росія
Пірогенал	Ін'єкції, супозиторії	Ліпополісахарид (ЛПС), видалений із клітин <i>Salmonella typhi</i>	Росія
Продигіозан	Капсули	Ліпополісахарид <i>Pseudomonas. prodigiosum</i>	Росія
Рибомунал		<i>Klasiella. pneumonia</i> , <i>Str. pneumonia</i> , <i>Str. pyogenes</i> , <i>H. influenza</i>	Франція
Імунітет Форте		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Україна
Бета-Імун			США
Імундіале			
BETA GLUCANS			

Аналізуючи дані наведені у таблиці 1.1 можна зазначити, що виробництво імуностимуляторів мікробного походження переважає з-за кордоном. Тому актуальним на сьогодні є розробка та виробництво вітчизняного природнього імуностимулюючого засобу, зокрема полісахаридної природи.

Suarez N. разом зі співавторами [22] було описано методи лужного лізису клітинних стінок бактерій шляхом зміни рН до діапазону 11,5–12,5 для отримання природних імуномодуляторів (див. табл. 1.2).

Способи одержання бактеріальних лізатів

Метод лізису	Бактеріальний склад	Час лізису, хв	Температура лізису, °C	Метод очищення
1	2	3	4	5
NaOH (конц.) 0,01–1%	<i>Escherichia coli</i>	Декілька разів повторення (20-30 хв)	30 - 45	Ультрафільтрація Центрифугування
NaOH (конц.) 0,1–1,2 М	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus pneumoniae</i>	20-40	30 - 60	Центрифугування Фільтрація Ультрафільтрація
Ультразвук	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klasiella pneumoniae</i> , <i>Staphylococcus pneumoniae</i> , <i>Haemophilus influenzae</i>	20-30	55-65	Ліофілізація

Цікавою є також робота авторів Beini S., Shuang Y., Dongying Z., Sihan G., Xiaohua W[23], в даній статті описано полісахаридні ад'юванти, які наразі привертають велику увагу. Полісахаридні ад'юванти застосовують при виробництві нано-вакцин та нанопрепаратів, оскільки природні полісахариди володіють такими властивостями як: імуностимулювальна, біосумісність з іншими лікарськими засобами, біологічна доступність, і найголовніше – речовини полісахаридної природи є не токсичними. Автори у даній статті доводять, що різноманітні природні полісахариди мають кращий імунний стимулюючий ефект, і вони можуть посилювати ефекти гуморального та клітинних імунітетів. Автори описують методи включаючи наночастинки на основі хітозану (NPs), глюкану, маннози. Також було обговорено застосування та перспективи полісахаридів як ад'ювантів. Така інформація доводить той

факт, що й імуностимуляторам полісахаридної природи є місце на фармацевтичному ринку.

1.2 Найбільш перспективні імуностимулятори полісахаридної природи для використання у фармацевтичній промисловості.

Аналізуючи роботи вітчизняних та закордонних вчених за останні 10 років можна зробити висновок, що багато напрацювань пов'язані з методами створення імунобіотехнологічних препаратів, які є необхідними для корекції імунних дизфункцій. Препарати такої природи – виготовлені на основі первинних метаболітів мікроорганізмів, стимулюють переважно клітинний імунітет, а також підвищують кількість та функціональну активність макрофагів і лейкоцитів в організмі людини. Здатність таких засобів підвищувати загальну резистентність організму, прискорювати процеси регенерації стала підставою для їх широкого застосування в комплексній терапії імунодефіцитних станів, інфекційних та інфекційно-запальних захворювань, у разі в'ялого перебігу регенераційних процесів, з метою покращання імунного стану в онкологічних хворих при цитостатичній терапії.

Для усунення порушень описаних вище розглянемо деякі препарати природного походження, а також для порівняння, синтетичного походження наведені в *таблиці 1.3*[24,25].

Таблиця 1.3

Загальна характеристика імуностимуляторів

Групи імуностимуляторів (за походженням)	Підгрупа імуностимуляторів (за природою та хімічним складом)	Механізм дії Імуностимулятора	Протипоказання та побічні дії на організм імуностимуляторів певного типу	Використана література
Імуностимулятори бактеріального походження	Ліпополісахариди грамнегативних бактерій (продигіозан, пірогенал)	З переважним впливом на моноцити та макрофаги	Продигіозан: має високу пірогенність; здатен викликати лейкопенію. Пірогенал: здатен викликати сильну нудоту, лихоманку.	Ільїнська І.Ф, Копосова І.В, Ткаченко І.В. Загальна характеристика імуностимуляторів та їх характеристика. 2017.
Імуностимулятори дріжджового походження	Дріжджові полісахариди (декстрини, β-глюкани)	З переважним впливом на макрофаги, Т-лімфоцити.	Декстрини: здатен викликати артеріальну гіпотензію, алергічні реакції, лихоманку. Бета- глюкани: застосовувати в період вагітності та лактації тільки за дозволом лікаря.	
Імуностимулятори грибкового походження	Бестатин, глюкани, лентинан	З переважним впливом на макрофаги, Т-лімфоцити.	Бестатин: здатен викликати алергію, сильний набряк порожнини рота та обличчя. Лентинан не вживати дітям до 6-ти років, вагітність, період лактації.	
Синтетичні імуностимулятори	Похідні імідазолу (дибазол) Похідні піримідинів (пентоксіл)	З переважним впливом на Т-лімфоцити	Дибазол: не вживати дітям до 12 років, здатен викликати сильні алергічні реакції. Пентоксіл: здатен викликати запаморочення, алергію.	Козлов В.Н. Возможные направления в решении проблемы классификации иммуномодулирующих препаратов. Аллергология и иммунология. 2013, – 4(2):15-20.

Насамперед найголовнішим для лікарського засобу є відсутність побічних реакцій на організм людини при його прийомі, також варто звертати увагу на протипоказання. Якщо ж лікарський засіб заборонено споживати дітям до визначеного віку, це свідчить, що такий лікарський засіб не є зовсім безпечним для організму людини.

Із *таблиці 1.3* видно, що саме β -глюкан має найменше протипоказань до застосування, дозволений до вживання дітям. Це означає, що такий засіб може споживати практично кожна ланка населення.

У порівнянні препарат синтетичного походження (*див. таблицю 1.3*) дибазол має протипоказання для дітей віком до 12 років, а також ряд побічних дій, що говорить про небезпечність даного лікарського засобу.

Крім того багато робіт як вітчизняних так і іноземних вчених присвячені вивченню даного полісахариду. На його прикладі проаналізуємо той факт, що використання полісахаридів мікробного походження в препаратах імностимулювальної дії є доречнішим, в порівнянні з β -глюканом злакових культур.

Полісахарид акумулюється у вигляді β -1,3/1,6 зв'язку, в клітинних стінках дріжджів, актиноміцетах, грибах, а також злакових культур у вигляді β -1,3(без бічних ланцюгів) або β -1,4-зв'язку, проте ж, саме β -1,3/1,6 глюкан, здатний зв'язуватися з рецепторами макрофагів. Саме такий зв'язок викликає активацію макрофага, що укріплює вроджену імунну систему організму, в той же час зв'язок з β -1,3/1,6 глюканом стимулює вироблення макрофагами сигналів тривоги (цитокіни), які в свою чергу стимулюють клітини специфічної імунної системи, що було описано авторами в даній статті[25,26].

З точки зору біотехнологічного процесу, даний полісахаридний імностимулятор накопичується в стінках *Saccharomyces cerevisiae*, так як даний продуцент є достатньо вивченим еукаріотичними мікроорганізмами, наразі повністю розшифрований геном дріжджів, в літературі вітчизняних та закордонних вчених у повному доступі вказано оптимальні умови культивування дріжджів, зокрема вказано оптимальний склад поживного

середовища (в залежності від джерела вуглецю) для накопичення максимального цільового продукту, а також в статтях та патентах наведено багато поетапної інформації стосовно виділення полісахаридів із дріжджів різноманітними методами (зокрема модернізовані методи екстрагування) при чому таким чином, аби концентрація β -глюкану була на порядки збільшеною.

Науковцями Ahmad A.A., Anjum F.M., Zahoor T.N [27], було описано десять перспективних штамів дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*, це дослідження було проведено для скринінгу штаму з високим вмістом полісахариду β -глюкану.

Імуномодулюючу дію вибраного штаму полісахариду оцінювали на пацюках. Дослідження показало, що β -глюкан, виділений із клітин штаму *Saccharomyces cerevisiae* НІЗ1, змінює експресію досліджуваних цитокінів.

Вихід полісахариду із штаму TISTR5059 становив ($41,24 \pm 0,31\%$), TISTR5278 ($40,07 \pm 3,94\%$), максимальний загальний вміст β -глюкану було виділено з НІЗ1 ($41,69 \pm 3,96\%$), всі вищезгадані штами вирощували на поживному середовищі з глюкозою[4].

1.3 Молекулярні механізми взаємодії β -глюкану з макрофагами.

Цікавою працею є стаття закордонних науковців Frances M., Carmona E., Vishwajeet P., Richard E. [28], в якій описано, що найбільш активно в біологічному відношенні має форму β -1,3/1,6-глюкан, в молекулі якого глюкоза прив'язана до позицій 1 і 3, а також молекула відгалуження в позиціях 1 і 6, як зазначалося вище.

β -глюкан - не піддається ферментативної фрагментації в шлунково-кишковому тракті. Вони захоплюються клітинами слизової оболонки кишечника і активно переносяться в підслизовий шар, де активують макрофаги, а через них - лімфоцити, відповідальні за захист ендотелію, тобто за місцевий імунітет.

Завдяки механізму репопуляції активовані лімфоцити з слизової оболонки кишечника диссиминують в слизові оболонки різних органів, забезпечуючи, таким чином, їх захист від інфекції. Механізм дії β -1,3 / 1,6

глюкана в загальному вигляді може бути пояснений його вираженою селективністю відносно специфічних рецепторів (Dectin-1, Complement 3, Lactosylceramide і ін.) На поверхні макрофагів, що зв'язуються тільки з нерозгалуженим ділянкою молекули β -глюкана, в результаті чого відбувається активація макрофагів, що призводить до реалізації тригерних механізмів цілого ряду процесів, спрямованих на імунний захист організму[27-29]

З одного боку, активується фагоцитарна функція макрофагів, з іншого - починають посилено синтезуватися і вивільнятися такі речовини, як цитокіни (інтерлейкіни, інтерферон), які є сигналом для інших клітин імунної системи, наприклад Т-лімфоцитів, фактора росту епідермальних клітин, фактора ангіогенезу.

Частина β -глюканів з потоком крові через ворітну вену потрапляють в печінку, де захоплюються спеціальними клітинами, які у відповідь на взаємодію з полісахаридами виділяють цитокіни, що активують системний імунітет. Так, зокрема β -1,3 / 1,6-глюкан стимулює продукцію фактора некрозу пухлини, який, в свою чергу, активує моноцитарна систему імунітету.

Таким чином, β -глюкан активують як місцевий імунітет, забезпечуючи захист організму від вторгнень антигенів, так і системний імунітет, що призводить до знищення вже проник всередину організму чужорідного генетичного матеріалу і відновленню імунного гомеостазу. При цьому слід підкреслити відмінну рису імуностимулюючої дії β -1,3 / 1,6-глюкана, яка складається в адекватному підвищенні активності імунної системи без її надмірної стимуляції, що нерідко спричиняє виникнення аутоімунних захворювань[30-34].

Розділ 2. Актуальні методи одержання β -глюкану.

За останні 10 років досліджень вітчизняних та закордонних вчених особлива увага приділяється полісахариду β -глюкану, який відносно простий з точки зору біотехнологічного отримання, як вже було згадано вище та дуже ефективний продукт фармацевтичної промисловості.

Біологічна активність β -глюкану залежить від ряду факторів: розчинності полісахариду у воді, його молекулярної маси, типу і конфігурації глікозидних зв'язків між залишками моносахаридів, розгалуженості і конформації макромолекул [29-,36,37].

2.1 Біотехнологічні особливості одержання водорозчинної форми полісахариду β -глюкану.

У роботі [29] авторів Елінової Н.П, Кашкіної М.А. та Аркадьєвої Г.Е показано, що найбільшу протипухлинну активність проявляє $(1 \rightarrow 3) / (1 \rightarrow 6)$ - β -D-глюкан зі ступенем розгалуження від 0,20 до 0,33. Ступінь розгалуження β -глюкану дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* варіює в діапазоні значень 0,03-0,25, що доводить факт належного використання даного продуцента у медичних цілях.

β -глюкан є каркасним полісахаридом, він не розчиняється у воді, що зменшує ефективність його використання як біологічно активного інгредієнта, не даючи можливість реалізувати властивий йому потенціал, а саме протипухлинна та антибактеріальна дія, зростає зі збільшенням його розчинності. У зв'язку з цим застосовують різні прийоми для підвищення його розчинності, використовуючи біотехнологічну модифікацію [29].

Під поняттям розчинного β -глюкана розуміють не тільки його водорозчинні фрагменти, одержувані часткової фрагментацією макромолекули, а й різні похідні цього полісахариду[30].

					НУХТ БТЕК 02.02.01 КР ПЗ			
Зм.	Арк	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив.	Багатиренко				Розділ 2. Актуальні методи одержання β -глюкану.	Літера	Аркуш	Аркушів
Консульт							20	191
Керівник	Тетеріна С.М					20 Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Зав.Кафедр	Стабніков В.П							

У роботі [31] авторів Черно Н.К та Науменко К.І описано методи отримання сульфатованих, фосфорильованих похідних β -глюкана, що значно покращує його розчинність. Науковцями також описано, що в структурі β -глюкану *Saccharomyces cerevisiae*, виділеного пероксидним методом, присутні ділянки з різним ступенем упорядкованості. Обробка дріжджів розчинами H_2O_2 супроводжується деструкцією аморфних ділянок і збільшенням ступеня кристалічності препаратів β -глюкану в 2,6 – 3,3 рази в порівнянні зі стандартним зразком.

За допомогою ІЧ-спектроскопії вчені[32] довели, що водорозчинний β -глюкан характеризується більш упорядкованою структурою (індекс кристалічності 4,06), ніж вихідний нерозчинний (індекс кристалічності 2,55). У препараті водорозчинного β -глюкану, отриманого шляхом часткової ферментативної деструкції структурного β -глюкану, присутні молекулярні утворення у вигляді потрійних спіралей. У дослідях на тваринах встановлена ефективність дії отриманих препаратів β -глюкану як імуномодуляторів. Сукупність результатів дослідження структури препаратів та їх медико-біологічної оцінки можна розцінювати як аргумент, що підтверджує взаємозв'язок біологічної дії β -глюкану з наявністю потрійної спіралі в його структурі.

У статті [33], описано технологічні схеми виробництва препаратів β -глюкану дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*: структурного, водорозчинного і біомодифікованого.

Як вже згадувалось в попередніх підрозділах, за структурою макромолекул β -глюкани різного походження, дещо відрізняються. Полісахариди злакових культур мають лінійну будову. До складу їхніх макромолекул входять блочні фрагменти, які розділені між собою β -1,3 зв'язками, а їх співвідношення є варіабельним. На відміну від таких β -1-4/1,3-глюкани, в деяких видах грибів, як макро-так і мікроскопічних, дріжджах, бактеріях знайдено бета-1,3/1,6-глюкани розгалуженої будови, які відрізняються розміром бічних ланцюгів і ступенем розгалуження. Багатьма

дослідженнями доведено, що бета-1,3/1,6-глюкани мають більш виражену фізіологічну дію та ширший спектр фізіологічних ефектів. Причому прояв останніх залежить від низки факторів, зокрема розчинності глюкану та його молекулярної маси [34,35].

Певною “вадою” β -глюкану є його нерозчинність у воді або рідинах з фізіологічними значеннями рН. У праці [26], описано, що найбільш виражена імуностимулююча дія притаманна водорозчинному β -глюкану з молекулярною масою 1-30 кДа, а тим паче якщо даний продукт буде використовуватись у фармацевтичній промисловості. Це в свою чергу спонукає до пошуку способів перетворення β - глюкану у розчинну воду.

Авторами Черно Н.К, Коваленко О.В, Шапкіна К.І [33], описано отримання водорозчинного полісахариду через ряд чисельних операцій. В статті описано послідовність деструкції клітинних стінок в даному випадку дріжджів, для цього дріжджі обробляли розчинами кислот та лугів після чого залучали до автоклавування. Отриманий в результаті β - глюкан містив 90,3 % полісахаридної складової. За цим для переведу β -глюкану у водорозчинну форму використовували нестандартний препарат ферментного походження Excel AP, що володіє ендо-1,3- β -глюконазною активністю при встановлених параметрах.

Для визначення молекулярно-масового розподілу продуктів гідролізу застосовували гель-хроматографію на колонці з сефадексом G-50. А вміст вуглеводу визначали за допомогою антронового методу. Найвищий вихід (95% маси вихідного полісахариду) водорозчинної фракції має місце при наступних параметрах ферментолізу: концентрація ферменту – 0,25 мг/см³, співвідношення E:S=1:15 і тривалість процесу -72 години. В свою чергу вихід водорозчинної фракції при тривалості обробки 24 год стандартного β -глюкану складає біля 50 %. Не можна не звернути увагу на працю[34], в якій описано аналогічно отримання водорозчинної форми за рахунок гідролізу мінеральних кислот, при цьому максимальний вихід цільової фракції не перевищував 57,7 %.

Авторами Черно Н.К, Озоліна С.О[35], було апробовано схему виділення полісахариду з макроскопічних грибів. В її основу було покладено послідовне екстрагування сировини різними реагентами з підвищеною температурою, що сприяють розщепленню лабільних зв'язків між біополімерами. Висушену подрібнену масу грибів *Pleurotus ostreatus* знежирювали хлороформом, гексаном в апараті Сокслета залишок висушували. Спирто-розчинні сполуки видаляли екстракцією 70-% вим розчином етанолу. Після чого додаткового екстаргували водою і отримували 52,7% масову частку вуглеводної складової від загального вмісту сухих речовин в об'єднаній водорозчинній фракції, проте при цьому у складі були присутні домішки, тоді водний екстракт підкислюють оцтовою кислотою до рН-5,0. Даний прийом дозволив підвищити масову частку вуглеводів у складі сухих речовин супернатанту в 1,3 рази [35].

2.2 Шляхи підвищення синтезу β -глюкану

Автори Шарова Н.Ю, Манжиева Б.С описали у своїй роботі [6], динаміку біосинтезу β -глюкану різними мікроорганізмами *Aspergillus niger*, *Streptomyces lucensis* и *Streptomyces violaceus* в процесі їх культивування на різних за складом середовищах, таким чином оптимізували синтез полісахариду з метою підвищення виходу бета-глюкану (див. табл.2.4).

Таблиця 2.4

Порівняльна характеристика біологічних агентів для синтезу β -глюкану на різних ростових субстратах [6].

Штам продуцент	Джерело Вуглецю	Вміст розчиненої форми β -глюкану в рідкій фракції гідролізату біомаси, %	Концентрація біомаси
<i>Aspergillus niger</i> ВКПМ F-41	Меляса	16	6
<i>Aspergillus niger</i> ВКПМ F-41	Гідролізат кукурудзяного крохмалю	36	9
<i>Streptomyces violaceus</i> ВКПМ Ас-1734		23	0,51
<i>Streptomyces lucensis</i> ВКПМ Ас-1734		17	0,19
<i>Streptomyces lucensis</i> ВКПМ Ас-1734	Сахароза	43	0,38
<i>Streptomyces violaceus</i> ВКПМ Ас-1734		31	0,72

Із *таблиці 2.4* видно, що вміст β -глюкану у 2 рази вищий при культивуванні штаму *Aspergillus niger* ВКПМ F-171[6] на середовищі з гідролізатом кукурудзяного крохмалю, ніж на середовищі з мелясою (по вмісту розчиненої форми β -глюкану в рідкій фракції гідролізату біомаси). Щодо штамів *Streptomyces lucensis* ВКПМ Ас-1743 та *Streptomyces violaceus* ВКПМ Ас-1734 виявлена пряма залежність кількості виходу β -глюкану від природи субстрату, на гідролізаті з кукурудзяним крохмалом вихід якого на 2 порядки нижчий, ніж на середовищі з сахарозою.

Можна відмітити, що найбільший вміст накопичення цільового продукту здійснюється за допомогою продуцента *Streptomyces lucensis* ВКПМ Ас-1734, на поживному середовищі з джерелом вуглецю - сахарозою [6].

Авторами Черно Н. К, Станкевич Г.Н. в статті [30], було проведено порівняння приросту біомаси дріжджів в режимі безперервного перемішування і в режимі періодичного перемішування (85 об/хв через протягом 10 хв, кожні 2 години). Концентрація клітин *Saccharomyces cerevisiae* при безперервному перемішуванні на кінець культивування становить на 40 % більше, ніж при періодичному перемішуванні.

Крім того перехід із логарифмічної фази до фази уповільнення росту в обох зразках відбувається практично в один і той же час (20-21 годину), але в першому випадку із-за проявленням ефекту Кребтрі концентрація становить 140 млн. кл/мл, в той же час як в культурі з періодичним перемішуванням – 80 млн. кл/мл.

Великий інтерес викликає праця вітчизняного вченого Мокроснопа В.М [5]. В його роботі описано продукування полісахариду β -глюкану мікроводоростю *Euglena gracilis*, що показує той факт- полісахарид акумулюється в багатьох мікроорганізмах різної природи, є достатньо вивченим та доступним. В статті проаналізовано пряму залежність виходу концентрації цільового продукту в залежності від компонентів поживного середовища та типу живлення культури (див.табл.2.5).

Накопичення β -глюкану в клітинах *E. gracilis* в залежності від типу живлення культури [5].

Тип живлення	Концентрація β -глюкану, г/л	Біомаса, г/л	Масова доля β -глюкану в біомасі, %
Автотрофний	0,6	3	20
Фотогетеротрофний	3	7	42,9
Гетеротрофний	9	12,2	73,8

Примітка:*В якості органічного субстрату використовують глюкозу- 22 г/л.

Рівень накопичення біомаси і біохімічний склад клітин *E. gracilis* істотно залежать від способу вирощування мікроводорості також як і активність системи синтезу полісахариду та акумуляція його гранул в клітинах. В оптимальних умовах вміст полісахариду може досягати 70% сухої біомаси клітин *E. gracilis*. Тому оптимізація складу поживного середовища має важливе значення при використанні *E.gracilis* в якості продуцента β -глюкану, оскільки дозволяє значно підвищити рентабельність біотехнологічного процесу[5].

Дослідження накопичення гранул полісахариду в залежності від умов освітлення показали, що при цілодобовому освітленні культур *E. gracilis* в їх клітинах формуються тільки дуже маленькі гранули полісахариду, на відміну від культур, культивованих при періодичному освітленні.

Формуванню більших зерен полісахариду в клітинах сприяло вирощування культури в темряві.

При гетеротрофну культивуванні *E. gracilis* можна отримати в 6 разів більше запасного полісахариду, ніж при фотоавтотрофному. Було встановлено, що рН поживного середовища впливає на накопичення біомаси. З його збільшенням від 3 до 7 лінійно зменшується вихід біомаси і концентрація β -глюкану.

Гетеротрофне культивування *E. gracilis* з використанням глюкози в якості екзогенного джерела вуглецю є найефективнішим способом досягнення високого виходу полісахариду.

При фотогетеротрофному культивуванні *E.gracilis* в присутності глюкози спостерігається майже дворазове зниження виходу біомаси та полісахариду (табл. 2.2). Автотрофне культивування *E. gracilis* не розглядається при створенні оптимальних умов для накопичення полісахариду, оскільки не забезпечує накопичення ні великих кількостей біомаси, ні полісахариду в клітинах. При фотоавтотрофному культивуванні тільки невелика кількість надлишкової енергії запасається у вигляді полісахариду, і рівень біосинтезу β -глюкану зростає зі збільшенням інтенсивності світла в оптимальних межах.

Дослідження показали, що мікроводорість *Euglena gracilis* може бути перспективним продуцентом, цінного для людини полісахариду- β -глюкану. Найбільше накопичення його, головним чином, залежить від таких умов культивування клітин *E. gracilis*, як:

- ☐ вирощування культури в темряві;
- ☐ використання глюкози в якості органічного субстрату;
- ☐ внесення додатково джерел азоту (глютамату натрію, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$).

Можливо також використання побічних продуктів виробництва для підживлення *E. gracilis* з метою отримання біомаси, збагаченої полісахаридом[5].

Ще однією працею на яку слід звернути увагу є стаття авторів Степаненко Р.Н, Новіков Е.М, Козирева О.В [32], в якій поетапно описано виділення розчиненої полісахариду β -глюкану із плодового тіла гриба *Lentinus edodes* за допомогою ферментативної екстракції, фракціонування здійснювали на колонці з Sepharose 6В, в ході чого була виділена полісахаридна фракція з молекулярною масою 500-2000 кДа[32].

Аналізуючи закордонну літературу охарактеризуємо біологічних агентів та найвищу концентрацію β -глюкану у вигляді таблиці 2.6.

Характеристика біологічних агентів та продуктів їх біосинтезу (імуностимуляторів).

Назва біологічного агента	Назва продукту біосинтезу	Вміст полісахариду в біомасі, г/л	Джерело інформації
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> HII31	β-глюкан	3,5	Man Z., Xin J. β-Glucan from <i>Saccharomyces cerevisiae</i> induces SBD-1 production in ovine ruminal epithelial cells via the Dectin-1-Syk-NF-κB signaling pathway. 2019, 53:304-315.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> TISTR5059		3,0	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> TISTR5278		2,9	
<i>Aureobasidium pullulans</i> NRRL 58012		1,5	Ashokkumar S., Myoungjin K., Hyeong Chul J., Keun K. Strain Selection and Optimization of Mixed Culture Conditions for <i>Lactobacillus pentosus</i> K1-23 with Antibacterial Activity and <i>Aureobasidium pullulans</i> NRRL 58012 Producing Immune-Enhancing β-Glucan. <i>J Microbiol Biotechnol.</i> 2018, 28(5):697-706.
<i>Alcaligenes faecalis</i>		2,2	Jun L., Jiqing T., Xiuting L., Qiaojuan Y., Junwen M., Zhengqiang J. Curdlan (<i>Alcaligenes faecalis</i>) (1→3)-β-d-Glucan Oligosaccharides Drive M1 Phenotype Polarization in Murine Bone Marrow-Derived Macrophages via Activation of MAPKs and NF-κB Pathways. 2019, 24(23).
<i>Candida albicans</i>		2,7	Kapteyn J.C., Montijn R.C., Dijkgraaf G.J., Klis F.M. Identification of beta-1,6-glucosylated cell wall proteins in yeast and hyphal forms of <i>Candida albicans</i> . <i>J Cell Biol.</i> 2010, 65(2), page 402-407.

Аналізуючи *таблицю 2.6* бачимо, що серед вказаних біологічних агентів β -глюкану провідне місце займає штам *Saccharomyces cerevisiae* НІІЗ.

Серед продуцентів β -глюкану закордонні науковці також виділяють перспективний продуцент *Alcaligenes faecalis* [36], проте концентрація екзополісахариду становила на порядки менше концентрації *Saccharomyces cerevisiae* НІІЗ1.

Групою науковців Картейн J.C, Montijn R.C, Dijkgraaf G.J., Klis F.M [37], було описано оптимальні умови культивування *Candida albicans*, та вказано, що культивування даної культури повинно проходити не більше 20 діб на поживному середовищі агар Сабуро, оскільки в такому випадку втрачаються антигенні властивості та її культивування стає недоцільним[37].

Крім цього неабиякий інтерес викликає дослідження групи закордонних вчених Ashokkumar Sekar, Myoungjin Kim, Hyeong Chul Jeong, Keun Kim [38], в праці яких описано методи оптимізації змішаних умов культивування *Lactobacillus pentosus* K1-23 з антибактеріальною активністю та *Aureobasidium pullulans* NRRL 58012, що також продукують β -глюкан.

Серед 13 штамів *Aureobasidium spp.*, науковці [38] виділяють саме *A. pullulans* NRRL 58012 який продукує найбільшу кількість β -глюкану ($1,5 \pm 0,07\%$). В статті визначено оптимальні умови культивування для твердофазної змішаної культури, крім цього вказано, що додавання 0,5% кукурудзяного екстракту та 0,1% FeSO_4 до базального середовища призводить до значного збільшення виробництва цільового β -глюкану.

В статтях [39,40,41] описано методи генної інженерії, що дозволяють значно збільшити накопичення β -глюкану. В статті[40], показано, що надмірна експресія Pgm2 (фосфоглюкомутаза) та Rho1 (GTPase для активації синтезу глюкану) значно збільшує накопичення β -глюкану. Після подальшої оптимізації умов культури вміст β -глюкану збільшується на 53,1% [40].

2.3 Особливості виділення цільового полісахариду з клітинних стінок дріжджів

Виділення β -глюкану[40-45]: В статті[4], яку вже було згадано вище описано виділення β -глюкану за допомогою екстракції. Клітини дріжджів піддавали чотирьом різним кислотно-лужним екстракціям, використовуючі наступні комбінації кислот та основ:

1. NaOH/ HCl (E1);
2. NaOH/ CH₃COOH (E2);
3. NaOH/ NaClO (E3);
4. NaOH і NaClO/ DMSO (E4).

В статті показано, що саме поєднання сильної основи (NaOH) та слабкої кислоти (CH₃COOH) дав найкращий результат екстракції. Склад екстрактів був досягнутий за допомогою FT-IR аналізу [4].

В результаті кислотно-лужної екстракції отримували виділений β -глюкану з вищою концентрацією цільового продукту, аніж в біомасі дріжджів(див. табл.2.6).

Таблиця 2.6

Порівняльна характеристика штамів продуцентів полісахариду β -глюкану [4].

Назва біологічного агенту	Вміст полісахариду в біомасі, %	Концентрація цільового продукту після кислотно/основної екстракції, %
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> НП31	41,69	48,70
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> TISTR5059	41,24	52,59
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> TISTR5278	40,07	45,08

З таблиці 2.6 видно, що концентрація полісахариду β -глюкану, значно збільшилась після проведення кислотно-основної екстракції. Концентрація цільового продукту після проведення кислотно-основної екстракції збільшилася на порядок порівняно із вмістом полісахариду у біомасі *Saccharomyces cerevisiae* НІЗ1 і *Saccharomyces cerevisiae* TISTR5278 та приблизно у 1,5 рази порівняно із вмістом полісахариду у біомасі *Saccharomyces cerevisiae* TISTR5059.

Наступною роботою на яку слід звернути увагу аналізуючи закордонну літературу є стаття [45] авторів *Albershein P, Nevis DJ, English P D, Karr A. A*, в якій було описано дезінтеграцію клітин дріжджів за допомогою сучасних методів- із застосуванням пероксиду водню з концентрацією 24 % , фізичного методу- за допомогою ультразвуку (із частотою понад 30 кГц/с), а також деструкцію клітинних структур за рахунок СВЧ-обробки. Для того, аби виділити β -глюкан із дріжджів у вигляді цілих частинок (WGP), клітини дріжджів науковці витримували в цитрат-фосфатному буфері при рН-5,5, за цим клітинну масу обробляють NaOH (концентрація 0,1-10 н)[45].

Дослідниками було описано, що для додаткової очистки застосовують ферменти. Кінцевий продукт являє собою порошок, частинки якого мають сферичну форму (діаметром 2-4 мкм)[45].

Тонева-Давидова Е.Г у своїй статті [46] описує методи дезінтеграції клітинних стінок дріжджів *Pichia membranifaciens* вирощених на середовищі з вмістом етанолу та мінеральних солей, задля отримання цільового продукту β -глюкану. Описані поетапні методи очищення полісахариду з клітинних стінок дріжджів з метою отримання в подальшому готового продукту, який містив би 78 % β -глюкану з виходом до 10 % від ваги вихідної маси дріжджів.

В статті Marika L.[47], описано пероксидний метод отримання β -глюкану. За допомогою даного методу полісахарид має більш високий ступінь впорядкованості структури, що є наслідком деструкції аморфних ділянок макромолекул під впливом гідроген пероксиду, та проявляє ряд функціонально-

фізіологічних властивостей, притаманних харчовим волокнам, – високу ентеросорбційну здатність та виражений біфідогенний ефект [47].

У статті [48], встановлено, що отримати β - глюкану, який не містить супутні сполуки, можливо обробкою сировини 24% розчином H_2O_2 при масовому співвідношенні дріжджі - розчин пероксиду водню 1: 2 і тривалості обробки 300 хвилин. Вихід - 8,1%, вміст глюкана 97,3%, білок при цьому відсутній.

У статті [49], автори Vassileios Varelas, Maria Liouni показали, що β - глюкан був виділений з різних біологічних джерел, грибів, водоростей, рослин та бактерій. Клітинна стінка дріжджів містить відповідну мішень для екстракції та очищення β -глюкану. Хоча існують різні методи екстракції, спостерігаються суттєві відмінності, оскільки застосовувана техніка впливає на кінцевий урожай та чистоту, молекулярну масу, біологічну активність, розчинність, якість та інші біологічні та функціональні властивості екстрагованого β -глюкану. Метою цього огляду є оцінка різних методів екстракції для отримання β -глюкану з біомаси дріжджів. Крім того, обговорюється використання відходів відпрацьованих промислових дріжджів з броварень та виноробної промисловості для біотехнологічного виробництва β - глюкану та концепція зелених виноробних підприємств та пивоварних підприємств[49].

В статті [50], автори порівнюють методи лізису для отримання лізатів дріжджів за допомогою автолізу, плазмолізу (етилацетат 1,5%) та ферментативного гідролізу (алкалаза 0,2%). Ефективність кожного процесу порівнювали за вмістом розчинної твердої речовини та білка, моніторингом лізису клітин та вивільненням внутрішньоклітинних матеріалів, життєздатністю клітин та мікроскопічним аналізом. Результати показали, що плазмоліз етилацетатом виявився більш ефективним порівняно з автолізом, з більшим відновленням вмісту дріжджового екстракту (YE). Для порівняння, вміст виділених твердих речовин та білків був вищим під час ферментативного гідролізу з використанням алкалази порівняно з процедурами автолізу та

плазмолізу. Найбільше зменшення оптичної щільності на 600 нм спостерігалось для гідролізованих клітин. Крім того, ми визначили "Ступінь витоку (DL)" як новий показник процесу лізису, посилаючись на відсоток загального вивільнення білків із клітин, і він оцінювався приблизно до 65,8%, що є відповідним показником лізису клітин.

В статтях [50-54], також описано біотехнологічний потенціал в максимальній очистці цільового продукту для подальшого його залучення у фармацевтичній промисловості.

Висновок: Отже, в сучасних умовах не виникає сумнівів щодо актуальності розроблення біотехнології одержання β -глюкану в Україні. Оскільки, за інформацією більшості з розглянутих літературних джерел, застосування даного полісахариду в складі терапії аутоімунних захворювань достовірно покращує прогноз захворювання та має стимулюючу дію на всі ланки гуморального і клітинного імунітету. Слід також зауважити, що в якості біологічного агенту для синтезу β -глюкану найбільш перспективно застосовувати *Saccharomyces cerevisiae*.

Технологічна частина

Розділ 3. Техніко-економічне обґрунтування випуску субстанції для лікарського засобу(ЛЗ) та виробництва готової форми ЛЗ.

3.1 Передумови виробництва β -глюкану.

Імунодефіцит характеризується зниженням кількості або активності імунокомпетентних клітин, зумовлених впливом як екзоантигенів, так і ендоантигенів. Імунна недостатність характеризується появою клінічних проявів порушень функцій імунної системи, пов'язаних з реалізацією чужорідними антигенами своїх патогенних властивостей. Наявність імунної недостатності клінічно характеризується кволим перебігом запальних процесів, схильністю до їх рецидування, персистенцією інфекційних агентів[2].

Імунна недостатність може бути відносною, якщо кількість і якість антигенної агресії перевищує функціональні можливості імунної системи, та абсолютною при зниженні функціональних можливостей імунної системи у імунокомпроментованих осіб (імунодефіцит). Також, головними причинами розвитку імунодефіцитних станів є надмірне фізичне та моральне навантаження при сьогоdnішньому вимушеному ритмі життя. Тривала дія стресових факторів, виснаження голодуванням і тяжкою працею призводять до дистрофічних змін у лімфоїдних органах з посиленням їхньої інволюції, з розвитком транзиторних імунних порушень, на тлі чого розвивається:

- 1) важкий атиповий перебіг бактеріальних, грибкових, вірусних інфекцій, ураження найпростішими, гельмінтами з частими рецидивами, недостатньою ефективністю проведеної терапії;
- 2) збільшення кількості неоплазій;
- 3) індукція розвитку аутоімунних хвороб [2].

					НУХТ БТЕК 02.02.01 КР ПЗ			
Зм.	Арк	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив	Багатиренко				Розділ. 3 ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБґРУНТУВАННЯ	Літера.	Аркуш	Аркушів
Консульт.							32	191
Керівник.	Тетеріна С.М					34 Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Зав.Кафедр	Стабніков В.П							

У результаті надпорогових рівнів факторів описаних вище, що виходять за межі, при яких можлива адаптація, підвищується синтез АКТГ передньою часткою гіпофізу, стероїдів наднирковими залозами, адреналіну при активації симпато-адреналової системи. Це поступово призводить до порушень роботи імунної, ендокринної, нервової, серцевосудинної систем. В імунній системі швидше відбуваються інволютивні процеси, через що з'являються структурні зміни в лімфоїдних органах. Поступово зменшується кількість функціонально активної кількості лімфоїдних клітин у лімфатичних вузлах, селезінці, тимусі, знижуються гемопоетичні функції кісткового мозку [2].

Наприклад, у шлунковокишковому тракті на одиницю площини слизової оболонки меншає функціонально активних пейєрових бляшок та солітарних фолікулів, враховуючи ще значну кількість харчових домішок у раціоні. Однією з патогенетичних ланок є зменшення абсолютної та відносної кількості лімфоцитів. Функціональна активність лімфоцитів також зменшується, відбувається імуносупресивний ефект. Якщо антигени мікробного, вірусного, грибкового походження потрапляють до організму на тлі надпорогової дії стресорних факторів, то пригнічується первинна і вторинна імунна відповідь при зниженні також і ефекторної функції NK-клітин та Т-л з цитотоксичною функцією [2].

Нині досягнення експериментальної та клінічної імунології, молекулярної біології та фармакології зумовили бурхливий розвиток нової галузі науки – імунофармакології, яка займається розробкою і вивченням імунотропних засобів, причому, особливо привертають увагу препарати природного походження[2].

Аналізуючи наукову літературу [1-3], пов'язану з інформацією про порушення імунної системи та імуностимуляторів, які є незамінною терапією при вказаних станах, можна зробити висновок, що речовини вуглеводневої природи є практично цінними біотехнологічними продуктами, які чинять імунокорегуючу дію на організм при цьому без будь-якої шкоди. Економічна доцільність використання саме мікробних полісахаридів визначається їхньою

високою продуктивністю синтезу на дешевих субстратах. На відміну від хімічних полімерів (поліакриламід) мікробні полісахариди стійкі до температурної, окисної, механічної деструкції, і є нетоксичними, що робить екологічно безпечним їх застосування. Мікробні імуностимулятори полісахаридної природи мають здатність долати гематоенцефалітичний бар'єр на відміну від інших. Лікувальна або профілактична дія таких речовин має довготривалий ефект. Імуностимулятори природнього походження, зокрема полісахаридної природи мають помірну модулюючу властивість. Мікробні імуностимулятори полісахаридного походження мають широкий спектр використання, як зазначалося вище [1-3].

Головною перевагою β -глюкана порівняно з іншими імуностимуляторами полягає в тому, що даний полісахариди активізує імунну систему, але не викликає надмірної імунної реакції, яка може сприяти розвитку аутоімунних захворювань [3].

На сьогодні потреба у β -глюкані в Україні задовольняється виключно за рахунок його імпорту, що визначає актуальність розробки вітчизняних технологій, тому розробка, виробництво та розширення арсеналу імуностимуляторів вуглеводневої природи в Україні (з повним циклом виробництва) є досить актуальним питанням.

3.1.1. Аналіз фармакологічних властивостей β -глюкану, галузей використання. Фармакологічні властивості β -глюкану

Біологічна активність β -глюкану залежить від ряду факторів: розчинності полісахариду у воді, його молекулярної маси, типу і конфігурації глікозидних зв'язків між залишками моносахаридів, розгалуженості і конформації макромолекул [30].

Найбільшу протипухлинну активність проявляє $(1 \rightarrow 3) / (1 \rightarrow 6)$ - β -D-глюкан зі ступенем розгалуження від 0,20 до 0,33. Наприклад, ступінь розгалуження β -глюкану дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* варіює в діапазоні значень 0,03-0,25, що доводить факт належного використання даного продуцента у медичних цілях.

Найбільш виражена імуностимулююча дія притаманна водорозчинному β -глюкану з молекулярною масою 1-30 кДа, а тим більше якщо даний продукт буде використовуватись у фармацевтичній промисловості. Це в свою чергу спонукає до пошуку способів перетворення β -глюкану у розчинну форму.

У зв'язку з цим застосовують різні прийоми для підвищення його розчинності, використовуючи біотехнологічну модифікацію [30].

Під поняттям розчинного β -глюкана розуміється не тільки його водорозчинні фрагменти, одержувані часткової фрагментацією макромолекули, а й різні похідні цього полісахариду[30].

Водорозчинний β -глюкан характеризується більш упорядкованою структурою (індекс кристалічності 4,06), ніж вихідний нерозчинний (індекс кристалічності 2,55). У препараті водорозчинного β -глюкану, який отримують шляхом часткової ферментативної деструкції структурного β -глюкану, присутні молекулярні утворення у вигляді потрійних спіралей. Причому у дослідах на тваринах встановлена ефективність дії отриманих препаратів β -глюкану як імуностимуляторів. Сукупність результатів дослідження структури препаратів та їх медико-біологічної оцінки можна розцінювати як аргумент, що підтверджує взаємозв'язок біологічної дії β -глюкану з наявністю потрійної спіралі в його структурі. Полісахарид характеризується протизапальними властивостями (інгібує синтез цитокінів – інтерлейкінів-6 та -12) та посилює синтез інтерферону. Таким чином, вказаний полісахарид активує, як місцевий імунітет, забезпечуючи першу лінію захисту організму людини від мікроорганізмів, так і системний імунітет, що призводить до знищення патогенів при їх потраплянні в організм[30].

Використання у медицині.

Активаторами макрофагів можуть виступати речовини різної хімічної структури і походження: ендотоксини, віруси, бактерії. Однак їх використання далеко не завжди є високоефективним і безпечним щодо ускладнень проведеної терапії, а клас β -глюканів, навпаки - безпечні, в тому числі і в токсикологічному відношенні (клас *generally recognized as safe* (GRAS) відповідно до класифікації

Food and Drug Administration (FDA), США, 2001), їх вживання можливе як при ентеральному, так і при парентеральному застосуванні, а також інтерназальному, ректальному [55].

Ця фармакокінетична особливість β -глюкану і обумовлює їх широке застосування в медичній практиці [55]. Крім того в результаті застосування β -глюкану, нейтралізуються запальні процеси, підвищується стійкість організму до інфекційних захворювань.

Прийом β -глюкану сприяє підвищенню в'язкості їжі, що надходить до організму, а це запобігає всмоктуванню жовчних солей. Втрачаючи частину цих солей, організм починає заповнювати запаси холестерину, який залишився, що і призводить до зниження його рівня в організмі в цілому.

Крім того, розчинні волокна β -глюкану формують товстий в'язкий гель в кишечнику, стимулюючи відчуття ситості і допомагаючи природному контролю ваги [55].

Згідно інструкції до застосування імуностимулятора полісахаридної будови β -глюкану на прикладі “Бета-імуно”[56]: рекомендовано дорослим для нормалізації функціонального стану імунної системи при гострих та хронічних інфекційних та запальних захворюваннях: кишкових інфекціях, гострих респіраторно-вірусних інфекцій захворюваннях печінки різної етіології (у т.ч. вірусних гепатитах В і С), запальних захворюваннях верхніх та нижніх дихальних шляхів (у т.ч. ларингофарингітах, бронхітах, пневмоніях), захворюваннях уrogenітального тракту (цистит, пієлонефрит, вагініт, генітальний герпес, цитомегаловірусна інфекція, хламідіоз, мікоплазмоз); інших запальних захворюваннях (рецидивуючий герпес, хронічний фурункульоз) та при гіперпроліферативних станах. А також для загального зміцнення організму (особливо при фізичних навантаженнях та стресі) та попередження розвитку запальних процесів[56].

Сироп “Вітаглюкан” рекомендований дітям віком від 3-х років і дорослим для підтримки оптимальної роботи імунної системи у період

поширення застудних захворювань, а також при незбалансованому харчуванні, зниженні апетиту, хронічній втомі.

Виходячи із вищесказаного можна зробити висновок, що полісахарид має широкий спектр позитивної дії на організм, що котрий раз доводить його значущість використання на фармацевтичному ринку, крім того призначення препарату, яке дозволяється до вживання дітям є вагомою рисою, що вкотре доводить його безпечність[57].

Використання у косметичній промисловості.

β -глюкановий комплекс активує імунну систему шкіри. β -глюкан має здатність активізувати клітини Лангерганса за імітаційним принципом. β -1,3-глюкан має структуру, вихідну за структурою оболонок бактеріальних клітин - тому рецептори клітин Лангерганса реагують на β -1,3-глюкан як бактерію, представляючи небезпеку, при цьому активізуються, починаючи синтезувати та вивільняти цілий ряд регуляторних молекул:

- цитокіни (інтерлейкини, інтерферони);
- фактор росту епідермальних клітин - стимуляція колагену та еластину;
- фактор ангіогенезу - відповідає за формування та зміцнення кровоносних капілярних судин.

β -глюкан широко застосовується в сучасній косметичній індустрії при виробництві препаратів зовнішнього застосування. Його популярність здебільшого обумовлена широким застосуванням корисної дії і цілим рядом корисних властивостей.

Косметичне використання нерозчинної форми зокрема у пудрах. Косметичне застосування водорозчинної форми зокрема у кремах, сироватках, лосьйонах для обличчя при запальних захворювань шкіри. Представляючи собою потужний антиоксидант, він ефективно захищає шкіру від передчасного старіння або успішно бореться з вже наявними ознаками старіння шкіри.

Отже, основні косметичні властивості β -глюкану у складі лікувальної косметики:

- *потужний антиоксидант;

- *захисна дія;
- *участь у синтезі гіалуронової кислоти (зволоження шкіри);
- *протизапальний ефект;
- *профілактика і лікування лупи (при застосуванні даного полісахариду у складі лікувальних шампунів;
- *зміцнення волосяних цибулин, відновлення цілісності волосяного стрижня [58].

Використання у харчовій промисловості.

β-глюкан є інгредієнтом, який застосовують в харчових продуктах для зниження рівня холестерину в крові, зменшення глікемічного індексу вуглеводмісних харчових продуктів, для стимулювання здоров'я травної системи, для збагачення організму харчовими волокнами.

Полісахарид володіє сильними згущуючими, вологозв'язуючими, емульгуючими і жиरोімітуючими властивостями. β-глюкан здатний утворювати гелі, стабілізувати кремоподібні емульсії, створювати гладку текстуру і чудові смакові відчуття в продуктах. Крім того, при застосуванні даного полісахариду значно подовжується термін зберігання продуктів завдяки ж своїм вологозв'язуючим властивостям.

Цікавим є поєднання β-глюкану і мальтоолігосахариду запатентовано компанією “Beta Trim” (Skidmore Sales and Distributing Inc., USA) [59].

Харчова добавка під назвою “Oatrim” з вмістом β-глюкану – має жироподібну текстуру та може бути використаний у якості заміни жиру, містить одну калорію на грам в порівнянні з дев'ятьма для жиру, однак імітує зовнішній вигляд і смак більшості жирних продуктів.

Велика кількість харчових підприємств застосовують β-глюкан в якості харчової добавки, зокрема, до м'яса, молочних продуктів, заморожених десертів, салатних заправок, майонезу, соусів, супів та маргарину[59].

3.1.2 Обсяг ринку та очікувані темпи його розвитку

В основу фармацевтичного виробництва покладено широке використання машин, апаратів, потокових механізованих і автоматизованих ліній.

Особливістю виробництва будь-якого лікарського засобу є профілізація його в межах галузі, тобто створення спеціалізованих підприємств з випуску обмеженої кількості типів продукції.

Спеціалізація підприємств дозволяє сконцентрувати увагу на розробці і впровадженні у виробництво новітніх досягнень науки і практики та удосконалювати якість продукції.

Виробництво лікарських засобів з імуностимулюючим ефектом у всьому світі постійно розвивається і щорічно зростає більш як на 10% [60]. Щороку на світовий ринок надходить від 35 до 61 нових препаратів [60]. Такому стану речей сприяють значні капіталовкладення у науково-дослідні й дослідно-конструкторські роботи які, у середньому складають 12,6-19,2 % від вартості такої продукції, що випускається.

Ринок полісахаридів, які використовуються в медицині був оцінений в 11 мільйонів доларів США в 2019 році і, за прогнозами, досягне збільшення прибутку вже до 2027 року при середньорічному темпі зростання 70% протягом прогнозованого періоду [60].

3.1.3 Вибір форми випуску лікарського засобу.

На підставі аналізу фармацевтичного ринку України лікарських препаратів імуномодулюючої дії, [61-64] можна виділити перспективну тверду дозовану лікарську форму-капсули, що переважають в даному сегменті препаратів.

β -глюкан, випускається в різних товарних формах, зокрема, таблетках, капсулах, супозиторіях, сироплах, назальних краплях.

На фармацевтичному ринку України представлені такі препарати з вмістом діючої речовини β -глюкану: капсули "Бета-іммун", "Імунсил", "Beta glucans" Solgar, "Beta glucans" Now, "Beta glucans" Jarrow Formulas, сироп "Віта-глюкан", супозиторії "Майтаке", назальні краплі "ОРВІ АКТИВ"[57,65-74].

Згідно з дослідженнями, більшість пацієнтів вважає, що капсули, завдяки їх спеціально гладким оболонкам, значно легше ковтати, на відміну від

таблеток. Крім того матеріал самої капсули повністю виключає контакт між субстанцією і порожниною рота людини, що усуває смак і запах характерний β-глюкану. Що в свою чергу підвищує лікувальний ефект від призначеної терапії[75]. Також капсули можуть бути виготовлені з чистої глянцевої оболонки, привабливого для споживача кольору, що покращує і естетичне сприйняття даної лікарської форми. Однією з ключових переваг твердих лікарських форм є те, що вони дають можливість розробки препаратів з уповільненим вивільненням, що технічно складніше при рідких лікарських формах.

Тверді пероральні лікарські форми, такі як таблетки та капсули, можуть забезпечити переваги більшої стабільності, точності дозування та покращеної транспортабельності над рідкими лікарськими формами. Смак препарату рідко буває проблемою при застосуванні плівки та/або цукрового покриття, що використовуються для покращення смакових якостей.

Якщо ж порівнювати тверду лікарську форму-капсули, наприклад з сиропами (рідкою лікарською формою), останні мають здатність до процесу засахарювання, так як містять в своєму складі цукор, як консервант, перед використанням обов'язково потрібно струшувати тару із сиропом для правильного розподілення діючої речовини у суспензії, що є не досить зручним у використанні, рідкі лікарські форми потребують для їх споживання додатково- мірного посуду аби відміряти точну порцію препарату для прийому [75].

Вживання β-глюкану передбачається не тільки дорослими споживачами, а й дітьми, у разі додаткових труднощів при ковтанні деякі педіатричні капсули передбачають можливість відкриття і змішування їх вмісту з улюбленою їжею, соком, молоком, при чому не порушуючи прямі властивості β-глюкану.

Існує і ряд переваг капсул, як лікарської форми з точки зору забезпечення біодоступності препарату, оскільки вони найбільш ефективно підходять для форм негайного вивільнення діючої речовини.

Одним з найважливіших переваг капсул є простота їх використання, яке не вимагає від пацієнта будь-яких спеціальних навичок (в порівнянні з ін'єкціями). Капсули можуть бути використані протягом всього процесу дослідження ефективності лікарського препарату (як в дослідях на тваринах, так і в клінічних дослідженнях), без необхідності переведення їх в іншу форму для прийому пацієнтами[75].

Незважаючи на меншу рентабельність виробництва капсул в порівнянні з таблетками, дана лікарська форма все ще володіє відносно низькою собівартістю і забезпечує високу стабільність інкапсульованого β -глюкану[38].

Капсули досить прості для розробки їх технології виробництва, оскільки основною вимогою для матеріалу інкапсулята є тільки забезпечення однорідності дозування, що дозволяє виробникам швидше виводити нові продукти на ринок. З точки зору маркетингу капсули як лікарська форма надають виробнику великі можливості використання широкого спектру кольорів, різних розмірів, нанесення ідентифікаційних написів і логотипів, які сприяють підвищенню впізнаваності бренду серед пацієнтів[75].

Щодо, супозиторій, біодоступність β -глюкану може бути не стійкою. Затримка супозиторіїв у товстій кишці особливо у дітей, може бути проблематичним явищем.

Назальні краплі: всмоктування активних речовин, призначених для місцевої дії, може призвести до системних небажаних ефектів, подразнення слизової оболонки лікарським препаратом може бути болючим або викликати «нежить», набряк слизової оболонки носа[75].

Отже, аналізуючи вище сказане, можна зробити висновок, що капсульована форма β -глюкану має ряд переваг перед іншими товарними формами, а саме привабливий зовнішній вигляд, точність дозування, захист лікарських речовин від впливу світла, повітря та вологи внаслідок твердої оболонки капсул, що забезпечує достатню герметичність, здатність швидко набухати, розчинятися й всмоктуватися у шлунково-кишковому тракті.

3.1.4 Опис лікарського засобу згідно АНД (проект АНД).

Таблиця 3.7

Загальна характеристика β -глюкану (див. табл. 3.7)

Назва:	β -глюкан
Лікарська форма:	Капсули
Форма випуску:	Капсули тверді, кислотостійкі №30
Діючі речовини:	1 тверда капсула містить 250 мг β -глюкану
Допоміжні речовини:	магнію стеарат, целюлоза мікрокристалічна, крохмаль картопляний.
Фармакологічна група:	Дієтична добавка-Імуностимулятори
Показання до застосування:	Профілактика та лікування імунодефіцитних станів, знижує ризик захворювання вірусних та респіраторних хвороб завдяки активації місцевого та системного імунітету, перешкоджає виникненню ускладнень хвороб та сприяє прискоренню одужання.
Побічна дія:	Незначне підвищення температури тіла при прийомі, відчуття спраги.
Протипоказання:	Індивідуальна непереносимість компонентів препарату, вагітність і лактація.
Взаємодія з іншими лікарськими засобами:	Не можна приймати з препаратами, що містять у складі отрути рослин або після укусів комах, змій і ін., а також під час використання анестезії.
Особливості застосування:	Застосування препарату не впливає на здатність керувати автотранспортом або іншими механізмами (не містить в своєму складі алкоголь).
Умови та термін зберігання:	Зберігати в сухому, захищеному від світла місці при температурі + 15-25°C. Термін придатності 2,5 року.

Лікарська форма: Капсули.

Форма випуску: Капсули з твердою оболонкою, кислотостійкі.

Діючі речовини: 250 мг β -глюкану, **допоміжні речовини**- магнію стеарат, целюлоза мікрокристалічна, крохмаль картопляний.

Фармакологічна група: Дієтична добавка-Імуностимулятори.

Показання до застосування: Профілактика та лікування імунодефіцитних станів, знижує ризик захворювання вірусних та респіраторних хвороб завдяки активації місцевого та системного імунітету, перешкоджає виникненню ускладнень хвороб та сприяє прискоренню одужання.

А також, рекомендується дорослим та дітям для нормалізації функціонального стану імунної системи при гострих і хронічних інфекційних і запальних захворюваннях: кишкових інфекціях, захворюваннях верхніх, а також нижніх дихальних шляхів, захворюваннях урогенітального тракту (а саме, цистит, пієлонефрит, вагініт, герпес, цитомегаловірусна інфекція, хламідіоз, мікоплазмоз) та інших запальних захворюваннях (рецидивуючий герпес, хронічний фурункульоз) і при гіперпроліферативних состояниях.

Побічна дія: Незначне підвищення температури тіла при прийомі, відчуття спраги.

Протипоказання: Індивідуальна непереносимість компонентів препарату, вагітність і лактація.

Взаємодія з іншими лікарськими засобами: Не можна приймати з препаратами, що містять у складі отрути рослин або після укусів комах, змій і ін., а також під час використання анестезії.

Умови та термін зберігання: Зберігати в сухому, місцях позбавлених світла, при температурі + 15-25°C. Термін придатності 2,5 року.

Специфікація на імуностимулятор вуглеводневої природи β -глюкан

Найменування показника	Допустимі межі	Методи контролю
Опис	Капсули з твердою оболонкою, повинні мати гладку поверхню, без ушкоджень та видимих включень, з вмістом пористої маси від білого або білого з жовтуватим відтінком кольору.	За п.1, візуально.
Ідентифікація β-глюкану	На ІЧ спектрі зразку присутня смуга поглинання при 890 см^{-1} , яка характерна для β -конфігурації глікозидних зв'язків.	Методом ІЧ спектроскопії
Ступінь чистоти	Вміст β -глюкану, коливається в межах 82,6 до 97,3 %.	
Однорідність маси	Припустиме відхилення повинно не перевищувати 10% якщо середня маса- 300 мг.	ДФУ 2.9.5
Однорідність вмісту	Препарат може витримувати випробування, якщо ж вміст не більше ніж, в одній одиниці і виходить за межі (85-115%) та в жодній одиниці, не виходить за межі 75-125% від вже середнього вмісту у самому препараті.	ДФУ 2.9.6
Розпадання	Тверді, а також м'які капсули повинні витримувати випробування на розпадання капсул.	п. 2.9.1 ДФУ, с.151
Мікробіологічна чистота вмісту капсули	В 1 г загальна кількість життєздатних аеробних м/о повинна не перевищувати 10^3 бактерій і 10^2 грибів (пліснявих, а також дріжджових сумарно). Не повинні містити бактерій родин <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Pseudomonas aureginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> .	До вимог ДФУ "Мікробіологічна чистота Лікарських засобів" 5.1.4
Пірогени	Має бути апірогенним.	За п.8 ДФУ 2.6.8
Аномальна токсичність	Не має бути токсичним.	За п.9 ДФУ 2.6.9
Однорідність маси	Має витримувати вимоги ДФУ.	ДФУ 2.9.5
Кількісне визначення	Відхилення у вмісті діючих речовин мають бути при дозуванні менше 1 мг (+ 15%), від 1 мг до 10мг($\pm 10\%$), і від 100 мг і вище (+ 5 %).	ДФУ 2.2. 29
Упаковка і маркування	Капсули мають бути упаковані в щільно закритих упаковках, яка захищає від дії вологи та дії світла.	За ДФУ

Зберігання	Зберігати в сухому, а також захищеному від дії світла місцях при температурі + 15-25°C. Термін зберігання- 2,5 років.	За інструкцією по використанню
-------------------	--	--------------------------------

Методи контролю

1. Опис.

Капсули з твердою оболонкою, з вмістом пористої маси від білого або білого з жовтуватим відтінком кольору.

2. Ідентифікація.

Визначення β -глюкану проводять методом ІЧ спектроскопії. Вміст β -глюкану в препараті характеризували смугами поглинання. Частота поглинання β -1,3 звязків β -глюкану 890 см^{-1} .

3. Мікробіологічна чистота.

В 1 г загальна кількість життєздатних аеробних м/о необхідно бути не більше 10^3 бактерій і 10^2 грибів (пліснявих і дріжджових сумарно).

Щодо допоміжних речовин-не більше $1 \cdot 10^4$ життєздатних м/о, у т.ч не більше $1 \cdot 10^2$ грибів в 1 г.

Не повинні містити бактерій родин *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aureginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*.

Згідно ДФУ 2.6.12

Розчиняють (зазвичай в співвідношенні 1:10) продукт, який випробують в забуференном розчині натрій хлориду та пептона рН 7,0, в фосфатному буферному розчині рН 7,2 або ж в бульйоні на основі гідролізату казеїну та соєвих бобів. При необхідності доводять до рН 6-8. Подальші ж розведення, при необхідності, готують за допомогою цього ж розчинника.

Метод найімовірнішого числа.

Всі пробірки інкубують в діапазоні температури 30-35 ° С протягом 3-5 днів. При необхідності ж пересівають, використовуючи відповідний спосіб. Для кожного рівня розведення записують число пробірок, в яких і виявляється мікробне зростання. Визначають найбільш ймовірне число мікроорганізмів в грамі цього досліджуваного продукту.

Методом підрахунку на чашках Петрі.

Для кожного ж середовища готують не менше двох чашок Петрі, для кожного рівня розведень. Чашки з агаризованому середовищем на основі гідролізату казеїну і соєвих бобів інкубують при температурі 30-35 ° С протягом 3-5 днів, а чашки з декстрозних агаром Сабуро при температурі 20-25 ° С протягом 5-7 днів. Відбирають дані чашки, відповідні рівню розведення з максимальною кількістю колоній менш 250 аи визначити загальну кількість аеробів (ОКА) та менше 50 для визначення загальної кількості грибів (ОКГ). Після чого розраховують середнє арифметичне значення числа колоній і визначають КУО в грамі або випробуваного препарату.

Мембранна фільтрація.

Для визначення загальної кількості аеробів, один з мембранних фільтрів переносять на поверхню агаризованого середовища на основі- гідролізату казеїну та соєвих бобів. Для визначення загальної кількості грбів (ОКГ) переносять інший мембранний фільтр вже на поверхню декстрозних агару Сабуро. Чашки ж, з агаризованим середовищем на основі гідролізату казеїну та соєвих бобів інкубують вже при температурі 30-35 ° С, протягом 3-5 днів, а чашки, які з декстрозних агаром Сабуро при температурі 20-25 ° С, протягом 5-7 днів.

Розраховують вміст КУО в грамі або мілілітрі досліджуваного препарату.

3.1.5 Розрахунок річної потужності виробництва ЛЗ та кількості серій на рік.

Річна потужність біосинтезу β -глюкану складає 1235 кг (1235000 г).

Вміст β -глюкану в 1 капсулі становить- 500 мг (0,5 г). Таким чином, на рік необхідно виготовити $1235000/0,5=2470000$ капсул.

Як правило, продуктивність апаратів для наповнення капсул складає 25000 капсул на годину. Прийmemo ж час роботи -8 годин, машини для наповнення капсул. Тоді, за один повний цикл наповнюється- $25000*8=200000$ капсул. Отже, кількість серій на рік складе- $2470000/200000=13$ серій.

3.2 Розрахунок потреби у субстанції для випуску ЛЗ.

Вікова інволюція органів імунної системи починається вже в підлітковому віці. Зменшується маса лімфоїдної тканини органів імунітету. Поступово активна лімфоїдна тканина заміщується жировою. Кількість лімфоїдних (пейєрових) бляшок у стінці тонкої кишки в юнацькому віці (17-21 років) порівняно з підлітковим(12-16 років) зменшується на 15%, а в 22-35 років – на 27% [76].

Площина розташування пейєрових бляшок у слизовій оболонці тонкого кишечника у віці 25-35 років зменшена більш як удвічі порівняно з немовлятами.

Маса лімфоїдної тканини у селезінці, представленій імунокомпетентною білою пульпою від дитячого (4-7 років) до юнацького віку[77], зменшується приблизно на третину, а в 22-25 років – більш ніж наполовину.

Подібна картина спостерігається і в інших органах імунної системи. На тлі цього природного явища суттєво знижуються захисні можливості імунної системи людей похилого віку і старців. Суттєві зміни виникають і в кістковому мозку[76].

В трубчастих кістках у віці 20-25 років червоний кістковий мозок практично повністю заміщується жировою тканиною, таким чином у порожнинах кісток жирові клітини складають до 50% об'єму кісткового мозку [76].

При порушенні імунної системи, як наслідок в організмі зменшується кількість лімфоїдної тканини або порушення взаємодії макрофагів, лімфоцитів, плазматичних та інших клітин, секреції цитокінів. Швидка і глибока інволюція імунної системи спостерігається при дії шкідливих факторів навколишнього середовища, шкідливих звичок (паління, надмірного вживання алкоголю), зловживання їжею, що містить численні харчові домішки. При цьому швидко зменшується кількість лімфоїдної тканини в органах імунної системи, порушуються функції імунокомпетентних клітин, виникають структурні дефекти у ланках імунної системи.

Поширеність імунодефіцитного стану загалом оцінюється в діапазоні від 1:25 000 до 1:50 000 [76]. В Європі та Північній Америці поширеність цієї хвороби коливається в межах від 1:10 000 до 1:50 000 населення. За даними загальнонаціонального дослідження в США поширеність даної хвороби складає 1:42 000 населення. Серед представників азійського походження та афроамериканців імунодефіцитний стан зустрічається рідше [76].

В Україні, за різними оцінками середній вік початку клінічних проявів припадає на друге десятиліття [76]. Але ж є і випадки імунодефіцитного стану у дітей, дуже висока чутливість дітей до вірусних інфекцій у віці 28 днів життя, 4-6 місяців, 2 роки, 4-6 років, 12-15 років, що є доведеним аргументом [77]. Діти відрізняються дуже високою чутливістю до респіраторно- вірусних інфекцій, аденовірусів, кишкових інфекцій, дисбактеріозу, алергічних реакцій, а також таких хвороб як коклюш, кір. А у діапазоні 12-15 років на фоні розвитку збільшення секреції статевих стероїдів зменшується об'єм лімфоїдних органів.

Зокрема, у віці до 15 років виявляють близько 10% людей, які мають порушення з боку імунної системи за даними [77].

Гіподіагностика є головним ризиком для хворих у зв'язку з тим, що профілактика і контроль за розвитком ускладнень безпосередньо залежить від ранньої діагностики та вчасно розпочатого адекватного лікування [76].

В Україні вчасно діагностується лише 50% від очікуваних 13 випадків, з яких, 95% випадків хворих діагностуються тільки після 5 років від початку

клінічних проявів. Ці дані додатково вказують на недостатній рівень діагностики, проте навіть дана ситуація зустрічається і у Великобританії. Переважну більшість препаратів імностимулювального характеру призначають для лікування імунодефіцитного стану хімічного походження, фармацевти відпускають за рецептом, проте, неконтрольоване застосування таких сильнодіючих засобів може призвести до розладів функціонування організму в цілому, зокрема, такі ЛЗ мають ряд серйозних побічних реакцій[76].

На перевагу β -глюкан- засіб, який є повністю натуральним компонентом. Дозволений до застосування дітям, як вже згадувалося вище, відпуск препаратів з активним інгредієнтом - β -глюкан з аптечного пункту здійснюється фармацевтами без рецепту[78].

Проаналізувавши інформацію наведену вище прийmemo за потенційних споживачів β -глюкану, з метою терапії або профілактики імунодефіцитного стану діапазон людей молодше 15 років та людей старше 15 років.

Згідно даних Українського науково-дослідного центру клінічної імунології та імунопрофілактики НАМН, частка всього населення України становить 38 % [77], з них 10 % мають порушення з боку імунної системи діти, як згадувалося вище.

При чому за даними Департаменту ООН України в області демографічної і соціальної статистики кількість населення України молодше 15 років становить 6003963 осіб, кількість населення старше 15 років і молодше 65 років -30942832 осіб, та людей старше 65 років-6756535 осіб[77].

Таким чином частка 28 % осіб, які мають порушення з боку імунної системи від категорій населення України старше 15 років (всього 37699367 осіб-28%) становить 1346406 осіб, щодо людей молодше 15 років (всього 6003963 осіб-10% частка) становить 600396 осіб.

Проте ж, деяка кількість людей старше 15 років (37699367 осіб), які входять в частку 28% хворих взагалі не звертаються до лікаря та не приймають ніякої лікувальної терапії, або ж приймають препарати хімічної природи, чи аналоги розрекламованих марок як правило іноземного

походження і т.д, тоді оцінемо споживачів вітчизняного β -глюкану у частку 10 % (1346406-10% становить 134641 осіб).

Така ж ситуація стосується і категорії молодше 15 років, батьки яких також у багатьох випадках звертають увагу на лікувальну терапію розрекламованих марок різноманітних імуностимулюючих препаратів, аналогів, відмовляються від профілактичної терапії лікарських засобів та біологічних добавок. Тоді, прийемо також частку 10 % споживачів вітчизняного β -глюкану молодше 15 років, тоді (600396 осіб -10 % становить 60040 осіб)

Способи застосування препарату β -глюкан та дози в терапії імунодефіцитного стану для дорослих на прикладі препарату “Beta glucan” Ulife згідно інструкції : 1000 мг на добу, одноразово перед їжею [56].

Способи застосування препарату β -глюкан та дози з метою профілактики для дорослих : 500-1000 мг на добу, перед їжею за 30 хвилин[56].

Способи застосування препарату β -глюкан та дози з метою профілактики для дітей на прикладі препарату “Віта-глюкан” Sperco згідно інструкції: 500 мг на добу, розподіливши таку дозу на 2 прийоми на добу[57].

Курс профілактики або ж лікування імунодефіциту становить 4 тижні.

За необхідністю його можна повторити через- 4 тижні. Протягом року курс лікування рекомендується повторити 3 рази (див.*табл.1.2*) [56-57].

Вихідні дані для розрахунку річної потреби в β-глюкані.

Категорія населення	Доза препарату на добу, мг	Тривалість прийому разом із повторним курсом, днів на рік	Кількість препарату на 1 людину (в г) за курс	Кількість людей, яка прийматиме вітчизняний β-глюкан, осіб	Загальна кількість препарату на всіх хворих, кг
Люди, які мають порушення імунітету, або ж профілактика населення для унеможливлення імунодефіцитного стану.	1000мг	90 днів	90	134641	12117,6
Діти, з метою лікування або ж профілактики	500 мг	90 днів	45	60040	2701,8
Разом 14819,4 кг					

3.2.1 Перелік виробників кінцевого продукту і виробників (постачальників) субстанції.

Ринок імуностимулюючих вже готових лікарських засобів полісахаридного походження (β-глюкану) на ринку України представлений в основному американською продукцією, на їх частку припадає понад 50% наявних імуностимулюючих препаратів (див. табл. 1.1)

Найменшу ж частку має Італія, вона представлена всього 3,57% від загальної кількості імуностимуляторів на ринку.

Щодо України, то Компанія ООО "Новалік-Фарм" є виробником лікарського засобу "Бета-іmunну", проте поставка субстанції для розробки даного лікарського засобу імпортується із Китаю, а вже в Україні виробники надають препарату лікарську форму, після чого фасують[71].

Таблиця 3.10

Перелік фірм-виробників препаратів з діючою речовиною β -глюкан

Країна виробник	Фірма-виробник	Назва препарату	Література
Іспанія	Sperco	“Вітаглюкан”	[57].
США	Puritan's Pride	“Beta Glucans”	[65].
	Swanson	“Beta Glucans”	[66].
	Solgar	“Beta Glucans”	[67].
	Jarrow Formulas	“Beta Glucans”	[68].
	Now	“Beta Glucans”	[69].
Казахстан	Ulife	“Beta Glucans”	[70].
Україна	ООО “Новалик-Фарм”	“Бета-імун”	[71].
Австрія	SANWEZZA	“Beta Glucans”	[72].
Германія	Wellmune	“Beta Glucans”	[73].
Італія	Abbott	“OPBI Актив”	[74].
Росія	Bimedcal	“Пеноксал”	[80].

Потужними країнами виробниками субстанції β -глюкану полісахаридного походження, які в подальшому будуть застосовуватися у фармацевтичній промисловості і на теперішній час входять до Market Report 2021 є :

- Азіатсько-Тихоокеанський регіон (В'єтнам, Китай, Малайзія, Японія, Філіппіні, Корея, Таїланд, Індія, Індонезія и Австралія).
- США
- Європа (Турція, Германія, Великобританія, Італія, Франція и т. д.).

Основними ж країнами, з яких відбуваються поставки на український ринок субстанції є Китай (сумарно близько 60% від усього імпорту субстанції), на меншу частку припадає Словачія, Індія та Японія (сумарно 40%).

Найпопулярнішими фірмами-виробниками субстанції китайського виробництва є Greentech, Undersun, Wuling biotech, Vigorous, Newgen Bio, a

також японського виробництва- компанія Adeka та словацьке виробництво- компанія Natures [78].

3.2.2 Розрахунок річної потужності виробництва субстанції, об'єму ферментера та кількості виробничих циклів.

Субстанцію β -глюкану на території України не виробляють, її імпортується переважно із Китаю. Компанія ООО "Новалік-Фарм" займається виробництвом препарату "Бета- імунн", проте завданням компанії є надання лікарської форми та фасування вже готової субстанції ввезеної із закордону, як вже було сказано раніше. На перевагу іноземний товар має високу ціну тому як уже зазначалось, виробництво вітчизняної субстанції є перспективним напрямком та є необхідною умовою для впровадження цільових програм імпортозаміщення.

Як вже було описано раніше, в попередніх підрозділах - частка імпортерів виробників складає 1/12 частину, тоді розрахуємо річну потребу з урахуванням тенденцій ринку України (див. *табл. 3.11*)

Таблиця 3.11

Розрахунок річної потужності імуностимулятора з урахуванням тенденцій ринку України

Категорія населення, Лікування/профілактика	Кількість препарату на 1 людину (в г) за курс	Кількість людей, яка прийматиме вітчизняний β- глюкан, осіб	Загальна кількість бета-глюкану на рік при охопленні ринку на 1/12 частину, кг
Люди (старше 15 років)	90	134641	1009,8
Діти (молодше 15 років)	45	60040	225,15
Разом:1235 кг			

Для забезпечення населення України імуностимулюючим препаратом β -глюкан задля лікування імунодефіцитних станів або профілактики для

унеможливлення порушень з боку імунної системи, а також буде актуальним та доречним питанням забезпечити вітчизняною субстанцією українську компанію ООО "Новалік Фарм", яка буде значно дешевшою за іноземну, що буде економічно вигідно як для компанії так і, власного виробництва, необхідно отримувати 1235 кг полісахариду β -глюкану в рік.

Розрахуємо, скільки ж культуральної рідини необхідно отримати за один цикл ферментації, аби ж розрахувати кількість стадій для приготування посівного матеріалу.

Кількість культуральної рідини, яка є необхідною для отримання 1235 кг полісахариду:

3,5г-1л

1235000-х

$X=352857,1$ л-культуральної рідини.

Враховуючи ж сумарні втрати цільового продукту при виділенні (40%), необхідно отримати наступну кількість культуральної рідини :

$V_{кр}=352857,1/0,6=588095,2$

Прийmemo кількість робочих трудоднів (Трд)- 150, тоді ж кількість продукту на добу (V_d) становитиме:

$V_d = V_{гп}/Трд = 588,09/150 = 3,9 \text{ м}^3$.

Кількість продукту за один цикл ($V_{кр}$) становить:

$V_{кр} = (K_1 * V_d * T_{цф})/24 = (1,1 * 3,9 * 58)/24 = 10,4 \text{ м}^3/\text{цикл}$,

де $T_{цф}$ -цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу (48год), а також час підготовки ферментера до роботи (10 год). K_1 - коефіцієнт запасу, що враховує, також можливість нестерильних операцій ($K_1=1,1-1,5$).

Підготовка ферментера включає наступні операції: миття та огляд (2 год), наступне, перевірка на герметичність (2 год), за тим стерилізація (2год), охолодження (1год), та завантаження середовища (1,5 год), після чого засів (0,5 год), вивантаження культуральної рідини (1 год).

$V_{г} = V_{цк}/K_{зап} = 10,4/0,6 = 17,3 \text{ м}^3$, де $K_{зап}=0,6$ -коефіцієнт заповнення ферментера.

Найближчий ж за геометричним об'ємом ферментер є: $V_f = 20 \text{ м}^3$.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$K_{zf} = V_{цк} / V_f = 10,4 / 20 = 0,52$, що не перевищує заданого значення, отже, геометричний об'єм ферментера вибрано вірно.

Кількість ж посівного матеріалу (доза) для ферментера становить - 10 % від об'єму поживного середовища.

Тоді ж, кількість поживного середовища у самому ферментері становить:

$V_{пс1} = V_{роб.1} / (1 + X_f) = 10,4 / 1,1 = 9,5 \text{ м}^3$, де $X_f = 0,1$ - доза посівного матеріалу для ферментера.

Кількість посівного матеріалу становить $V_{п1} = V_{роб.1} - V_{пс.1} = 10,4 - 9,5 = 0,9 \text{ м}^3$

Для одержання 1 м^3 інокуляту в самому посівному апараті при врахуванні втрат в результаті крапливиносy вже через сам колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 до 15 %.

Тоді ж, кількість поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становить:

$V_{роб2.} = V_{пм1} / (1 - E_{па}) = 0,9 / 0,9 = 1 \text{ м}^3$.

Кількість посівного матеріалу становить - 10 % від об'єму поживного середовища.

Тоді кількість поживного середовища в посівному апараті вже буде становити:

$V_{пс.2} = V_{роб.2} / (1 + X_{па}) = 1 / 1,1 = 0,9 \text{ м}^3$, де $X_{па} = 0,1$ - доза інокуляту для посівного апарату.

Кількість посівного матеріалу для посівного апарату становить:
 $V_{пм2} = V_{роб.2} - V_{пс.2} = 1 - 0,9 = 0,1 \text{ м}^3$ або 100 л.

Кількість інокуту $V_{роб.2} = 1 \text{ м}^3$ можна одержати під час культивування дріжджів у посівному апараті геометричним об'ємом
 $V_{па2} = V_{роб.2} / K_{зап.} = 1 / 0,6 = 1,6 \text{ м}^3$.

Тоді, прийемо найближчий за об'ємом стандартний ферментер: $V_{сф} = 2 \text{ м}^3$, уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$K_{з1} = V_{роб.2} / V_{сф} = 1 / 2 = 0,5$.

Вже для одержання 100 л самого посівного матеріалу в інокуляторі при враховуванні втрат в результаті краплевиносу, через колектор, відпрацьованого повітря, які становлять в межах від 10 до 15 %. Тоді ж, кількість поживного середовища, а також посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі становитиме

$$V_{роб.3} = V_{пм2} / (1 - E_{ін}) = 100 / (1 - 0,10) = 111,1 \text{ л.}$$

Кількість посівного матеріалу (доза) становить 10 % від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища в інокуляті буде:

$$V_{пс.3} = V_{роб.3} / (1 + X_{ін.}) = 111,1 / (1 + 0,1) = 101 \text{ л, де } X_{ін} = 0,1 - \text{доза посівного матеріалу для інокулятора.}$$

$$\text{Кількість посівного матеріалу для інокулятора становить } V_{пм3} = V_{роб.3} - V_{пс3} = 111,1 - 101 = 10,1 \text{ л.}$$

Кількість інокуляту $V_{роб.} = 111,1$ л можна одержати під час культивування даних дріжджів в інокуляторі геометричним об'ємом $V_{ін3} = V_{роб.3} / K_{зап.} = 111,1 / 0,6 = 185,1$ л. Прийmemo найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{сф} = 0,2$, уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{з1} = V_{роб.3} / V_{сф.} = 111,1 / 200 = 0,55.$$

Для одержання- 10 л посівного матеріалу в самому інокуляторі враховуємо втрати в результаті краплевиносу через сам колектор відпрацьованого повітря, які становлять в межах від 10 до 15 %.

Тоді ж, кількість поживного середовища, а також посівного матеріалу перед самим культивуванням в інокуляторі становитиме

$$V_{роб.3} = V_{пм2} / (1 - E_{ін}) = 10 / (1 - 0,10) = 11,1 \text{ л.}$$

Кількість посівного ж матеріалу (доза) становить- 10 % від об'єму поживного середовища. Тоді, кількість поживного середовища в самому інокуляті буде:

$$V_{пс.3} = V_{роб.3} / (1 + X_{ін.}) = 11,1 / (1 + 0,1) = 10,1 \text{ л, де } X_{ін} = 0,1 - \text{доза посівного матеріалу для інокулятора.}$$

$$\text{Кількість посівного матеріалу для інокулятора становить } V_{пм3} = V_{роб.3} - V_{пс3} = 11,1 - 10,1 = 1 \text{ л.}$$

Кількість інокуляту $V_{роб.}=11,1$ л можна одержати під час культивування дріжджів в даному інокуляторі геометричним об'ємом, який становить $V_{ін3}=V_{роб.3}/K_{зап.}=11,1/0,6=18,5$ л. Прийmemo ж найближчий, за об'ємом стандартний ферментер- $V_{сф}=0,02$, після чого, уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{з1}=V_{роб.3}/V_{сф.}=11,1/20=0,55.$$

Кількість інокуляту для засіву малого інокулятора- $V_{пм4}=1$ л можна одержати культивуванням дріжджів вже у колбах на качалці. Для цього використовують качалочні колби, безпосередньо, об'ємом $V_{колб}=V_{пм4}/(V_{колб}*K_{зк})=1000/750*0,2=7$ штук.

Таким чином, за результатами розрахунків для біосинтезу β -глюкану *Saccharomyces cerevisiae* прийmemo до встановлення один ферментер об'ємом- 20 м^3 , один інокулятор об'ємом 2 м^3 , один інокулятор об'ємом $0,2 \text{ м}^3$ і один інокулятор об'ємом $0,02 \text{ м}^3$.

РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми біосинтезу субстанції та технологічної схеми виробництва ЛЗ.

4.1. Обґрунтування вибору біологічного агенту, поживного середовища для його культивування.

В сучасних умовах не виникає сумнівів щодо актуальності розроблення біотехнології одержання β -глюкану в Україні. Оскільки, за інформацією більшості з розглянутих літературних джерел, застосування даного полісахариду в складі терапії аутоімунних захворювань достовірно покращує прогноз захворювання та має стимулюючу дію на всі ланки гуморального і клітинного імунітету [1-8,32].

Згідно останніх даних [2-6], для синтезу β -глюкану найбільшої уваги вітчизняні та закордонні вчені удостоїли такі б/а як: дріжджі [4] *Saccharomyces cerevisiae*, мікроводорості [5] *Euglena gracilis* та актиноміцети [6] *Streptomyces lucensis* і *Streptomyces violaceus*.

У таблиці 2.1, наведено порівняльну характеристику продуцентів β -глюкану.

Порівнюючи склад поживного середовища у запропонованих авторами технологіях, можна зробити висновок, що у всіх випадках воно досить простого складу, окрім *Euglena gracilis* [5], крім того слід зазначити, що у випадку застосування *Streptomyces lucensis* ВКПМ Ас-1743 [6] в поживному середовищі використовують соєве борошно, тобто є необхідність у введенні додаткової стадії технологічного процесу – заварювання, що вимагає більш громіздкого та тривалого виробництва.

Вартість поживних середовищ вказаних в таблиці 4.12 було обраховано та наведено в таблиці 4.13.

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.01 КР ПЗ</i>			
Зм.	Арк	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив.	Багатиренко				Розділ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми біосинтезу субстанції та технологічної схеми виробництва ЛЗ.	Літера	Аркуш	Аркушів
Консульт							58	192
Керівник	Тетеріна С.М					60 Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Зав.Каф.	Стабніков В.П							

Особливості одержання β-глюкану на суміші ростових субстратів

Біологічний агент	Склад ПС, г/л	Тривалість культивування, год	Концентрація β- глюкану в біомасі, г/л	Особливості процесу біосинтезу	Використана література
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> H131	Глюкоза- 15; Дріжджовий екстракт - 0,5; K ₂ HPO ₄ - 5,2; KH ₂ PO ₄ - 3,18; MgSO ₄ - 0,12; NH ₄ Cl- 0,54.	48	3,5	Культивування у ферментері об'ємом 3дм ³ з робочим об'ємом 1,8 дм ³ (t = 30+/-2 ⁰ C; n = 200 об/хв, аерація- 0,8 дм ³ / хв).	Man Z., Xin J. β-Glucan from <i>Saccharomyces cerevisiae</i> induces SBD-1 production in ovine ruminal epithelial cells via the Dectin-1-Syk-NF-κB signaling pathway. 2019, 53:304-315. doi: 10.1016/j.cellsig.2018.10.018.
<i>Streptomyces lucensis</i> ВКПМ Ас-1743	Сахароза – 20; Соєве борошно-5,0; NaCl- 3,0; K ₂ HPO ₄ -1,0; MgSO ₄ x 7H ₂ O- 0,5.	72	2,3	Культивування у ферментері об'ємом 3 дм ³ з робочим об'ємом 1,8 дм ³ (n=140–180 об/хв, t = 29 ± 1°C, рН 7,0)	Шарова Н.Ю. Динамика біосинтеза бета-глюканов mikroорганізмами <i>Aspergillus niger</i> , <i>Streptomyces lucensis</i> и <i>Streptomyces violaceus</i> в процесі їх культивування на різних середовищах. НИУ ИТМО.2020,2(5):49-60.
<i>Euglena gracilis</i> (штам не вказаний)	Глюкоза -20 Кукурудзяний екстракт -30; М'ясний екстракт-5; K ₂ HPO ₄ – 0,0667; MgSO ₄ x7 H ₂ O – 0,333; KNO ₃ – 0,1. *Мікроелементи	120	8,35	Культивування в колбах об'ємом 750 см ³ з 100 мл середовища на качалці (n=160–220 об/хв, t = 20 ± 3°C, рН = 2,5-3,5).	Мокросноп В.М.. Продуцирование запасного полисахарида микроводорослью <i>Euglena gracilis</i> . J.Algologia. 2018, 28(2):136—151.

*Примітка: В поживне середовище вносять 1(мл / л) р-ну мікроелементів, що відповідає кількості мікроелементів в (г/л) : ZnSO₄x7H₂O - 0,22; MnSO₄ -0,81; CuSO₄x5H₂O - 0,079; NaBO₃ x 4H₂O - 0,3; (NH₄)₆Mo7O₂ x 4H₂O – 0,9; FeSO₄x7H₂O – 0,93; CaCl₂ -0,2; Co(NO₃)₂x4H₂O - 0,02; Na₂ЭДТА (ТрилонБ) -0,9.

Таблиця 4.13

Вартість поживних середовищ для культивування продуцентів β - глюкану

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації *
1	2	3	4	5
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> НП31	Глюкоза- 15	30	0,45	1
	Дріжджовий екстракт - 0,5;	1100	0,55	2
	KH ₂ PO ₄ - 3,18;	120	0,38	3
	K ₂ HPO ₄ - 5,2;	150	0,78	3
	MgSO ₄ - 0,12;	14,80	0,001	4
	NH ₄ Cl- 0,54.	113,40	0,06	5
	Вартість 1л середовища-2,2			
<i>Euglena gracilis</i>	Глюкоза-20;	30	0,6	1
	Кукурудзяний екстракт-30;	30	0,9	6
	М'ясний екстракт-5;	7296	36,5	7
	K ₂ HPO ₄ -0,0667;	150	0,01	3
	MgSO ₄ x7 H ₂ O - 0,333;	15,20	0,005	8

1	KNO ₃ - 0,1;	25	0,06	9
	2	3	4	5
	ZnSO ₄ x7H ₂ O - 0,22;	120	0,002	10
	MnSO ₄ -0,81;	26,57	0,02	11
	CuSO ₄ x5H ₂ O - 0,079;	105	0,008	12
	NaBO ₃ x 4H ₂ O – 0,3;	50	0,13	13
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂ x 4H ₂ O – 0,9;	1587	1,4	14
	FeSO ₄ x7H ₂ O - 0,93;	39	0,04	15
	CaCl ₂ -0,2;	65	0,02	16
	Co(NO ₃) ₂ x6H ₂ O - 0,02	1200	0,02	17
	Na ₂ ЕДТА (ТрилонБ) -0,9	135	0,13	18
Вартість 1л середовища-39,8				
<i>Streptomyces lucensis</i> ВКІІМ Ac-1743	Сахароза – 20;	90	1,8	19
	Соеве борошно-5,0;	75	0,4	20
	NaCl- 3,0;	4	0,01	21
	K ₂ HPO ₄ -1,0;	150	0,15	3
	MgSO ₄ x 7H ₂ O-0,5	15,20	0,008	8
	Вартість 1л середовища-2,4			

Примітка.* – Ціни наведено станом на листопад 2020 р.

- 1- <https://prom.ua/p1292861578-glyukoza-pishevaya-meshkah.html> ,
- 2- <https://prom.ua/p1086437845-ekstrakt-drozhzhej.html> ,
- 3- <https://prom.ua/p818241697-kalij-fosfornokislyj-zameschennyj.html> ,
- 4- <https://prom.ua/p618017953-sulfat-magniya.html> ,
- 5- <https://prom.ua/p151427647-ammonij-hloristyj-hlorid.html> ,
- 6- <https://doneck.flagma.ua/kuplyu-kukuruzny-ekstrakt-o10180638.html> ,
- 7- <http://lab-mir.com/index.php/каталог/питательные-среды/питательные-среды-пр-ва-индия/39448-detail.html> ,
- 8- <https://prom.ua/p1114437973-sulfat-magniya.html?&primelead=MC4y> ,
- 9- <https://prom.ua/p1008642648-selitra-kalievaya-polsha.html> ,
- 10- <https://prom.ua/p19383609-tsink-sernokislyj-vod.html> ,
- 11- <https://prom.ua/p47505427-sulfat-margantsa-mnso4.html> ,
- 12- <https://prom.ua/p1089869957-med-sernokislaya-sulfat.html?&primelead=MC41> ,
- 13- <https://prom.ua/p1218759145-natrij-perborat-vodnyj.html> ,
- 14- <https://prom.ua/p1098431343-ammonij-molibdenovokislyj-chda.html?&primelead=MS4wMg> ,
- 15- <https://prom.ua/p906515039-zhelezo-sernokisloe-zheleznyj.html> ,
- 16- https://klebrig.com.ua/p1179966495-kaltsij-hloristyj-1kg.html?gclid=Cj0KCQIAwf39BRCCARIsALXWETyddofGac7sbvi8oEnF5tu4Q7uN34VUHJ67o7DMpoREQuFvd_RO5IQaAozYEALw_wcB ,
- 17- <https://prom.ua/p505512613-kobalt-azotnokislyj-vod.html?&primelead=MC41> ,
- 18- https://klebrig.com.ua/p1116337844-trilon-1kg-dinatrievaya.html?gclid=Cj0KCQIAwf39BRCCARIsALXWETylj0L3a2APsGn4OybkWscMl2jO4ESHWQow_MZIPpVleVPqORfFmP8aAsR1EALw_wcB ,
- 19- <https://prom.ua/p5251530-saharoza.html> ,
- 20- <https://prom.ua/p975818606-muka-soevaya.html> ,
- 21- <https://prom.ua/p54731635-sol-povarennaya-pishevaya.html>.

З таблиці 2.2 видно, що вартість компонентів 1 л поживного середовища при культивуванні *Saccharomyces cerevisiae* НІІ31 та *Streptomyces lucensis* ВКПМ Ас-1743 приблизно однакова. При культивуванні *Euglena gracilis* на поживному середовищі з вказаним складом в таблиці 2.2, необхідно витратити на 22 рази більше коштів, в порівнянні з культивуванням на вказаному середовищі *Saccharomyces cerevisiae* НІІ31 (див. табл. 2.2), та у 2 рази в порівнянні з культивуванням на вказаному середовищі (див. табл. 4.13) *Streptomyces lucensis* ВКПМ Ас-1743.

Для остаточного вибору найбільш перспективного біологічного агента розрахуємо умовну вартість 1 г цільового продукту (див. табл. 4.14).

Таблиця 4.14

**Умовна вартість 1 г цільового продукту синтезованого на
ростовому субстраті**

Біологічний агент	Концентрація β -глюкану, г/л	Тривалість культивування, год	Кількість утвореного β -глюкану за годину, г/год	Вартість 1л середовища, грн/л	Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> НІІ31	3,5	48	0,07	2,2	0,6
<i>Euglena gracilis</i>	8,35	120	0,07	39,8	5
<i>Streptomyces lucensis</i> ВКПМ Ас-1743	2,3	72	0,03	2,4	1

Згідно даних представлених у таблиці 4.14 та спираючись на висновки авторів розглянутих технологій, можна зробити висновок що умовна вартість β -глюкану, синтезованого штамом *Saccharomyces cerevisiae* НІІ31, є найнижчою

серед решти продуцентів, що є найважливішим показником для забезпечення продуктивного біологічного процесу.

Отже, із вище сказано можна зробити висновок, що цілком обґрунтовано обрати *Saccharomyces cerevisiae* НІІ31, як найбільш економічно вигідного біологічного агента, до того ж тривалість культивування дріжджів є найменшою серед решти представлених для отримання β -глюкану. Дріжджі (особливо, *Saccharomyces cerevisiae*), є найбільш дослідженими еукаріотичними мікроорганізмами, наразі повністю розшифрований їх геном, а в літературі вітчизняних та закордонних вчених у повному доступі вказано оптимальні умови культивування дріжджів, зокрема вказано оптимальний склад поживного середовища (в залежності від джерела вуглецю) для накопичення максимального цільового продукту, також в статтях та патентах викладено багато поетапної інформації стосовно виділення полісахаридів із дріжджів різноманітними методами (зокрема модернізовані методи екстрагування) при чому таким чином, аби концентрація β -глюкану була на порядки збільшеною.

Отже, поживне середовище для культивування *Saccharomyces cerevisiae* має наступний склад :

Глюкоза- 15;

Дріжджовий екстракт - 0,5;

K₂HPO₄- 5,2;

KH₂PO₄- 3,18;

MgSO₄- 0,12;

NH₄Cl- 0,54.

Розрахунок вмісту в середовищі джерела вуглецевого живлення:

Потреби для синтезу β -глюкану: Як джерело вуглецю для одержання β -глюкану використовують глюкозу[4]. Розрахуємо, скільки вуглецю міститься в 3,5 г β -глюкану. Молекулярна маса β -глюкану становить 162 г/моль. Відомо, що у 162 г β -глюкану міститься 72 г [80]вуглецю, а в 3,5 г β -глюкану - $(72 \cdot 3.5) / 162 = 1,5$ г вуглецю. Далі розраховуємо, у скількох грамах глюкози

міститься 1,5 г вуглецю. Отже, у 180 г глюкози міститься 72 г вуглецю, а 1,5 г вуглецю міститься у $(180 \cdot 1,5) / 72 = 3,75$ г глюкози.

Враховуючи, той факт, що при вирощуванні мікроорганізмів, безпосередньо, на вуглеводах близько 40 % субстрату йде окислювання до CO_2 для одержання енергії, яка необхідна для конструктивного метаболізму, вміст глюкози у середовищі становитиме $(3,75 \cdot 0,4) + 3,75 = 5,25$ г/л.

Потреба для синтезу біомаси: У біомасі міститься- 50 % вуглецю, а отже вміст вуглецю у 7 г біомаси буде становити- $7 \cdot 0,5 = 3,5$ г. Ця ж кількість вуглецю, міститься у $(3,5 \cdot 180) / 72 = 8,75$ г глюкози.

Враховуючи, той факт, що 40 % втрат субстрату йде на “холосте окиснення”, то для одержання 7 г/л біомаси у середовищі, необхідно буде внести $(8,75 \cdot 0,4) + 18,75 = 12,25$.

Отже, загальний вміст глюкози в середовищі необхідний для синтезу біомаси (7 г/л) та β -глюкану (3,5 г/л), становить – $8,75 + 12,25 = 21$ г/л.

Розрахунок складу поживного середовища показав, що воно буде збіднене на джерело вуглецю, таким чином варто збільшити вміст глюкози до 21 г/л.

Щодо ж джерела азотного живлення, то в складі поживного середовища є присутній дріжджовий екстракт, який багатий, як на нуклеотиди, так і пептиди, амінокислоти та виступає як додатковий фактор росту і виступає джерелом азотного живлення, як і NH_4Cl .

Потреба для синтезу біомаси: Зазвичай відомо, що у біомасі міститься 10 % азот. Таким чином, у 7 г біомаси вміст азоту становить 0,7 г.

Потреба для синтезу β -глюкану: Так як в складі β -глюкану немає нітрогену, то зробимо перерахунок на біомасу, тоді $(7 \cdot 0,1) = 0,7$ г нітрогену повинно міститися в середовищі. Розрахуємо, в якій кількості NH_4Cl міститься ця кількість азоту. Молекулярна маса NH_4Cl -53,5г/моль[36]. У 53,5 г NH_4Cl міститься 14 г нітрогену, тоді 0,7 г нітрогену буде міститися у $(53,5 \cdot 0,7) / 14 = 2,7$ г солі.

Проте відомо, що для культивування *Saccharomyces cerevisiae* в 1 літр ПС повинно міститися не менше 140 мг амонійного азоту, а в поживному середовищі для культивування *Saccharomyces cerevisiae* складу вказаного вище кількість

амонійного азоту становить- 540 мг. Саме лімітування джерел азоту є специфікою синтезу β -глюкану, так зване “азотне голодування”, що збільшує вихід кінцевого продукту.

4.2 Обґрунтування вибору способу культивування і типу ферментера.

Для біосинтезу β -глюкану було обрано *Saccharomyces cerevisiae* НІЗ1, який по відношенню до температури – мезофіл.

Оптимальна температура для росту *Saccharomyces cerevisiae* НІЗ1 є 30 °C та pH-5,0. Виходячи з цього, що можливий ризик контимінації- сторонніми мезофільними, а також нейтрофільними мікроорганізмами. Це, і зумовлює необхідність для забезпечення асептичних умов під час біосинтезу, тому буде доцільно, для культивування дріжджів використовувати глибинний спосіб, чого ж не можна досягти при поверхневому культивуванні.

На відміну ж, від поверхового культивування, перевагою глибинного культивування є те, що даний спосіб не потребує великих площ, а також громіздкого обладнання, і об'єм ферментерів можна збільшити, вже за рахунок збільшення висоти. Перевагою ж, є я також простота обслуговування, можливість автоматизації, а головне, зручність видалення непошкодженого продукту із культуральної рідини.

По відношенню до кисню *Saccharomyces cerevisiae* – факультативний анаероб.

Дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* нездатні синтезувати свої клітинні структури при анаеробіозі. Встановлено, що у даного мікроорганізма не зустрічається ефект Пастера (аерація дріжджового бульйону прискорює ріст дріжджів, в той час як в анаеробних умовах швидкість росту клітин зменшується), а частіше проявляється ефект репресії дихання цукрами. Отже, для інтенсифікації накопичення біомаси *Saccharomyces cerevisiae* необхідні аераційні умови, тому для подачі повітря ферментер повинен бути оснащений барботером, через який саме і, забезпечується аерація культуральної рідини.

Для запобігання контамінації на виробництві створюють попередню стерилізацію обладнання, а також аераційного повітря та й усіх інших

компонентів, які безпосередньо, потрапляють у ферментер. Також стерилізацію проходять піногасники, проте в даному випадку вони не використовуються, так як в середовищі відсутні речовини, що зумовлюють піну. Для запобігання ж контамінації у ферментері створюють надлишковий тиск, після чого за допомогою подачі аераційного повітря.

Основна частина синтезу цільового β -глюкану відбувається в стаціонарній фазі росту, таким чином, для синтезу полісахариду є оптимальним культивування у періодичній системі.

Вимогам зазначеним вище, відповідає ферментер фірми "Biostat" (див. рис. 4.1) [81]. Технологічні переваги апарата базуються на простоті конструкції, відсутність рухомих елементів та простоті керування, що обумовлює високу експлуатаційну надійність. Конструктивним елементом ферментера є механічний перемішувальний пристрій – мішалка, яка забезпечує високу інтенсивність транспорту кисню, а якраз необхідною умовою нормального розвитку *Saccharomyces cerevisiae* є енергійне перемішування при вирощуванні культури.

Отже, для забезпечення високого значення тепломасообміну у ферментері встановлений пристрій для перемішування.

Оскільки, дана дріжджова культура не вибаглива до перемішуючих пристроїв, то можна використати доступну лопатеву мішалку, із метою, безпосередньо, забезпечення інтенсивного перемішування самої культуральної рідини вже по всьому об'єму ферментера.

Для підтримання ж рН на рівні 5,0 ферментер має бути оснащений рН-датчиком, а для забезпечення ж, оптимальної температури- термодатчиками, нагрівальними елементами для підтримання температури.



Рис.4.1 Ферментер фірми ‘‘Biostat’’[81].

Даний ферментер обладнаний:

- барботером в нижній частині ферментера, аби ж, забезпечити подачу аераційного повітря;
- обладнаний мішалкою для забезпечення ефективних масообмінних процесів;
- нагрівання може ж проводитись як електрично, так і парою;
- наявні датчики: рН, температури, розчинного кисню і рівня піни, тож процес культивування проводиться повністю автоматично.

Технічні характеристики обраного ферментера:

Внутрішній діаметр апарата (мм): 2200;2600;3000.

Потужність приводу (кВт): 3,0-75.

Частота обертання(хв^{-1}) :6-500[81].

4.3 Обґрунтування стадій виділення і очищення субстанції для виробництва ЛЗ.

β -глюкан – природний згущувач, стабілізатор, емульгатор, крім того новітні дослідження підтверджують його імуномодельючі властивості та застосування даного полісахариду у складі лікарських засобів та БАД. Даний полісахарид широко використовується в медицині, хімічній, косметичній та ін. галузях промисловості [1-3].

Згідно останніх даних [4-6], для синтезу β -глюкану найбільшої уваги вітчизняні та закордонні вчені удостоїли такі б/а як: дріжджі [4] *Saccharomyces cerevisiae*, мікроводорості [5] *Euglena gracilis* та актиноміцети [6] *Streptomyces lucensis* і *Streptomyces violaceus*.

Проте, згідно літературним даним[20-28], одним із перспективних джерел отримання β -глюкану є дріжджі *Saccharomyces cerevisiae*, вони найбільш досліджені еукаріотичні мікроорганізми, у яких, наразі, повністю розшифрований геном, а в науковій літературі наведено багато поетапної інформації стосовно виділення β -глюкану із *Saccharomyces cerevisiae* різноманітними методами (зокрема, модернізованими методами екстрагування) при чому таким чином, аби концентрація β -глюкану була на порядки збільшеною[20-28].

В *Saccharomyces cerevisiae*, β -глюкан, виконує функцію структурного полісахариду, котрий локалізовано в клітинній стінці дріжджів у вигляді β -1,3/1,6 зв'язку, здатний зв'язуватися з рецепторами макрофагів, викликати їх активацію таким чином, укріплювати вроджену імунну систему організму, даний зв'язок стимулює вироблення макрофагами сигналів тривоги (цитокіни), які в свою чергу стимулюють клітини специфічної імунної системи.

Оскільки β -глюкан – полісахарид, який є основним компонентом клітинної стінки дріжджів, як вже згадувалось вище, тому першим етапом в процесі ж очищення цільового продукту буде саме розділення культуральної рідини і клітин дріжджів[24].

Обґрунтування вибору способу відділення біомаси.

Згідно статей[4,20-35], клітини дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* видаляються із культуральної рідини методом сепарування, які в подальшому і піддаються дезінтеграції, та після-відділенням цільового продукту.

Існують наступні методи розділення клітин дріжджів від культуральної рідини: флотація, сепарування та центрифугування; фільтрація; ультрафільтрація, та ін [82-87].

Флотація. В даному ж випадку саме цей метод не є доцільно використовувати, оскільки ж дріжджі розподіляються по всій товщі культуральної рідини, таким чином, будуть погано розділятися даним флотаційним методом.

Ще ж одним недоліком є також високі втрати біомаси, аж до 15%, низький ступінь концентрування.

Зважаючи на те, що кількість полісахариду є прямою залежністю від кількості самих клітин продуценту даний вид розділення є також- недоцільним[82].

Фільтрація. Недоліком даного способу є налипання клітин дріжджів на фільтри, і забивання пор фільтруючого елемента іншими ж- колоїдними частинками, що також знижує швидкість потоку рідини в процесі фільтрування, і збільшує енерговитрати на підтримання даного процесу. Тому цей спосіб також не є ефективним [83].

Ультрафільтрація. Головною перевагою ультрафільтрації є високий ступінь очистки. Проте, цей метод розділення підходить, якщо ж цільовий продукт (β -глюкан) розчинений в самій культуральній рідині, і в даному випадку такий метод не є доцільно використовувати, оскільки при розділенні культуральної рідини і клітин дріжджів, цільовий продукт накопичується в клітинній стінці продуцента. І як у випадку зі звичайною фільтрацією теж буде спостерігатися явище закупорювання пор мембран, що не є досить ефективним методом [84].

Центрифугування. Існують наступні представлені види центрифугування: фільтруюче центрифугування, а також сепаруюче центрифугування (тарільчаста центрифуга)[85]. Фільтруючі центрифуги оснащені барабанами, є покритими, саме,

із середини, як правило, тканиною чи іншою фільтруючою перегородкою. Даний тип центрифуг також не є доцільно використовувати для розділення культуральної рідини і клітин дріжджів, оскільки будуть закупорюватись пори мембран.

Враховуючи той факт, що кількість продукту напряду залежить від кількості біомаси, яку нам потрібно відділити з найменшими втратами, то фільтруюче центрифугування в даному випадку теж, не є доцільним.

Тому для відділення біомаси від культуральної рідини, дійсно, доцільніше використовувати сепаруюче центрифугування. Цей метод має наступний ряд переваг, а саме:

- відсутність потреби, в застосуванні фільтрувальних елементів,
- обробка матеріалу з найменшими витратами активної речовини,
- легше піддається автоматизації, оскільки ж агрегати- займають менше місця, та легше мити устаткування[85].

Аналізуючи наукову літературу [85-87], найбільш доцільно застосувати для розділення культуральної рідини та клітин дріжджів сепаратор Альфа Лаваль BRUX[87], який має унікальне поєднання конструктивних особливостей, що забезпечують ефективне розділення саме клітин дріжджів в повністю автоматизованих процесах. Унікальні вихрові сопла автоматично підтримують постійну концентрацію частинок твердої фази на виході сопла при постійній швидкості їх надходження. Ця функція саморегулювання відстежує співвідношення в'язкості подається в соплову камеру рідини і впливу її швидкості обертання на втрати напору. Витрата твердої фази може регулюватися за рахунок вибору різних діаметрів сопел. Тарілчастий барабан сепаратора BRUX (див. *рис. 4.2*) [87], обладнаний трубками для концентрату, що ведуть до вихровим соплам[87].

При обертанні барабана, під дією відцентрових сил дріжджі (тверда фаза) рухаються в сторону порожнини для збору до периферії барабана, а звідти, через трубки для концентрату і внутрішні вихрові сопла, в камеру розділової трубки. Опинившись в камері концентрат видаляється за допомогою розділової трубки і виводиться під тиском з сепаратора. Завдяки безперервного вивантаження твердих

частинок через сопла (один прохід) і малим зсувним силам, чинним в барабані центрифуги, тверда фаза піддається дуже дбайливої обробці [87].



Рис.4.12 Сепаратор Альфа Лаваль BRUX[87].

Обґрунтування способу виділення і очищення β -глюкану від клітин дріжджів.

Для отримання цільового продукту необхідно здійснити дезінтеграцію клітин *Saccharomyces cerevisiae*, так як вже було описано вище, β -глюкан накопичується саме в клітинній стінці продуцента[4].

Існують наступні методи дезінтеграції клітинних стінок дріжджів: механічна дезінтеграція[88], хіміко-екстрактивна дезінтеграція [89].

Для механічної дезінтеграції використовують баластні дезінтегратори, гомогенізатори високого тиску, млини, ультразвук (найбільше, характерний метод дезінтеграції для бактерій, зокрема грамнегативних), проте ж для дезінтеграції дріжджів найчастіше застосовують хіміко-екстрактивні методи (зокрема, за відомою технологією, дією на клітини дріжджів пероксиду водню, який за своєю природою є гарним розчинником)[88].

На сьогодні, загальноприйнятий метод отримання β -глюкану дріжджів, який широко застосовується в експериментах по дослідженню біологічної активності

полісахариду β -глюкану, полягає в обробці клітин дріжджів розчином гідроксиду натрію, при 75 °С за літературними даними[30].

Після відділення культуральної рідини на сепараторі Альфа Лаваль BRUX, клітини дріжджів подають у збірник, куди насосом перекачують розчин перексиду водню концентрацією 24% для дезінтеграції клітинних стінок дріжджів при 75 °С. При цьому проводять суспендування протягом 180 хвилин [30].

Лізат перекачують знов у сепаратор для відділення клітинного дебрису (5000 об/хв, 3хв), яку, за тим подають в резервуар, куди дозатором заливають 3% розчин NaOH для виділення β -глюкану при 75°C, протягом 1 години), при чому проходить екстракція манану та білка, після чого через дозатор додають 0,5 н оцтової кислоти для видалення глікогену за літературними даними [30].

На наступному етапі необхідно здійснити концентрування β -глюкану.

Існують наступні фільтраційні установки: нутч-фільтр, вакуум-фільтр, ультрафільтраційна установка.

З точки зору ефективності, а також економічності процесу виділення β -глюкану доцільно застосувати ультрафільтраційну установку, перевагою якої є високий ступінь очистки полісахариду, невеликі затрати та простота конструкції, на відміну, наприклад, від нутч-фільтрів, які мають габаритні розміри та вакуум фільтрів, у яких є незначна рушійна сила.

Фільтрування слід провести за допомогою фільтрів, діаметр пор яких будуть менші за розміри клітин, але ж більшим за максимальний розмір молекули полісахариду[30].

Розмір дріжджових клітин 5-10 мкм [19]. Розміри молекули β -глюкану можна розрахувати за допомогою рівняння Стокса – $D_{\text{мол}} = 0,098 \cdot M^{0,38}$, де M – молекулярна маса речовини (Да). Відомо, що молекулярна маса становить $5 \cdot 10^4$ - $2 \cdot 10^6$ Да, відповідно мінімальний і максимальний розміри молекул будуть:

$$D_{\text{мол1}} = 0,098 \cdot (5 \cdot 10^4)^{0,38} = 5,98 = 6 \text{ нм};$$

$$D_{\text{мол2}} = 0,098 \cdot (2 \cdot 10^6)^{0,38} = 24,3 = 25 \text{ нм}$$

Відповідно діаметр пор не має бути меншим 25 нм.

Отриманий фільтрат передають вже на наступну стадію. За відомою технологією наступним етапом є нейтралізації лужного середовища додаванням 2 М НСІ (до рН 7,5) до фільтрату, до того ж в нейтральному та кислому середовищі β -глюкан випадає в осад. За цим потім залишок ресуспендують в 2 М НСІ (рН 7,5), що містить 5 мг цимоліази (має сильну літичну активність щодо клітинних стінок дріжджів, додають для кращого очищення β -глюкану), інкубують 16 год при 37 °С[30].

Після осадження полісахарид концентрують знов на ультрафільтраційній установці, фільтри з діаметром пор якої будуть вже меншими за мінімальні розміри молекул полісахариду, а саме 6 нм, для кращого очищення даного цільового продукту. Після фільтрації полісахарид відправляють за допомогою транспортера на стадію сушіння в розпилювальну сушарку[30].

Обґрунтування способу сушіння β -глюкану

Кінцевий продукт виділення та очищення- β -глюкан, є у вигляді порошку та експлуатується в подальшому, як основна речовина у складі лікарського засобу, яка має свої нормативно-технічні вимоги [30].

На сьогоднішній день різноманітність сушильних установок є досить високою. Проте, ж згідно літературних даних [30], процес сушіння β -глюкану, здійснюють при температурі 80-100 °С (саме такі температурні межі дозволяють прискорити процес сушіння) до постійної ваги та до повного випаровування рідини [30], за допомогою розпилювальної сушарки. Сушильним агентом є гаряче повітря, яке подають в сушильну камеру. Таким чином, створюють велику поверхню випаровування висушуваного β -глюкану, а також забезпечується хороший контакт із самим теплоносієм, тому ж сушка відбувається надзвичайно швидко. І час сушіння 15-30 секунд. Навіть при дуже високій температурі теплоносія розкладання продукту, в даному випадку полісахариду β -глюкану не відбувається, на виході ж отримують тонкоподрібнений продукт високої якості. Якраз дана технологія розпилювання дисками, характерна для суспензій і в'язких рідин(як в даному випадку), але вимагає великих витрат енергії. У розпилювальних сушарках ж є хороший контакт матеріалу з сушильним агентом, але об'єм сушильної камери-

повинен бути великим[90]. Якщо ж і, порівнювати розпилювальні сушарки, які ж мають безпосередньо, недолік-енергозатратність, з вакуумними[91], то останні мають ряд недоліків, а саме: низька продуктивність, необхідність застосування ручної праці, більші витрати часу на сушіння, завантаження й вивантаження матеріалу [92].

Вальцеві сушарки працюють безперервно, ручне завантаження повністю виключене, але ж конструкція придатна тільки для сушки рідких та пастоподібних продуктів [92]. Недоліком вальцевих сушарок є габаритні розміри, та мала інтенсивність сушіння.

Прикладом для порівняння сушильних установок можна також обрати стрічкову сушарку, яку також експлуатують на біотехнологічних підприємствах[92]. Проте ж, до недоліків стрічкових сушарок належать: висока вартість, а також дуже жорсткі вимоги до однорідності матеріалу по фракційному складу і початковій вологості, є складною в обслуговуванні (через перекося і розтягування стрічок), та має велику кількість рухомих частинок, питома продуктивність невисока, а питома витрата тепла- досить висока[91].

Аналізуючи вище сказане, можна зробити висновок, що дійсно обрати для стадії сушіння- розпилювальну сушарку цілком обґрунтовано, оскільки даний тип має найменше недоліків в експлуатації, а найголовніше підходить для висушування в'язких суспензій, як в даному випадку.

Розпилювальні сушарки для біотехнологічної промисловості виготовляють, як правило, за традиційними одноступеневими схемами, оскільки фактор економії енергоресурсів не відіграє суттєвої ролі (це не стосується багатотоннажних виробництв, таких, наприклад, як виробництво кормових амінокислот). Головними факторами можливості застосування устаткування для виготовлення фармацевтичних субстанцій є якість устаткування, наявність протоколів валідації. Пункт 3.36 GMP, наприклад, прямо наголошує: «Технологічне обладнання має бути сконструйоване так, щоб його можна було легко і ретельно прибирати і мити. Операції з прибирання і очищення обладнання слід виконувати відповідно до

детальних письмових інструкцій, а обладнання має міститись у сухих і чистих приміщеннях»[90].

Заокруглені форми сприяють легкому чищенню апаратів, а хромована полірована поверхня заважає затриманню бруду й дає змогу легко виявити забруднення візуальним способом.

Провідною компанією з виробництва дослідницьких розпилювальних сушарок або просто сушарок малої потужності, що відповідають вимогам GMP і можуть застосовуватись у виробництві фармацевтичної продукції, є данська компанія Anhydro. Сушильні установки розпилювального типу Anhydro (див.рис.4.3) для фармацевтичної промисловості виготовляють відповідно до стандарту системи керування і оброблення даних Управління за санітарним наглядом медикаментів США (англ. FDA), згідно з правилом 21 CFR (частина 11) з урахуванням індивідуальних вимог замовників[93].



Рис. 4.3. Розпилювальна сушарка.

Подрібнення висушеного порошку β -глюкану[93].

Наступним етапом є подрібнення висушеного β -глюкану, аби ж унеможливити злипання висушеного в розпилювальній сушарці порошку.

На сьогодні ж в фармацевтичній промисловості експлуатують наступні види дробарок- це, молоткові, шоківі, барабанні млини[94].

Молоткові дробарки: подрібнення самого матеріалу здійснюється при так званих ударах частин матеріалу, що і відкидаються молотками. Досягнувши ж

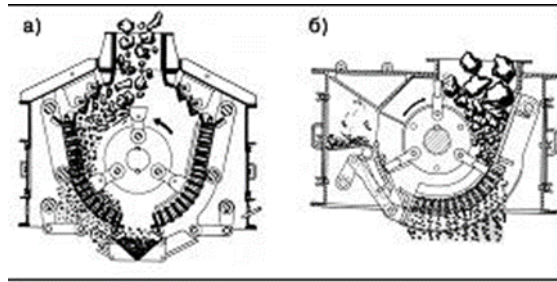
певного розміру, частини матеріалу проходять через саме сито. Для виготовлення ж молотків -використовуються достатньо зносостійкі сталі[94].

Ступінь ж подрібнення також характеризується і розміром отворів сита в даному випадку, це- $d=1,5\text{мм}$. Молоткова дробарка характеризується простотою, а також компактністю конструкції, надійністю, безперервністю роботи, великою продуктивністю, зокрема, невисокими питомими енерговитратами[94].

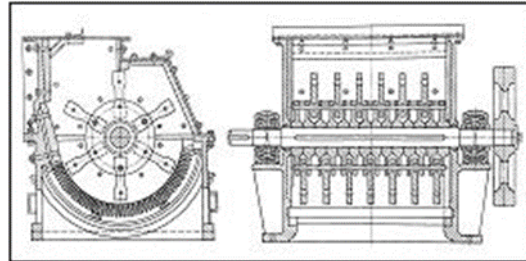
Дробарки з простим хитанням щокви мають свої переваги: це- менше спрацювання броньових плит, за тим, більша можливість подрібнення порошку, проте, загальним недоліком щоквих дробарок є циклічність у роботі (наявність робочого, і холостого ходів). Окрім цього, щокві дробарки відрізняються значною енергоємністю процесу. При мінімальній ширині вихідної щілини питома потужність дробарок із простим хитанням щокви становить $1,2.. 4,6 \text{ кВт}/(\text{м}^3 * \text{год})$ і зі складним — $0,9...4,6 \text{ кВт}/(\text{м}^3 * \text{год})$, що в 2-4 рази перевищує енергоємність дробарок інших типів[95].

Характерною особливістю барабанних млинів є створення великогабаритного високопродуктивного обладнання. Вони порівняно прості щодо конструкції, а також вони зручні і надійні в експлуатації, і забезпечують високий ступінь подрібнення, легко автоматизуються. Проте, недоліком є: низький К.К.Д. — (0,01-0,05), високі витрати електроенергії $10\text{-}40 \text{ кВт}\cdot\text{год}/\text{т}$ матеріалу, значний знос мелючих тіл і футеровки — $1\text{-}3 \text{ кг}/\text{т}$ матеріалу, велика металоємність і високий шум при роботі[96].

Отже, із вищесказаного можна зробити висновок, що порівнюючи різні типи дробарок, економічно-доцільною для дробіння висушеного β -глюкану є молоткова дробарка(див.*рис. 4.4*).



Реверсивна (а) і нереверсивна (б) молоткова дробарка (Pennsylvania Crusher).



Нереверсивна молоткова дробарка (вітчизняна конструкція).

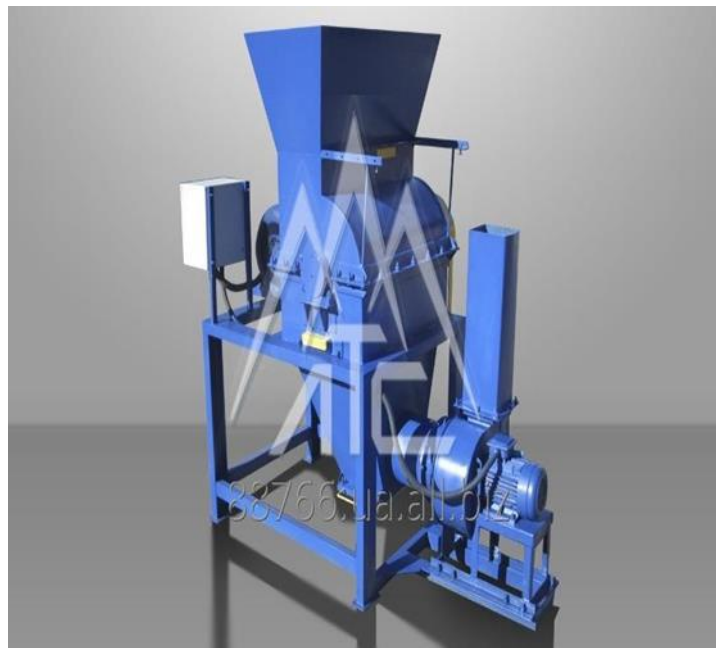


Рис. 4.4 Молоткова дробарка [94].

Технічні характеристики молоткової дробарки:

Продуктивність - 900-2000кг / год (залежно від типу і вологості сировини, що завантажується). Дробарка ж, призначена для цілодобової роботи.

Вага 750 кг, розмір завантаження сировини не більше 150 * 150мм.

Комплект поставки: дробарка, пульт управління, інструкція. Монтаж: 2 години.

Механізм дроблення здійснюється за допомогою молотків, у кількості 90 штук.

Насипна щільність є 0,2-0,8 кг/дм³ при вологості до 15 %[94].

Фасування, пакування β-глюкану.

Оскільки одержаний продукт являє собою порошкоподібну субстанцію, для його фасування необхідно застосувати фасувально-пакувальну машину, яка підходить для сипучих речовин.

Аналізуючи наукову літературу, можна виділити фасувально-пакувальну машину фірми Redler марки VM30. Продуктивністю 4т /годину. Для роботи установки необхідно просто на терезах виставити необхідні показники і потім запустити установку. Потім коли ж, необхідна вага буде досягнута (або 1 кг або 25), тоді подача зупиняється автоматично. Засувка вагового бункера відкриється, а також закриветься за допомогою спеціального пневмоциліндра[97].



Рис. 4.5 Фасувально-пакувальна машина VM30[97].

На транспортері-італійський привід, а також японські підшипники, що говорить про надійність даної установки. Сама ж фасувально-пакувальна машина є пересувна. Вона працює від мережі при 220 / 330 В, або від компресора при тиску 4-8 бар [97].

Обґрунтування пакувального матеріалу субстанції β-глюкану:

Полісахарид упаковують у спеціальні водонепроникні мішки з алюмінієвої фольги, аби ж унеможливити потрапляння води до порошку β-глюкану і утворення, так званих грудочок, алюмінієва фольга, унеможливорює потрапляння сонячних променів при транспортуванні, а також змін біологічної активності субстанції β-

глюкану. У порівнянні з таким типом упаковки продукту мікробного синтезу β -глюкану, як бочки чи мішки, економічно доцільні при транспортуванні насипних вантажів, мала маса у порівнянні з вмістом, як вже було згадано перевагою є захист від вологи, зручність заповнення і вивантаження, мала собівартість виготовлення. Бочки ж, більш дороговартісний пакувальний матеріал, проте характеризуються також надійністю.

Ящики, як пакувальний матеріал мають такі переваги, як: простота виготовлення, можливість варіювання міцності, захист від ушкоджень і проколів, проте, є не виключенням потрапляння вологи до субстанції, а також підвищене співвідношення маси тари до обсягу розміщеного в неї вантажу.

Маркування мішків з вмістом субстанції β -глюкану.

Для маркування первинної упаковки з субстанцією необхідно застосувати для швидкості процесу маркувальну машину. Необхідно підібрати таку маркувальну машину, аби ж вона мала здатність промаркувати саме обрану первинну упаковку, в даному випадку мішки. Під такі параметри підходить маркувальна машина фірми VARIOZET[98]. Вона широко використовується в пакувальних лініях різних галузей промисловості. Ця машина, інтегрована з передовою технологією, що забезпечує накладання етикеток з однієї або ж двох сторін.

Доступна для клієнтів у різних технічних характеристиках, а також конфігураціях, ця машина для маркування мішків суворо тестується на різних стандартних параметрах якості[98]. Надалі субстанція направляється в зону карантину.

4.4 Обґрунтування вибору класів чистоти виробничих приміщень виробництва ЛЗ (підготовки персоналу, дезінфікуючих засобів, вентиляційного повітря), вибору первинної упаковки ЛЗ.

У фармації чистота приміщень є одним з чинників, що забезпечують виконання принципового положення НВП (GMP): «Ніякий процес завершуючої стадії виробництва або контроль якості готового продукту не може розглядатися як єдиний засіб забезпечення стерильності і інших показників якості продукції. Якість закладається технологією і організацією виробництва, зокрема чистотою технологічних середовищ».

Чистота навколишнього середовища і устаткування є однією з критичних вимог GMP.

Для визначення області проведення і об'єму валідації технологічних процесів слід використовувати підхід, який заснований на оцінці ризиків.

Чисте ж приміщення має містити або одну, або декілька чистих зон. Чисті ж зони, можуть бути і за чистим приміщенням. Чисті зони, можуть створюватися в так званих, локальних об'ємах: наприклад, ламінарних шафах, укриттях, ізоляторах.

Клас чистого приміщення визначається, залежно від максимально допустимої рахункової концентрації аерозольних частинок, в одиниці об'єму повітря, розміри яких рівні або перевищують певну величину – при класифікації чистих приміщень від 0,1 до 5,0 мкм.

Проводячи ж обґрунтування вибору класу чистого приміщення, найперше необхідно визначити існування 2 типів виробництв:

- виробництво стерильних ЛЗ- це ін'єкційні, інфузійні препарати, ао ж очні краплі чи мазі, креми, емульсії, що наносяться на стерильні ділянки слизистих оболонок або рани, пошкоджені шкірні покриви;
- виробництво нестерильних ЛЗ.

Виробництво нестерильних ЛЗ рекомендується здійснювати у приміщеннях наступних класів чистоти: С і D. Допускається ж, здійснювати таке виробництво нестерильних лікарських засобів у приміщеннях, в яких вже не проводиться

контроль на вміст так званих часток та мікроорганізмів, за умови, яких відсутності звичайно, контакту відкритої продукції з навколишнім середовищем.

Максимально ж, допустимий рівень вмісту часток та мікроорганізмів є у повітрі самих виробничих приміщень відповідно ж до класів чистоти наведений в *Таблиці 4.15*:

Таблиця 4.15

Класифікація приміщень виробництва нестерильних лікарських засобів за максимально допустимою кількістю часток та мікроорганізмів у повітрі

Класи чистоти	Максимально ж, допустима кількість часток у 1 куб. м		Максимально ж допустима кількість- життєздатних мікроорганізмів, КУО/куб. м
	Діапазон від 0.5 до 5 мкм	Більше ніж 5 мкм	
C	350000	2000	100
D	3500000	20000	200*

* У приміщеннях D класу чистоти максимально допустима кількість життєздатних м/о у повітрі може складати 500 КУО/куб. м, якщо ж в процесі валідації є доведення, що при цьому і не відбувається погіршення якості лікарського засобу за так званим показником "мікробіологічна чистота".

- нормативи по вмісту часток у повітрі повинні дотримуватись по всьому приміщенні, коли ж воно звичайно знаходиться в оснащеному стані;
- максимально допустима кількість життєздатних м/о повинна відповідати нормативним вимогам у повітрі робочої зони, коли вже приміщення знаходиться у функціонуючому стані.

Максимально є допустима кількість часток у повітрі ж робочої зони у функціонуючому стані, виробничих приміщень, яка наведена в *Таблиці 4.16*

Максимально допустима кількість часток у повітрі робочої зони під час технологічного процесу

Класи чистоти	Максимально допустима кількість часток в 1 куб. м	
	Діапазон від 0.5 до 5 мкм	більше ніж 5 мкм
C	3500000	20000
D	*	*

* Вимоги ж до цих зон встановлює виробник при самій валідації технологічного процесу.

Якщо ж, характер технологічного процесу, а також певний вид лікарської форми, що виробляється, то не дозволяють забезпечити клас чистоти за максимально допустимою кількістю часток, тоді ж у виробництві таких нестерильних лікарських засобів є допуск встановлювати клас чистоти тільки за безпосередньо, кількістю життєздатних мікроорганізмів в 1 куб. м повітря.

Технологічні операції, які ж і є найбільш критичними, вже з точки зору можливого забруднення м/о, тоді рекомендується проводити в зонах, які будуть відповідати класу чистоти- С.

Мають бути, також передбачені приміщення (зони) до відповідного класу чистоти і для сушіння, і також термічної обробки одягу, зокрема підготовки персоналу.

Приміщення ж де, безпосередньо, етикується та оформлюється готова продукція, а надалі і зберігання вже готових лікарських засобів, також допоміжних речовин і субстанцій, також прання одягу для працюючих у виробничих приміщеннях можна не проводити контроль вже на вміст часток, а також мікроорганізмів у повітрі.

Україна розробила блок Наказів МОЗ стосовно, яких виробництво нестерильних ЛЗ, де для виробництва твердих форм орального застосування використовують зони класу D (клас 8 ISO в оснащеному стані), а виробництво рідких нестерильних ліків — зони C (клас 7 ISO).

В даному ж, випадку імуностимулятор β -глюкан представляє собою тверду лікарську форму у вигляді капсули для перорального введення, що передбачає виробництво даного нестерильного ЛЗ в зоні чистоти класу D[99].

Підготовка персоналу

Виробник повинен мати необхідну ж кількість співробітників з потрібною кваліфікацією, а також практичним досвідом роботи. Коло обов'язків співробітника не повинно бути великим, аби виключити ризик зниження якості продукції. У НВП персонал умовно підрозділяється на персонал, який, безпосередню приймає участь у самому виробничому процесі – а саме, виробничий персонал і керівний персонал. До керівного ж персоналу належать керівник виробництва, а також керівник відділу контролю якості; окрім того до керівного персоналу належить також вже навчений персонал, що і має необхідну кваліфікацію, а також Уповноважена Особа, якщо ж керівник виробництва або ж керівник відділу контролю якості не відповідає за обов'язки, які передбачені для Уповноваженої Особи. Керівний персонал має працювати повний робочий день, за правило. Керівники виробництва та відділу контролю якості повинні бути незалежні один від одного. Крім того, відомо, що персонал і є головним джерелом забруднень в самих чистих приміщеннях, а також, у тому ж числі і біологічної природи. Біологічно ж небезпечний чинник, який характеризується в основному мікроорганізмами роду *Streptococcus*, які ж містяться у шкірному покриві людини. Запобіжними ж заходами контролю, в даному ж випадку-це спеціальний одяг безпосередньо для чистих приміщень, маски, а також- рукавички. У ряді ж нормативних документів розглядається певний біологічний небезпечний чинник, і превентивні заходи, що і дозволяють утримувати, його під контролем. Наводяться також конкретні приклади заходів, ефективність, яких вже є підтвердженою практикою по експлуатації чистих приміщень у фармацевтичних виробництвах [99]. Як, і було вже зазначено раніше, то одним з базових принципів НВП є наявність вже навченого персоналу, які ж мають необхідну- кваліфікацію. Організація ж, а також- функціонування відповідної системи якості, крім того,

належне виробництво таких лікарських засобів залежать на пряму від людей. Тому обов'язковим є достатня кількість надійного кваліфікованого персоналу[99].

Навчання персоналу. Складовою частиною відповідної підготовки персоналу є організація навчання. На підприємстві, ж в першу чергу, необхідно забезпечити навчання персоналу, а також, деякі службові обов'язки, якого і передбачають перебування у самих виробничих зонах або ж контрольних лабораторіях, а також персоналу, діяльність осанніх може суттєво вплинути на якість продукції. У складі навчання, окрім же основного навчання, що також включає теорію, а також практику GMP, кожний ж прийнятий на роботу робітник повинен пройти також навчання, яке відповідне до обов'язків, які за ним закріплені. Повинні також бути розроблені навчальні програми, а також затверджені відповідно або керівником виробництва, або ж керівником відділу контролю якості. Кожен тип виробництв, а саме: виробництво ж стерильних, а також нестерильних лікарських засобів- потребує формування обов'язково відповідних гігієнічних вимог до персоналу. У зв'язку ж з цим, повинні бути складені і детальні програми щодо гігієни праці, які є адаптовними до різних існуючих потреб підприємства.

Порядком підготовки персоналу до існуючої роботи в приміщеннях, де проходить виробництво нестерильних лікарських засобів повинно виключати будь-яку можливість щодо забруднення одягу.

Для цього ж є необхідним правильно розробити планування кімнат, де буде передано переодягання персоналу. Планування кімнат має передбачати окремі ж гардеробні, душові кімнати для персоналу різної статі.

Персонал має бути ознайомлений, зі стандартною робочою процедурою з підготовки рук. Контроль мікробіологічної чистоти рук персоналу, необхідно проводити відповідно до існуючих Методичних рекомендацій, щодо контролю до мікробіологічної чистоти рук персоналу, який наразі, працює у виробничих приміщеннях, які є затвердженими МОЗ України 14.12.2001 N 502 [99].

При влаштуванні ж, на виробництво, робітникам, необхідно пройти медичний огляд, який є погодженим згідно із наказом Міністерства охорони

здоров'я України N 45 від 31.03.94 року "Про затвердження Положення про порядок проведення медичних оглядів працівників певних категорій". Персоналу, який працює безпосередньо, на виробництві, включаючи тимчасово також працюючих, повинен постійно проходити медичні огляди. До роботи ж, яка пов'язана саме безпосередньо із виготовленням, зберіганням, а також контролем якості лікарських засобів, персонал не повинен допускатися з інфекційними захворюваннями, крім того відкритими ранами на шкірі, а також носії патогенної мікрофлори, доки ж їх стан здоров'я не буде нормалізовано.

Особи, ж які палять, або, які мають хронічний кашель, або ж, у робітників яких проявляється алергія на деякі матеріали та предмети, які експлуатуються у виробництві, не є доцільно залучати до роботи у виробництво нестерильних лікарських засобів у зв'язку із можливим додатковим забрудненням, вказаними особами робочої зони. Персонал, який безпосередньо і приймає участь у виробництві, перед самим влаштуванням на роботу, повинен бути навчений правилам особистої гігієни, а також в подальшому проходити постійно, систематично санітарно-гігієнічне навчання, до того ж, дотримуватися гігієнічних вимог, які і відповідають діяльності. Персонал, обов'язково повинен регулярно приймати душ, мити голову, до того ж не рідше двох разів на тиждень, а особливо ретельно стежити за особистою чистотою рук. Забороняється ж мати довгі нігті. Не повинно допускатися покривати нігті будь-яким лаком. Персонал повинен бути одягнений обов'язково у шапочку, та рукавиці і маску, а також у спеціальний одяг, який повністю має закриває всі частини тіла[99].

Одяг, який є призначений для роботи в таких приміщеннях класів чистоти, необхідно оглядати, а також зберігати до прання вже окремо. Одяг ж працівників із живими м/о до прання, необхідно також піддати відповідній дезінфекції. Прання, а також, сушіння, крім того, термічну обробку і пакування одягу, який є призначений для роботи у приміщеннях для різних класів чистоти, проводити окремо. На кожний ж кілограм одягу, слід використовувати не менше, ніж 10 л розчину мийного засобу. Для прання потрібно використовувати так звані, синтетичні мийні засоби, які відповідають вимогам ГСТУ 64-8-2000 "Належна

виробнича практика. Комплект одягу, які працюють у чистих приміщеннях виробництв медичної, також мікробіологічної промисловості. Загальні технічні вимоги". Після закінчення прання, потрібно прополоскати одяг, при чому не менше двох разів у воді теплій. Остаточне ж, прополіскування проводять у холодній воді. Одяг потрібно віджати в центрифугі, після чого струсити, розвісити його по комплектах на плечиках, а також висушити. Сушити одяг необхідно у спеціальній шафі, в яку надходить тепле повітря через фільтр тонкого очищення. Комплект одягу необхідно піддати термічній обробці, в спеціальному паровому стерилізаторі, до вимог ГСТУ 64-8-2000 "Належна виробнича практика. Температура ж для прасування має становити максимально допустиму норму для кожного ж типу тканини. При чому, не рідше раз у тиждень, необхідно провести вологу обробку взуття в наступній послідовності:

- по-перше, промити одяг 0,5 %-м розчином мийного засобу;
- по-друге, прополоскати водою очищеною;
- по-третє, провести дезінфекційну обробку;
- по-четверте, прополоскати водою очищеною;
- по-п'яте, висушити[99].

Підготовка дезінфікувальних засобів

Необхідно на виробництві, виділити приміщення для зберігання миючих та дезінфікуючих засобів, інвентарю, а також матеріалів, що застосовуються при збиранні приміщень та обробці обладнання.

Також, необхідно проводити чергування дезінфікуючих засобів для запобігання стійких форм мікроорганізмів. Дезінфікуючі розчини повинні бути обов'язково стерильні. Аби уникнути зростання м/о, розбавлені розчини слід зберігати обмежений час в заздалегідь підготовлених ємкостях. Частково заповнені ємності можна доливати свіжоприготовленими розчинами[99].

Для дезінфекції обладнання застосовують 3-ри та 6-ти % розчин перекису водню, який у концентрації 3-ри% має бактерицидну та фунгіцидну дію, а в концентрації 6-ти% - спороцидну. Крім того, використовують 76% розчин етиового спирту.

Після чого необхідно обрати дезінфікуючі засоби для обробки поверхонь. Порівняння дезінфікуючих засобів для обробки поверхонь приміщень наведено у *табл.*

4.17

Таблиця 4.17

Порівняння дезінфікуючих засобів для поверхонь

Дез. засіб	Діюча речовина	Властивості	Спектр дії	Вартість за 1 л
“Бланідас актив” [100].	третинні аміни, ЧАС	Розчин стабільний та при зберіганні не розкладається. Відсутність запаху. Термін зберігання невикористаного робочого розчину засобу становить -16 діб.	Мають бактерицидну, туберкулоцидну, віруліцидну, фунгіцидну, спороцидну дію.	375 грн
“Санікон” [101].	Комплекс четвертинних амонієвих сполук (ЧАС)	Рідкий лужний концентрований миючий дезінфікуючий засіб з посиленою миючою дією для дезінфекції, передстерилізаційного очищення, щоденних, а також генеральних прибирань та санітарної обробки.		350 грн
“Сараклін” [102].	Етанол, бензаконій хорид	Ефективний відносно грам негативних та грам позитивних бактерій (в т.ч. мікобактерій туберкульозу), вірусів, пліснявих грибів роду <i>Candida</i> , дерматофітів, а також спороутворюючих бактерій. Термін зберігання невикористаного робочого розчину засобу становить 14 діб.		165 грн
“БіоЛонг” [103].	ІПС ЧАС	Запобігає розмноженню бактерій, та плісняви на обробленій поверхні протягом 14 діб; Термін зберігання невикористаного робочого розчину-7 діб (при зберіганні в закритому контейнері можуть бути використані повторно). Ефективний відносно грам, а також, негативних та грам позитивних бактерій (в т.ч. мікобактерій туберкульозу), вірусів, пліснявих грибів роду <i>Candida</i> , дерматофітів, а також спороутворюючих бактерій.		308 грн

Так як, дезінфікуючі розчини необхідно чергувати, при чому кожні 3 місяці, аби не розвивалася резистентність м/о, необхідно обрати для порівняння два дезінфікуючі засоби. До того ж, терміни зберігання невикористаних робочих розчинів становить у “Сараклін”-14 діб, у “БіоЛонг” -7 діб, що є зручним фактом на виробництві, а також вказані антисептики є відносно не дорогими, серед представлених.

Для обробки ж рук персоналу порівняємо дезінфікуючі засоби, які наведене у *табл. 4.18*

Вибір дезінфікувального засобу для обробки рук персоналу

Дез. засіб	Діюча речовина	Властивості	Спектр дії	Вартість за 1 л
“Sterillium”	2-пропанол - 45 г 1-пропанол - 30 г Мецетроний етилсульфат (INN) - 0.2 г	Зменшує транзиторну мікрофлору шкіри переважно за 30 секунд у 100000 разів; а також, ефективний і проти резидентної мікрофлори шкіри;крім того, швидкодіючий засіб, який зберігає свою дію протягом 1 години на незахищеній шкірі рук та протягом 3 годин під медичними рукавичками; не дратує шкіру, а також не порушує водно-жировий баланс шкіри.	Засіб має фунгіцидну, туберкулоцидну і пролонговану бактерицидну дію в т.ч. проти видів наведених бактерій та їх штамів, а також штамів, резистентних до антибіотиків: <i>Acinetobacter baumannii</i> ; <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ; <i>Acinetobacter lwoffii</i> ; <i>Bacteroides fragilis</i> ; <i>Burkholderia cepacia</i> ; <i>Clostridium difficile</i> ; <i>Enterobacter aerogenes</i> ; <i>Enterobacter cloacae</i> ; <i>Enterococcus faecalis</i> ; <i>Enterococcus faecium</i> ; <i>Haemophilus influenzae</i> ; <i>Micrococcus luteus</i> ; <i>Proteus mirabilis</i> ; <i>Salmonella enteritidis</i> ; <i>Serratia marcescens</i> ; <i>Shigella sonnei</i> ; <i>Staphylococcus hominis</i> ; <i>Staphylococcus saprophyticus</i> ; <i>Streptococcus pyogenes</i> ; <i>Vibrio cholera</i> , та ін. Препарат має віруліцидну дію, в т.ч. щодо вірусів гепатиту В і С, ВІЛ, герпесу типу 1 (герпес лабіаліс) та герпесу типу 2 (герпес геніталіс), рота-, поліома-, вакцинія-, аденовіруси, віруси грипу А, пташиного грипу, SARS - асоційовані з SARS-CoV).	280 грн
“БіоЛонг”	пропанол-1, пропанол-2, ЧАС	Не містить альдегідів, фосфатів, барвників.	Має віруліцидну (включаючи гепатит В,С, ВІЛ), бактерицидну, туберкулоцидну, фунгіцидну активність	316 грн
“Септік”	Етиловий спирт,ізопропіловий спирт, бензалконій хлорид	Не викликає подразнень та алергічних реакцій шкіри.		408грн
“АХД 2000 ультра”	етанол 75%	Не викликає подразнень, також алергічні реакції шкіри. Є комплексом догляду за шкірою, захищає шкіру рук від сухості.		298 грн

Отже, найдоцільніше використовувати засіб *Sterillium*, оскільки його перевагами є знищення широкому спектру бактерій та вірусів, а також відносно невисоку вартість в порівнянні з іними антисептиками, так як дезінфікувальні засоби необхідно змінювати кожні 3 місяці, оберемо на заміну ‘‘АХД 2000 ультра’’, який також має порівняно невисоку вартість.

Підготовка вентиляційного повітря

У системі ж подачі вентиляційного повітря, у виробничі приміщення класу С і D чистоти застосовують неоднаправлений повітряний потік. Системи ж вентиляції та кондиціювання повітря мають бути обладнані звуковбиральними й віброгасячими пристроями, які безпосередньо, знижують рівень шуму та вібрації до заданих меж, автоматичним регулюванням температури та вологості, блокуванням, та сигналізацією. Рекомендується використовувати рециркуляцію повітря, окрім технічно обґрунтованих випадків, які враховують токсичність і вибухонебезпечність матеріалів та технологічних середовищ, що застосовуються. Повітроводи ж, слід періодично очищати та проводити їх дезінфекційну обробку[99].

Повітроводи, фільтрувальні камери та їх конструкції мають бути виготовлені з матеріалу, який є стійким до дезінфекційних розчинів. Обробка повітроводів дезінфекційними розчинами є обов'язковою для виробничих приміщень, які підлягають контролю на вміст м/о в повітрі. Очищення припливного повітря має бути ступінчастим. Кількість рівнів для очищення повітря обумовлюється необхідною чистотою повітряного середовища приміщення[99].

Очищення повітря, у виробничих приміщеннях класів чистоти С і D має бути тріступінчастим. На кожному рівні очищення слід використовувати фільтри, які по ефективності фільтрації відповідають вимогам європейських стандартів EN 779 та EN 1822. для виробничих приміщень D класу чистоти:

- 1 рівень - не нижче класу G3;
- 2 рівень - не нижче класу F6;
- 3 рівень - не нижче класу H11.

На кожному ж рівні очищення повітря необхідним є передбачити штуцери із метою відбору проб для повітря і визначення концентрації механічних часток до та вже після здійснення фільтрації. Заміну ж фільтра для тонкого ж очищення проводять по мірі його забруднення, відповідно до даних так званого, різницевого манометра, який і вимірює різницю тиску повітря, а також надходить на фільтр і безпосередньо, що виходить вже після фільтрації. Після заміни ж вискоефективного фільтра, необхідно провести перевірку повітряного середовища на відповідність встановленому класу чистоти для вже даного виробничого приміщення.

Кратність повітрообміну ж у виробничих приміщеннях класу D становить- 10 об'ємів за годину.

Комфортну температуру в виробничих приміщеннях, слід підтримувати в межах $(21 \pm 2) ^\circ\text{C}$ взимку і $(23 \pm 2) ^\circ\text{C}$ влітку, та відносну вологість повітря у межах від 30 до 50 % [99].

Обладнання для очистки повітряних аерозолів

Як правило, забір повітря проводиться з атмосфери (зовні) за допомогою спеціальних трубчастих конструкцій висотою 8-10м. Труба розташовується в місцях з мінімальною запиленістю і загазованістю. Повітря проходить крізь решітку встановлену у повітропроводі для видалення крупних механічних часток [99].

Попередня очистка повітря від механічних контамінантів і частини

біологічних контамінантів.

Попередня очистка повітря від механічних контамінантів має своєю метою видалення аерозольних механічних часток та після попередження абразивного пошкодження компресійної апаратури. Для виконання цієї операції використовують фільтри попередньої очистки, вони встановлюються у всмоктуючій лінії перед компресором або вентилятором; дозволяють видалити частки розміром більше 5мкм. Описане очищення дозволяє позбутися пилу, крапель вологи та частково м/о. Як правило коефіцієнт проскоку складає 10% від загального вмісту твердої фази (пилу).

Вибір фільтрів попередньої очистки, здійснюють з двох типів фільтрів: сухі та масляні.

У підготовці технологічного вентиляційного повітря масляні фільтри небажані.

За технологічними ознаками фільтри попередньої очистки бувають періодичної дії та безперервної дії. До фільтрів періодичної дії відносять: касетні масляні, що регенеруються та сухі касетні із змінними картриджами. Прикладом коміркових фільтрів слугують, так звані *ситові* фільтри Рекка. Фільтр має 10-15 шарів сітки або перфорованих листів з металу або ж вініпласту[99].

В якості фільтруючого матеріалу можна використовувати пінополіуритан, а також скляне або хімічне волокно та інші неткані матеріали. Ці фільтри вільні від недоліків масляних фільтрів –а саме: запах, втрата масла.

Транспортування повітря

Атмосферне повітря, попередньо очищене від абразивних часток пилу, транспортують до споживача. Транспортування повітря супроводжується його стисканням, після чого його і направляють у систему повітропостачання.

Ця стадія необхідна для того, аби забезпечити належний об'єм подачі повітря і відповідний до технологічних вимог тиск повітря. Нагнітання повітря здійснюється за допомогою вентиляторів (низького або середнього тиску), компресора (турбокомпресора)[99].

У біотехнологічних процесах, де відбувається культивування біологічного агента технологічне повітря транспортують за допомогою вентиляторів високого тиску або ж компресорів. Компресор здійснює адіабатне стискання повітря до тиску- 0,2 МПа, в наслідок чого повітря може розігріватися більше ніж до 100 - 120 °С. Такий тиск потрібний аби здолати гідродінамічного опору в системі транспортування повітря та стовпа культуральної рідини у ферментері. Турбокомпресори ж, працюють в безперервному режимі і обов'язково мають набір резервних.

При адіабатичному стисненні повітря нагрівається до температури в діапазоні 100-200°C, тому його треба охолоджувати до оптимальної температури культивування[99].

Вентилятори

Для забезпечення повітрям крупнотонажного виробництва використовують компресори з діапазоном продуктивності 10- 970 – 1470 м³/хв та тиском 0,8 – 0,9МПа. Потужність електродвигуна – 75 – 35000 – 12000 кВт[99].

Регулювання та стабілізація термодинамічних показників

Метою регулювання та стабілізації термодинамічних показників є надання припустимого рівня вологості. Тим самим, надмірна вологість призводить і до конденсації парів води, а також змочування частинок самого фільтрувального матеріалу. Особливо даний процес є неприпустимим, при використанні самих волокнистих фільтрувальних матеріалів.

Сама система регуляції, і крім того, стабілізація термодинамічних показників повинна реалізується в самому уніфікованому устаткуванні (а саме, теплообмінник та ресивер), що також повинна забезпечити, відповідно до вимог технології необхідну температуру, а також вологість повітря. Всі ці функції можна реалізувати у кондиціонері[99].

У приміщеннях з відповідним рівнем чистоти C/D існує практика обмежувати горизонтальні ділянки повітряних потоків. Значення горизонтальних ділянок, що рекомендуються для застосування, не більше 4,2 - 4,8 м. Таким чином, у кімнаті шириною не більше 8,4–9,6 м припустимо установити витяжні ґрати по периметру стін. У приміщеннях режиму чистоти C/D, безпосередньо, із установкою фільтрів HEPA (а саме, 3 рівні очищення повітря)і, можуть бути використані, як стандартні стельові повітророзподільники так званої системи кондиціонування. Крім того, схема циркуляції повітря, а також аналогічна прийнятої в приміщеннях кондиціонування. Відповідно ж, до вже існуючого в практиці чистих кімнат, саме при схемі циркуляції «зверху- вниз», саме тут також рекомендується і нижня установка так званих, настінних витяжних ґрат. Щодо розміщення витяжних ґрат, то нагорі в самій робочій чистій зоні можуть

утворюватися так звані області із високою концентрацією зважених часток, а також, особливо і в період інтенсивної роботи.

Недоліком ж неупорядкованої циркуляції повітря, саме в чистих кімнатах є поява зон із високої запиленістю. Саме такі зони можуть існувати в необмежений час, а потім- зникати.

Це відбувається при взаємодії повітряних потоків, які виникають у результаті виробничої діяльності, та неупорядкованих припливних потоків. Для цього необхідно відтворити таку односпрямовану циркуляцію шляхом використання підшивної стелі-повітророзподільника, і створити зони із підвищеного тиску, а саме між основною та підшивною стелею. Для цього ж і були використані, так званий перфорований пластик або ж, алюмінієві панелі чи екран, виконаний із тканих, а також нетканих матеріалів. У результаті в приміщенні формується упорядкований односпрямований потік зі швидкостями значно більше низькими, ніж у чистих кімнатах із твердим режимом. Створений так званий ефект витиснення, потоком припливного повітря, також перешкоджає утворенню зон із підвищеної запиленістю, а також у цілому дозволяє домогтися більше високого рівня чистоти. У виробничих приміщеннях, у яких зовсім не проводиться контроль на вміст часток та мікроорганізмів у повітряному середовищі, відносна ж вологість повітря, необхідна скласти від 40 до 60 %[99].

Вибір первинної упаковки ЛЗ

Капсули найчастіше упаковують у блістерні упаковки або ж скляні флакони чи пластикові баночки. У таблиці 1.1 наведено порівняльну характеристику даних упаковок.

Отже, беручи до уваги ряд переваг вказаних у таблиці, буде обрано пастиковий флакон в якості первинної упаковки капсул, що містять 0,5 г діючої речовини β -глюкану. 60 капсул у флаконі(саме така кількість капсул розрахована на курс лікування/профілактики імунodefіцитного стану).

Таблиця 4.19

Порівняння різних типів первинної упаковки готового лікарського засобу на основі β -глюкану.

Характеристика	Блістер	Скляні флакони	Пластикові баночки
Розміщення капсул в упаковці.	Кожна капсула знаходиться у окремій комірці і відокремлена від інших капсул.	Флакон вміщає більшу кількість капсул, повністю на курс прийому.	
Герметичність	Блістер герметично закритий і оберігає препарат від контакту із зовнішнім середовищем, проте має ймовірність пошкодження під час транспортування(проколу).	Найнадійніший варіант фасування, зручні при транспортуванні і зберігаються в практично будь-яких умовах.	
Вартість та зручність застосування	Дешевша вартість, порівняно з вартістю скляного флакону. Проте дорожчий в порівнянні з пластмасовим флаконом.	Більш дороговартісний тип упаковки Присутній ризик розбиття скляного флакону.	Найбільш економічно-вигідний тип упаковки

Процес ж упаковки, складається із наступних вказаних нижче технологічних стадій: 1) стадії підготовки до процесу упаковки; 2) після чого ж, упаковка лікарських засобів в саму споживчу тару (фасування капсул у безпосередньо флакони, а також -закупорювання флаконів); 3) після чого упаковка лікарських засобів в картонну тару; а вже після- упаковка в групову тару; і останнє- упаковка в транспортну тару.

При отриманні партії тари, а також, самих пакувальних матеріалів, необхідна перевірка, безпосередньо, на відповідність специфікації, а також відсутності пошкоджень упаковки її чистоту та наявність документів, які і задовольняють якість тари, а також упаковачних матеріалів.

Тара, а також допоміжні пакувальні засоби та спеціальні матеріали, прямо надходять у виробництво на їх відповідності вимогам служб контролю якості та нормативної документації.

Допоміжні пакувальні засоби із мікробним забрудненням, а також пакувальні матеріали, які б перевищували дані встановлені норми, або ж наявністю механічної забрудненості при яких необхідно проводити так звану, додаткову обробку, а безпосередньо, мийку та стерилізацію, відповідно ж до технологічної інструкції процесу обробки; а також методики проведення робіт: мийка, стерилізація; інструкції по самому зберіганню, а також між цехового транспортування стерильних або ж «чистих» засобів таропакувальних.

Для миття необхідно використовувати воду питну або очищену.

Ополіскування тари для нестерильних лікарських засобів повинна бути використовувана вода очищена.

Коли проходить транспортування тари, а також закупорювальних засобів із одного із приміщення в інше, тоді повинно бути передбачені, так звані спеціальні пристрої або ж контейнери, що і, виключають можливість їх повторного забруднення (прикладом є виробнича полімерна тара, спеціально для фармацевтичного виробництва, місткістю 18, 22, 24 і 28 л по ТУ 64-7-674).

Кожна ж одиниця упаковки необхідна бути забезпечена етикеткою або ж, текстом самої етикетки, яка повинна бути нанесена вже, безпосередньо, на саму упаковку.

Виготовлення друкованих матеріалів має бути організовано так, аби ж уникнути можливість їх змішування. Етикетки ж, для кожного найменування лікарського засобу неохідні зберігатися окремо ж, в контейнерах або, приміщеннях для їх зберігання.. Транспортування друкованих матеріалів з приміщень для зберігання до ліній маркування та вже до самої упаковки необхідно бути організованим таким чином, аби ж унеможливити підробки та змішування із самими етикетками, призначеними вже, безпосередньо, для маркування інших існуючих лікарських засобів[108].

Розділ 5. Опис технологічного процесу виробничого біосинтезу

Специфікація обладнання, яка є зображеною на апаратурній схемі, наведена у представленій *таблиці 5.20*, нижче.

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.01 КР ПЗ</i>			
<i>Зм.</i>	<i>Арк</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розробив.</i>	<i>Багатиренко</i>				<i>Розділ 5.</i> <i>Опис технологічного процесу</i> <i>виробничого біосинтезу</i>	<i>Літера</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Консульт</i>							102	192
<i>Керівник</i>	<i>Тетеріна С.М</i>					102 <i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Зав.Кафедр</i>	<i>Стабніков В.П</i>							

5.1 Специфікація обладнання ділянки виробничого біосинтезу

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
Д-1,Д-4,Д-15,Д-21,Д-24,Д-30,Д-33,Д-39,Д-42	Дозатор об'ємно-ваговий	9	Технічні ваги для дозування компонентів середовищ Продуктивність: 1000 кг доз/ год. Похибка-1%. Виробник: «Хімтест» (Україна). https://chemtest.com.ua/ua/vesovoe_oborudovanie-ua
Н3,Н7, Н18, Н27,Н36, Н45,Н48.	Насос відцентровий	7	Насос фірми Debem MB 100, який виготовлений із сталі, високоякісного матеріалу. Продуктивність якого становить- 90,0 м ³ /год. Потужністю електродвигуна є 120кВт. Виробник: «Debem» (Україна) www.debem.com.ua
Р-2	Реактор-змішувач для приготування розчину соляної кислоти	1	Збірник об'ємом- 40л, оснащений перемішувальним пристроєм, матеріал сталь. Виробник: «BioTechno Group»(Росія) https://biostat.ru/
Ф-5,Ф-16,Ф-19,Ф-22,Ф-25,Ф-28,Ф-31,Ф-34,Ф-37,Ф-40,Ф-43,Ф-46.	Індивідуальний фільтр стерильного повітря	12	Фільтруючим матеріалом є боросилікат, який характеризується підвищеною термічною стійкістю. Діапазон температури лежить в межах від -20 до 200 °С; а ступінь очищення повітря даним фільтром становить- 99,999 %. Виробником є американська фірма: «Donaldson». http://www.emea.donaldson.com

P-6	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації розчину NaOH	1	Об'єм становить- 40л, який оснащений сорочкою, а також перемішувальним пристроєм, матеріал-сталь AISI 316. Виробником є фірма: «BioTechno Group»(Росія) https://biostat.ru/
ПЗ-8	Пристрій забірний	1	Містить наступні елементи :корпус, а також сам транспортує трубопровід, та магістраль подачі повітря. Повітрозбірник- АІІ- 019.000-01. Також оснащений металевою сіткою задля видалення забруднення. Фірма: «НПЦ Вектор-Кондвент». https://biostat.ru/
Ф-9	Фільтр попередній	1	Робочий тиск попереднього фільтра для очищення повітря - 16 (12 бар) Продуктивність становить -75 до 3600 Нм ³ / год https://biostat.ru/
K-10	Компресор	1	Компресор типу Inversys Plus з прямим приводом. Максимальний робочий тиск становить- 1,0 МПа. Виробником є турецька фірма: «Dalgakiran». https://biostat.ru/
T-11	Теплообмінник-охолоджувач	1	Канальний, водяний фірми- Systemair VBR. Максимальний робочий тиск якого складає :1,6 МПа, при температурі води -100 °С. Виробником є: «Systemair» (Швеція). http://www.dalgakiran.com.ua
P-12	Ресивер-вологівдільувач	1	Ресивер типу Р 270.600. Об'єм ресиверу-270 л, а робочий тиск становить -1,0 МПа. Виробником є фірма: «ДНТ-Прайм Група компаній, ООО» (Росія). https://newfilter.com
T-13	Теплообмінник-нагрівач	1	Повітрянагрівач канальний, водяний фірма: Systemair VBR. Максимальний робочий тиск становить- 1,6 МПа, при температурі ж води- 100 °С. Виробником є: «Systemair» (Швеція). http://www.dalgakiran.com.ua
Ф-14	Фільтр головний	1	Фільтруючим матеріалом є – сітка, із нержавіючої сталі, швидкість фільтрування якого становить– 0,025 м/с, Е = 95 %. Виробником є: «Donaldson» (США). http://www.emea.donaldson.com

P15	Реактор-змішувач для попереднього розчинення композиції А	1	Об'єм становить -10 л, реактор оснащений сорочкою, крім того, лопатевою мішалкою, із матеріалу стаї типу AISI 316. Виробником є фірма: «BioTechno Group»(Росія) https://biostat.ru/
P17	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації композиції Б	1	Об'єм становить- 10 л, реактор оснащений сорочкою, крім того, лопатевою мішалкою, із матеріалу стаї типу AISI 316. Виробником є фірма: «BioTechno Group»(Росія) https://biostat.ru/
ФР20	Ферментер (інокулятор) (20л)	1	Об'єм становить- 20л, реактор оснащений сорочкою, крім того, лопатевою мішалкою, сталь типу AISI 316. Виробник: «Biostat»(Росія) https://biostat.ru/
P23	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації композиції А	1	Реактор-змішувач об'ємом 100л, оснащений сорочкою, крім того, лопатевою мішалкою, із матеріалу стаї типу AISI 316. Виробником є фірма: «BioTechno Group»(Росія) https://biostat.ru/
P26	Реактор-змішувач для попереднього розчинення композиції Б	1	Об'єм становить- 100л, реактор оснащений сорочкою, крім того лопатевою мішалкою, сталь типу AISI 316. Виробник: «Biostat»(Росія) https://biostat.ru/
ФР29	Ферментер (інокулятор) (200л)	1	Об'єм становить- 800л, оснащений сорочкою, крім того лопатевою мішалкою, сталь типу AISI 316. Виробник: «Biostat»(Росія) https://biostat.ru/
P32	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації композиції А	1	Об'єм становить-1000л, оснащений сорочкою, крім того лопатевою мішалкою, сталь типу AISI 316. Виробник: «Biostat»(Росія) https://biostat.ru/

P35	Реактор-змішувач для попереднього розчинення композиції Б	1	Об'єм становить- 1000 л, оснащений сорочкою, крім того лопатевою мішалкою, сталь типу AISI 316. Виробник: «Biostat»(Росія) https://biostat.ru/
ФР38	Ферментер (інокулятор) (2000л)	1	Об'єм становить 1000л, оснащений сорочкою, крім того лопатевою мішалкою, сталь типу AISI 316. Виробник: «Biostat»(Росія) https://biostat.ru/
P41	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації композиції А	1	Реактор-змішувач, об'єм становить-10000л, оснащений сорочкою, крім того лопатевою мішалкою, сталь типу AISI 316. Виробник: «Biostat»(Росія) https://biostat.ru/
P44	Реактор-змішувач для попереднього розчинення Б композиції Б	1	Реактор-змішувач, об'єм становить-10000л, оснащений сорочкою, крім того лопатевою мішалкою, сталь типу AISI 316. Виробник: «Biostat»(Росія) https://biostat.ru/
ФР-47	Ферментер 20000л	1	Об'єм становить- 20000л, Діаметр становить-3,6м, а висота-12,96м. Ферментер оснащений сорочкою, а також барботером, пробовідбірником та перемішуючим пристроєм 3000 об/хв, матеріал сталь типу- AISI 316L. Виробник: «BIOSTAT» (Росія). https://biostat.ru/

36-49	Збірник для культуральної рідини	1	<u>Об'єм</u> 10м ³	Матеріалом є сталь нержавіюча типу AISI; Збірник обладнаний сорочкою, а також оснащений перемішуючим пристроєм; Виробником є – Росія. https://www.sibmashpolymer.ru/proekty/rektori_s_peremesh_ustroistvom
36-51	Збірник для реагентів	4	40л	
36-54				
36-57				
36-60				
P-66 P-71,75	Реактор	4	10м ³	
H-50 H-53 H-56 H-59 H-62 H-64	Насос перистальтичний	6	Матеріал: високоякісна сталь, Продуктивність до 94 м ³ /год, Можливе перекачування в'язких розчинів, Максимальна подача на висоту до 10 м, Виробник - Компанія "Далгакиран" Італія. https://watton.ua/ebara-nasos-3lm4e-32-160-037.html	
H-65 H-67 H-69 H-70 H-72 H-74 H-76	Насос відцентровий	7	Насос 3LM4E 32-160/0.37 потужністю 0.37 кВт з торцевим підключенням у відповідності із стандартом EN 733 виготовлений із нержавіючої сталі AISI 316. Подача на висоту до 9 м; Номінальний напір 80 метрів, максимальний-105 метрів. Продуктивність (макс): до 72 м ³ /год. Виробник – Ebara Німеччина. https://dalgakiran.ua/uk/products/vidcentrovi-nasosy	

Д-52 Д-55 Д-58 Д-61	Дозатор об'ємно-ваговий	4	Дозатор розроблений для рідких, а також сипучих компонентів, має напівавтоматичний ДВСВ-S Дозатор виконаний із матеріалу -нержавіючої сталі. Установка дозатора в межах від 0,2-1000 кг/доз. Продуктивність дозатора становить- 1000 кг доз/год. Похибка 0,1 %. Виробник – «Политехник» Росія. https://polytechnic.com.ua/products-rus/dvsv-s-rus/
С-63 С-68	Сепаратор Альфа Лаваль BRUX	2	Сепаратор з автоматичним періодичним відцентровим розвантаженням осаду. Продуктивність – 10 м ³ /год. Повністю герметична сепараційна система, яка призначена для видалення часток розмірами в межах від 0,5 до 500 мкм з рідини. Оптимізовано також для систем СІР. Виробником є фірма – «ХодПрофі» оґруп, Росія. https://www.alfalaval.ru/products/separation/centrifugal-separators/separators/brux/
УФ-73 УФ-77	Ультрафільтраційна установка	2	Фільтруюча поверхня – від 8 до 16 м ² , яка являє собою пучок, так званих, порожнистих волокон, які виготовлені із гідрофільного матеріалу- PVDF. Діаметром пор 25 та 6 нм відповідно. Продуктивність – 1250 кг/год. Виробник – «ЕвроМаш» Україна. http://euromash.kiev.ua/ru/nutch_filtr_ru.php7

T-78 T-80 T-82 T-84	Транспортер стрічковий	4	Дозволений на біотехнологічних виробництвах. Максимальна довжина – до 8 м. Має продуктивність – до 10 т/год (регулюється) Виробником є – «Артмаш» Росія. https://artmash.ua/ru/category/transportery
СП-79	Розпилювальна сушарка	1	Максимальна температура на вході - 120 ° С. Продуктивність з випарювання -0,2 л/год Н2О. Частота розпилення 80-140 кГц. Потік повітря-80-160 л/хв. Інтерейс-USB II. https://dlu.com.ua/Розпилювальна-сушарка-Nano-Spray-Dryer-B-90-HP
Д-81	Дробарка молоткова	1	Характеризується тангенціальним підводом повітря- ДМ-60. Потужність становить - 250 кВт Діаметр сита становить- 0,3-1,5 мм. Виконана із харчової сталі, нержавіючого матеріалу. Насипна щільність становить- 0,2 - 0,8 кг/дм ³ при вологості до 15%. Виробником є –« Bühler ” Швейцарія. https://former.buhlergroup.com/europe/ru/2103.htm
ФМ-83	Фасувальна машина	1	Фасувальна машина ФСВ-50. Має потужність- 6,5 кВт 380 ± 10% 50Гц, а пакувальні матеріали: представлені мішками з водонепроникної алюмінієвої фольги. Продуктивність: 500 мішків/год. Виробник –«PachTech” США. https://packtech.com.ua/oborudovanie/fasovochnoe/avtomaty
ММ-85	Маркувальна машина	1	Маркувальна машина VARIOZET. Застосування - для мішків. Продуктивність – 3600 штампів/год. Виробник –« Skilt ” Китай. https://www.spt-ukr.com/item/i537

Розділ 5.2 Опис технологічної схеми виробничого біосинтезу.

ДР 1. Підготовка аераційного повітря

ДР 1.1. Забір атмосферного повітря

При визначенні потрібного місця забору атмосферного повітря, потрібно враховувати існуючі, а також можливі джерела газоподібних забруднень, а саме: автотранспорт; газоподібні; промислові викиди та інші фактори.

Враховуючи, той факт, що висота будівлі підприємства, становить близько 13 м, то забір атмосферного повітря відбудеться на висоті вже близько 2–4 м над будівлею, таким чином- 15 м. Забір повітря здійснюється, безпосередньо, повітрозбірником (ПЗ – 8).

ДР 1.2. Грубе очищення повітря від пилу та часточок

На даній стадії із самого повітря видаляється, ж основна маса як великих механічних часточок, а також, і пилу. Для цього ж використовують фільтри так званої грубої очистки (Ф-9) Ступінь очищення, яких становить - 80 %.

ДР 1.3. Стиснення повітря

Здійснюють за допомогою турбокомпресора (К-10), так повітря стискають до 0,35–0,5 МПа, при цьому ж повітря нагрівається до 120–200 °С.

ДР 1.4. Охолодження повітря та видалення вологи

Повітря «переохолоджують» приблизно до 25°С в теплообміннику-охолоджувачі (Т-11). А далі вже у ресивері (Р-12) відбувається і видалення вологи до $W = 60 \%$.

ДР 1.5. Стабілізація термодинамічних показників

Повітря підігрівають(45-50°С) у самому теплообміннику (Т-13) вже для забезпечення надійної роботи даних фільтрів. При таких саме температурах, також не відбувається конденсація пари вже на волокнах фільтра.

ДР 1.6. Очищення повітря в головному фільтрі

Очищення ж повітря у саме головних ємнісних набивних фільтрах (Ф-14) відбувається до ступеня очищення $E=95\%$. Головні фільтри ж, зазвичай, встановлюють поблизу саме ферментаційних відділень.

ДР 1.7. Очистка повітря в індивідуальному фільтрі

Повітря від головних фільтрів саме через трубопроводи (або ж колектори) подаємо вже до індивідуальних фільтрів, які встановлені, безпосередньо, на ферментері(Ф-5,Ф-16,Ф-19,Ф-22,Ф-25,Ф-28,Ф-31,Ф-34,Ф-37,Ф-40,Ф-43,Ф-46). При цьому ж, повітря очищають до ступеня очищення наближеного до $E = 99,99\%$).

ДР 2. Підготовка титрувальних агентів

ДР 2.1 Підготовка титрувальних агентів для підготовки поживних середовищ для накопичення інокуляту.

Кількість титрантів, а саме (6 %-го розчину HCl та 6%-го $NaOH$), які ж, необхідно приготувати буде становить- 2 мл на 1 л середовища. Так як, їх кількість на етапах: підготовки середовищ для отримання посівного матеріалу є не великою, тоді буде доцільно об'єднати дані стадії для приготування цих розчинів.

ДР 2.1.1. Приготування розчину 6% HCl

У колбу об'ємом 2 л вносять 1669,4мл питної води і 106,6 мл 36% соляної кислоти, перемішують та отримують 1776 мл 6% соляної кислоти.

ДР 2.1.2. Приготування та стерилізація розчину 6% $NaOH$

На технічних вагах у відтарованому хімічному стакані зважують 106,6 г їдкого натру, засипають у колбу об'ємом 2 л, після чого додають 1669,4 мл питної води отримують 1776 мл 6% їдкого натру. Перемішують та стерилізують у автоклаві при температурі $131^{\circ}C$ протягом 30 хвилин.

ДР 2.2 Підготовка титрувальних агентів для підготовки поживного середовища для біосинтезу.

ДР 2.2.1. Приготування 6% розчину HCl .

У реактор (Р-2) об'ємом 40 л через об'ємно-ваговий дозатор (Д-1) вносять 19,4 л питної води, після чого вносять 0,6 л 36% соляної кислот, перемішують та отримують 20 л 6% соляної кислоти.

ДР 2.2.2. Приготування розчину 6% $NaOH$

На технічних вагах зважують 2,4кг їдкого натру, засипають у ректор (Р-6)об'ємом 40 л, через об'ємно-ваговий дозатор (Д-4) вносять 0,6 кг їдкого натру, після чого додають 19,4 л питної води отримуючи 20 л 6% їдкого натру. Перемішують та стерилізують пропусканням гострої пари при температурі 131 °С протягом 30 хвилин.

Розрахунок: $6 \cdot (10000/100) = 600\text{г}$ (0,6кг) їдкого натру; $20 - 0,6 = 19,4\text{л}$ води.

ДР3. Приготування та стерилізація запасного розчину солі для накопичення інокуляту в колбах на качалці.

ДР 3.1 Приготування та стерилізація запасного розчину солі для накопичення інокуляту в колбах на качалці.

На технічних вагах зважують 0,34 г MgSO_4 та 0,54г NH_4Cl , засипають у колбу об'ємом 3 л, після чого додають у колбу 1998 мл водопровідної води, після чого вже колбу закривають ватно-марлевою пробкою, а також стерилізують в автоклаві при вжє температурі 131°C та тиску 0,5 атм протягом 40 хв. Таким чином використовуємо 2 мл розчину мікроелементів вже на 1 л поживного середовища, кількість солі становитиме – 1л. Стерилізація розчину солі буде проходити у колбі в автоклаві при температурі 131°C протягом 30 хвилин.

ДР 4. Приготування та стерилізація поживних середовищ

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

**Розрахунок вмісту компонентів для приготування 0,001м³
середовища**

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 0,001 м³ середовища, кг	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Глюкоза	15	0,015	А	0,02
Дріжджовий екстракт	0,5	0,005		
Вода	0,7			
K ₂ HPO ₄	5,2	0,05	В	0,05
КН ₂ РO ₄	3,18	0,003		
Вода	0,24			
Запасний розчин солі	0,002		С	0,008
Разом	0,001 м³			

ДР 4.1.1. Приготування і стерилізація композиції А

На аналітичні ваги зважуємо 0,015кг глюкози, таруємо і зважуємо ще 0,005 кг дріжджового екстракту. Переносимо у колбу об'ємом 2 л. Далі заливаємо 0,7 л води, а також ретельно перемішуємо суміш, аби вже утворилася однорідна суспензія, тоді за тим, закриваємо колбу ватно-марлевою пробкою і починаємо процес стерилізації вже в автоклаві при температурі 112°C, а також тиску 0,5 атм протягом 30 хв.

ДР 4.1.2. Приготування і стерилізація композиції В

На аналітичних вагах відтаровуємо та зважуємо 0,05 кг K₂HPO₄, 0,003кг- KN₂PO₄, переносимо у мірну колбу об'ємом 1 л, після чого додаємо 0,24 л водопровідної води, закриваємо колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізуємо в автоклаві при температурі 112°C та тиску 0,5 атм протягом 30 хв.

*ДР4.2 Приготування поживного середовища для вирощування інокуляту
в інокуляторі об'ємом 0,02 м³ (див.табл.5.22)*

Табл.5.22

**Розрахунок вмісту компонентів для приготування 0,01 м³
середовища**

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 0,01м ³ середовища, кг	Композиція	Об'єм композиції, V, мл
Глюкоза	15	0,15	А	0,15
Дріжджовий екстракт	0,5	0,005		
Вода	6,5			
Конденсат	0,75		0,75	
K ₂ HPO ₄	5,2	0,05	В	0,08
KH ₂ PO ₄	3,18	0,03		
MgSO ₄	0,12	0,0012		
NH ₄ Cl	0,54	0,005		
Вода	2,2			
Конденсат	0,25			
Разом:	0,01м ³			

ДР 4.2.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічні ваги ставимо хімічний мірний стакан, таруємо і зважуємо 0,15 кг глюкози, на аналітичних вагах зважуємо 0,005кг дріжджового екстракту. Далі заливаємо 6,5 л водопровідної стерилізація композиції відбувається при температурі 112°C та тиску 0,5 атм протягом 30 хв.

ДР4.2.2. Приготування і стерилізація композиції В

Зважуємо на аналітичних вагах 0,05 кг K₂HPO₄, 0,03 кг- KH₂PO₄, на аналітичних вагах таруємо та сипемо MgSO₄-0,0012 кг, відтаровуємо та сипемо NH₄Cl - 0,005 кг , переносимо у колу об'ємом сюди ж додаємо 2,2 л водопровідної води.

Солі, безосередньо, розводять вже у збірнику, далі для змішування переносять у реактор (Р-17), підкислюються 6%-вим розчином HCl до рН 4,0 –

4,5, де відбувається стерилізація гострою парою при температурі 131°C та надлишковому тиску 1,5 атм упродовж 40хв.

ДР 4.3 Приготування поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 0,2 м³ (див.табл.5.23)

Табл.5.23

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 0,1 м³середовища

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 0,1м ³ середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Глюкоза	15	1,5	А	1,55
Дріжджовий екстракт	0,5	0,05		
Вода	65,5			
Конденсат	7,5		7,5	
K ₂ HPO ₄	5,2	0,5	В	0,86
KH ₂ PO ₄	3,18	0,3		
MgSO ₄	0,12	0,012		
NH ₄ Cl	0,54	0,054		
Вода	22			
Конденсат	2,5		2,5	
Разом:	0,1 м ³			

ДР 4.3.1. Приготування і стерилізація композиції А

У реактор (Р-23) за допомогою дозатора(Д-21) вносять 1,5 кг глюкози, та дріжджовий екстракт-0,05 кг попередньо зваживши компоненти на технічних вагах. Далі заливаємо 65,5 л водопровідної води, за цим вже вмикаємо перемішувальний пристрій для кращого розчинення, проводимо стерилізацію у збірнику при температурі вже 112°C та тиску 0,5 атм протягом 30 хв.

ДР 4.3.2. Приготування і стерилізація композиції В

На технічних вагах зважуємо 0,5 кг KH₂PO₄, таруємо та сипемо K₂HPO₄-0,3 кг, MgSO₄-0,012 кг, відтаровуємо та сипемо NH₄Cl – 0,054кг, солі переносять в збірник потім через дозатор(Д-24) заливаємо 22 л водопровідної води, переносимо у реактор (Р-26) і вмикають перемішувальний пристрій для

кращого розчинення солей, розчин солей попередньо підкислюють 6%-й розчином соляної кислоти, після чого відбувається стерилізація компонентів гострою парою при температурі 131°C, а також надлишковому тиску 1,5 атм упродовж 40хв.

ДР 4.4. Приготування поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 2 м³ (див.табл.5.24)

Табл.5.24

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 1м³ середовища

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 1м ³ середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Глюкоза	15	15	А	2682
Дріжджовий екстракт	0.5	0,5		591.4
Вода	655			591.4
Конденсат	75		75	
K ₂ HPO ₄	5,2	5,2	В	916,16
KH ₂ PO ₄	3,18	3,18		
MgSO ₄	0,12	0,12		
(NH ₄)HCl	0,54	0,54		
Вода	220			43.8
Конденсат	25		100	
Разом:	1м ³			

ДР 4.4.1. Приготування і стерилізація композиції А

Через об'ємно-ваговий дозатор у реактор(Р-32) подаємо 15 кг глюкози, 0,5 кг дріжджового екстракту. Далі заливаємо через об'ємно ваговий дозатор(Д-30) 655л водопровідної води, після чого вмикають перемішувальний пристрій, та стерилізують у збірнику при температурі вже 112°C та тиску 0,5 атм протягом 30 хв.

ДР 4.4.2. Приготування і стерилізація композиції В

Через об'ємно-ваговий дозатор(Д-30) у реактор (Р-35) подаємо 5,2 кг K₂HPO₄, 3,18 кг KH₂PO₄, 0,12 кг MgSO₄, NH₄Cl – 0,54кг, потім через об'ємно-

ваговий дозатор(Д-30) заливаємо 220 л води, а також вмикають перемішувальний пристрій задля кращого розчинення солей, сам розчин солей попередньо вже підкислюють 6%-й розчином соляної кислоти, після чого ж, і буде відбуватися стерилізація компоненті гострою парою при температурі вже 131°C та надлишковому тиску 1,5 атм упродовж 40хв.

ДР 4.5. Приготування поживного середовища для вирощування інокуляту у інокуляторі об'ємом 20м³ (див.табл.5.25)

Табл.5.25

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 10м³ середовища

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 10 м ³ середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Глюкоза	15	150	А	6705
Дріжджовий екстракт	0,5	5		
Вода	6550			
Конденсат	750		750	
K ₂ HPO ₄	5,2	52	В	2576,6
KH ₂ PO ₄	3,18	318		
MgSO ₄	0,12	1,2		
NH ₄ Cl	0,54	5,4		
Вода	2200			
Конденсат	250		250	
Разом:	10 м ³			

ДР 4.5.1. Приготування і стерилізація композиції А

Через об'ємно-ваговий дозатор(Д-39) у реактор(Р-41) подають 150 кг глюкози, 5 кг дріжджового екстракту. Далі заливаємо 6550 л водопровідної води, вмикаємо перемішувальний пристрій. Стерилізуємо гострою парою при температурі 112°C та тиску 0,5 атм протягом 30 хв.

ДР 4.5.2. Приготування і стерилізація композиції В

Через об'ємно -ваговий дозатор(Д-42) у реактор подають 52 кг K₂HPO₄, 318 кг KH₂PO₄, 0,12 кг MgSO₄, NH₄Cl – 0,54 кг потім через об'ємно-ваговий дозатор заливаємо 2200 л, водопровідної води, переносимо у реактор (Р-44) вмикають перемішувальний пристрій для кращого розчинення солей, розчин

селей попередньо підкислюють 6%-й розчином соляної кислоти, після чого відбувається стерилізація компоненті гострою парою при температурі 131°C та надлишковому тиску 1,5 атм упродовж 40хв.

Вміст вже з реактора подають у сам ферментер, де проходить стерилізація компонентів гострою парою при температурі 131°C, а також надлишковому тиску 1,5 атм упродовж 40хв.

ДР 5. Приготування розчинів реагентів.

ДР 5.1 Приготування розчину пероксиду водню.

Для приготування 20 л 24% розчину пероксиду водню, попередньо на технічних вагах зважують 2,4 кг порошкоподібної речовини гідропериту, відміряють 17,6 л питної води та додають до збірника(З-51) через об'ємно-ваговий дозатор (Д-52). Перемішують протягом 10 хв до повного розчинення, вмикаючи перемішуваний пристрій.

Розчин пероксиду водню (від З-51) передають за допомогою насоса (Н-53) до реактора (Р-66).

ДР 5.2 Приготування і стерилізація розчину гідроксиду натрію.

Для приготування 20 л 3% розчину гідроксиду натрію, попередньо на технічних вагах зважують 0,3 кг (виходячи з того, що готуємо 3% розчин) їдкого натрію, відміряють 19,7 л питної води та додають до збірника(З-54) через об'ємно-ваговий дозатор (Д-55). Перемішують протягом 10 хв до повного розчинення лугу за допомогою перемішувального пристрою. Розчин передають за допомогою насоса (Н-56) до реактора (Р-66).

Стерилізацію проводимо гострою парою, яку подаємо безпосередньо через барботер до збірника при 131°C протягом 30 хвилин.

ДР 5.3 Приготування розчину соляної кислоти з цимоліазою.

Для приготування 20л 2М розчину соляної кислоти в збірник (З-57) через об'ємно-ваговий дозатор (Д-58) додають, попередньо відмірявши 1,95 л соляної кислоти, 5 мг цимоліази та 18 л питної води, після чого вмикаємо мішалку, перемішування здійснюють протягом 10 хвилин. Розчин передають за допомогою насоса (Н-59) до реактора (Р-75).

ДР 5.4 Приготування розчину соляної кислоти.

Для приготування 20л 2М розчину соляної кислоти в збірник (З-60) через об'ємно-ваговий дозатор (Д-61) додають, попередньо відмірявши 1,95 л соляної кислоти та 18,05 л питної води, після чого вмикають мішалку, перемішування здійснюють протягом 10 хвилин. Розчин передають за допомогою насоса (Н-62) до реактора (Р-75).

ТП 6. Підготовка посівного матеріалу

ТП 6.1. Підтримання колекційної культури

Колекційну культуру, а саме *Saccharomyces cerevisiae* H131, необхідно зберігати у пробірках вже при $t=4^{\circ}\text{C}$ зі скошеним сусло-агаром. Пересіви також здійснюють кожні 3-4 місяці. Всі ж роботи за колекційною культурою проходять строго в асептичних умовах.

ТП 6.2. Одержання і вирощування робочої культури на агаризованих середовищах

Колекційну культуру, що зберігається саме, в пробірках з агаризованим середовищем, розсівають вже петлею до ізольованих колоній на чашки Петрі із так званим, сусло-агаром в асептичних умовах, при чому їх вирощують у термостаті при температурі вже 30°C , протягом -5 діб.

ТП 6.3. Вирощування культури в колбах на качалці

Для вирощування ж рідкого посівного матеріалу, то у колбу об'ємом -2 л необхідно внести в асептичних вже умовах композицію А (від ДР 4.1.1), композицію Б (від ДР 4.1.2). Перемішують і розливають в стерильні качалочні колби. У пробірку ж, із вже робочою культурою, яка вирощена на самому сусло- агарі, асептично вносять по 5 мл фізіологічного розчину, пр чому суспендують клітини (змивають культуру) піпеткою відбираючи вже одержану суспензію клітин та після вносять у колби із поживним середовищем.

Культивування дріжджів здійснюється, безпосередньо, у колбах на качалці (200 об/хв) при $t = 30^{\circ}\text{C}$ упродовж 48 год. Значення рН становить на рівні-5,0.

ТП 6.4. Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 0,02 м³

У попередньо ж вже простерилізований реактор, вносять через об'ємно-ваговий дозатор композицію А (від ДР 4.2.1), після чого композиції Б (від ДР4.2.2) та потім вмикають перемішуючий пристрій при чому перемішують упродовж -5 хв. Вже після перемішування, через засівну колбу вносять необхідну кількість інокуляту (від ТП6.3).

Вирощування такого посівного матеріалу проходить вже при 30°C упродовж 24 год. Під час культивування, кожні 6 годин потрібно відбирати пробу задля здійснення мікробіологічного контролю.

ТП 6.5. Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 0,2 м³

У інокулятор, який буде містити стерильну композицію В (ДР4.3.2) подають також стерильну композицію А (від ДР4.3.1). Поживне середовище підлужнюють стерильним розчином гідроксиду натрію (від ДР2.1.2) доводять до оптимального значення рН на рівні-5,0, за допомогою так званої, труби перетискування вже у самий інокулятор подається посівний матеріал із ферментера (ТП6.4).

У кожух ферментера(ФР29) подається вже гаряча, а також холодна вода, виводиться оборотна вода. У ферментер подається теж стерильне стиснуте повітря, а виводиться вже дане відпрацьоване.

Температура вирощування посівного матеріалу становить в самому інокуляторі – 30 °С, тривалість – 24 год. Швидкість перемішування ж, становить 200 об/хв. Після закінчення культивування культуральну рідину перекачують за допомогою труби перетискання в інокулятор об'ємом 2м³.

ТП 6.6 Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 2 м³.

Вже у реактор, що містить композицію А (ДР4.4.1) через даний патрубков відкривши вентиль подають композицію В (від ДР4.4.2). Після чого ж, підлужнюють (розчином луку від ДР2.1.2) до оптимального значення рН на рівні -5,0. За допомогою так званої труби перетискання, після чого у інокулятор вже подається посівний матеріал від (ТП6.5).

У сам вже кожух інокулятора подається, безпосередньо, гаряча, а також холодна вода, при цьому виводиться- оборотна вода. У збірник ж, подається стерильне стиснуте повітря, а виводиться вже -відпрацьоване.

Температура вирощування посівного матеріалу в інокуляторі становить— 30°C, а тривалість – 24 год. Швидкість перемішування становить 200 об/хв. Після ж закінчення культивування, культуральну рідину вже перекачують за допомогою труби перетискання в інокулятор (ФР-47) об'ємом 20 м³.

ТП 7. Біосинтез

ТП 7.1. Виробниче культивування у ферментері об'ємом 20м³

У ферментер (ФР-47), зі стерильною композицією В(від ДР4.5.2) подається по трубопроводах стерильна композиція А (від ДР4.5.1). Після чого необхідно поживне середовище підлучнюють стерильним розчином гідроксиду натрію (від ДР5.5.2) до оптимального значення рН 5,0. За допомогою спеціальної труби перетискування вже у інокулятор подається посівний матеріал із ферментера 1 (ТП 6.5). Після чого вмикають перемішувальний пристрій, а також подачу вже аеруючого повітря (1-3 м³) при 3000 об/хв. Біосинтез необхідно проводити при $t = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$, що досягається за допомогою теплообмінного кожуха, 48 год. Культивування ведуть до досягнення максимального накопичення β -глюкану 3,5 г/л.

ТП8. Відділення культуральної рідини.

ТП 8.1. Центрифугування культуральної рідини

Культуральну рідину зі збірника(З-49) насосом (Н-50) подають у сепаратор з автоматичним періодичним відцентровим розвантаженням осаду(С-63), де відбувається процес відділення клітин дріжджів при швидкості обертання 10000 об/хв, тривалість 30 хв. Після відділення, тверду фазу (клітини дріжджів) подають на стадію дезінтеграції (до ТП 9.1). Фракцію, що не містить залишки β -глюкану передають на стадію знешкодження рідких відходів(ЗВ 14.2).

ТП 9. Виділення β -глюкану.

ТП 9.1. Дезінтеграція клітинної стінки дріжджів.

Тверду фазу від сепаратора з автоматичним періодичним відцентровим розвантаженням осаду (С-63) насосом (Н-64) подають у реактор (Р-66), суди ж насосом (Н-53) подають 24% пероксид водню (від ДР5.1). Вмикають перемішуваний пристрій, перемішують протягом 130 хвилин. Утворений лізат подають на стадію центрифугування для відділення твердої фази (до ТП 9.2).

ТП 9.2. Центрифугування

Після дезінтеграції клітинної стінки залишок реактора (від Т.П 9.1) від (Р-66) подають насосом (Н-67) на сепаратор з автоматичним періодичним відцентровим розвантаженням осаду (С-68) для відділення твердої фази. Центрифугування проводять при 5000 об/хв протягом 30 хв. Вміст сепаратора подають на наступну стадію (до ТП10).

ТП 10. Очищення β -глюкану.

Т.П 10.1 Екстрагування супутніх речовин β -глюкану.

Від сепаратора з автоматичним періодичним відцентровим розвантаженням осаду (С-68) (від Т.П 9.2) тверду фазу подають насосом (Н-69) у реактор (Р-71), сюди ж насосом (Н-56) зі збірника (З-54) подають 3 % натрій гідроксид (від ДР 5.2). Вмикають перемішувач, перемішують вміст протягом 60 хвилин (до Т.П 10.2).

Т.П 10.2 Ультрафільтрація

З реактора (Р-71) насосом (Н-72) вміст (від Т.П 5.3) подають на ультрафільтраційну установку(УФ-73) (з діаметром пор не менше 25 нм) (до Т.П 10.3).

ТП 10.3 Осадження β -глюкану.

З ультрафільтраційної установки (УФ-73) фільтрат насосом (Н-26) подають до реактора (Р-27) куди за допомогою насоса (Н-62) подають 2М розчину соляної кислоти (від ДР 5.4). Вміст реактора (Р-75) перемішують, за допомогою перемішувального пристрою, протягом 1 години (до ТП 10.4).

ТП 10.4 Обробка β -глюкану розчином соляної кислоти з цемоліазою.

До реактора (Р-75) насосом(Н-59) подають розчин соляної кислот з цемоліазою (від ДР5.3), для додаткового очищення полісахариду (до ТП 10.5).

ТП 10.5 Ультрафільтрація.

З реактора (Р-75) насосом (Н-76) вміст подають на ультрафільтраційну установку(УФ-77), з діаметром пор 6 нм (до ТП 11).

ТП 11. Сушіння полісахариду.

Фільтрат (від ТП 10.5) передають до розпилювальної сушарки (СШ-79) за допомогою транспортера (Т-78), де проходить сушіння за температурою, не нижче 80°C, протягом 4-5 годин (до ТП12).

ТП 12. Дробіння висушеного порошку

Із сушарки (СШ-79) сухий β -глюкан через стрічковий транспортер(Т-80) подають порціями через колосник у бункер молоткової дробарки (ДР-81), де β -глюкан подрібнюють протягом 1,5 годин.

ПМВ 13. Пакування, маркування, відвантаження β -глюкану.

З молоткової дробарки (Д-81) через стрічковий транспортер(Т-82), порошок полісахариду передають до пакувальної машини “Мастадонт“ (ПМВ13.1).

ПМВ 13.1. Пакування β -глюкану.

Від молоткової дробарки (Д-81) β -глюкан передають через стрічковий транспортер (Т-82) на фасувальну машину (ФМ-83) де проходить фасування полісахариду у водонепроникні мішки з фольги по 1 кг та їх автоматичне запаювання (до ПМВ 13.2).

ПМВ 13.2 Маркування β -глюкану.

Після пакування субстанції β -глюкану, на первинну упаковку наносять маркування за допомогою маркувальної машини (ММ-85). Надалі мішки з вмістом субстанції β -глюкану передають на склад в зону карантину.

ЗВ 14. Знешкодження відходів

ЗВ 14.1 Знешкодження твердих відходів

Для знешкодження або ж утилізації твердих відходів, можна використовувати термічні методи їх обробки на сміттєспалювальних заводах та полігонах.

ЗВ 14.2. Знешкодження рідких відходів

Для знешкодження вже рідких відходів доречно буде використовувати метод так званого активного мулу. Для його ж реалізації потрібно створити систему неглибоких біологічних ставків, в яких буде відбуватися змішування стічних вод із мулом, який і утворився при попередньому окисленні стічних вод. В активному ж мулі багато таких мікроорганізмів, які і будуть завершувати знешкодження стоку.

ЗВ 14.3 Знешкодження газоподібних відходів

Очищення саме газоподібних відходів буде здійснюють вже у фільтрах з попереднім охолодження відпрацьованого повітря, а також із зниженням вологості у самих вологовідбійниках із вже подальшим нагріванням, аби ж уникнути попадання води і попередити змочування фільтрів.

5.3 Контроль ділянки біосинтезу (карта постадійного контролю+методики)

Упродовж всього культивування, потрібно періодично відбирати проби для мікробіологічного, технологічного контролю, при чому на кожній стадії технологічного процесу. Визначають концентрацію цільового продукту; а також вміст джерела вуглецю (глюкоза) та азоту(амінний); ідентифікацію, а також вологість самого цільового продукту, і кількість цільового полісахариду вже у готовій субстанції.

5.1 Мікробіологічний контроль

Здійснюють, безпосередньо, розсівом на спеціальні чашки Петрі із агаризованим середовищем. При виявленні ж, під час мікроскопіювання так званих сторонніх мікроорганізмів культуральну рідину поступово розсівають петлею (методом виснаженого штриха) до вже ізольованих колоній, а також на чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром (МПА) для виявлення вже бактерій, з сусло-агаром, а також для виявлення дріжджів і грибів.

Критерієм чистоти культури, буде однорідність вирощених колоній та відсутність колоній інших мікроорганізмів. Посіви інкубують упродовж 5 діб при температурі 30°C на середовищах[109].

5.2 Мікроскопівання

Контроль культуральної рідини

Для здійснення мікроскопіювання використовують спеціально препарат «роздавлена крапля». Для приготування ж препаратів за методом роздавленої краплі- застосовують наступні етапи:

На поверхню вже чистого сухого предметного скла крапають краплю воду, а також фізіологічного розчину або ж, культуральної рідини, після того скляною паличкою або ж, бактеріологічною петлею в краплю вносять вже невеличку кількість досліджуваної культури та обережно розподіляють в рідині для отримання однорідної суспензії. При роботі ж, з культурою тканин вже на самому предметному склі наносять краплю суспензії із клітин, які знаходяться в культуральній рідині. Приготовлену ж краплю в ході вже накривають покривним склом, але ж так аби уникнути утворення бульбашок повітря. Якщо ж частина рідини вже виступає за края покривного скла, тоді ж необхідно надлишок середовища поглинути смужкою фільтрувального паперу. У полі зору мікроскопа будуть спостерігатися клітини *Saccharomyces cerevisiae*, як округлої, так і яйцевидної або ж еліпсоїдної форми, розміром 5-12 мкм в діаметрі (див. рис. 6.2).

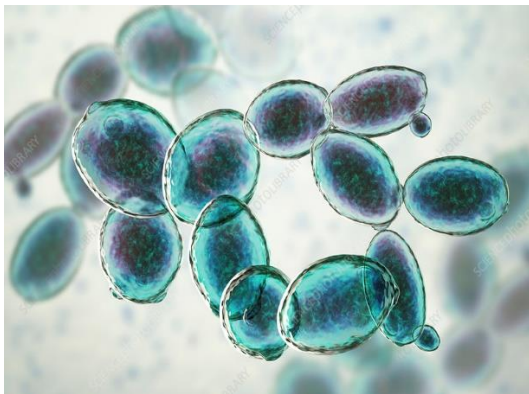


Рис. 5.2 *Saccharomyces cerevisiae* під мікроскопом[110].

Контроль стерильності поживних середовищ

Прямий висів на агаризовані середовища СА та МПА.

Інкубація:МПА -32-34°C1-2 доби, СА-24-26°C 3-5 діб[4].

5.3 Визначення концентрації біомаси

Концентрацію ж біомаси, визначають вже за оптичною густиною клітинної суспензії, із наступним перерахунком на вже суху біомасу за допомогою спеціального калібрувального графіка. У пробірки ж із 9 мл стерильної водопровідної води, поступово вносять по 1 мл культуральної рідини. Суміш, яку збовтують, а потім вже вимірюють оптичну густину за допомогою так званого спектрофотометра УФ-1700(Shimadzu, Кіото, Японія) при довжині хвилі- складає 600 нм[4].

Концентрація цільового продукту

Для кількісного визначення β -глюкану відбирають зразок біомаси, центрифугують протягом 10 хв при 7500 об/хв. Супернатант використовують для кількісного визначення накопичення цільового полісахариду. Після чого супернатант аналізують за допомогою спектрометра FTIR-8301 PC. Кількісний аналіз ІЧ-спектрів проводять за значеннями відносної оптичної щільності, застосовуючи метод базисної лінії і внутрішнього стандарту. Як внутрішній стандарт використовують максимум смуги поглинання при 890 см^{-1} , яка характерна для β -конфігурації глікозидних зв'язків.

Індекс симетричності оцінюють по відношенню саме ширини високочастотної, а також низькочастотної частин поглинання в області, яка складає $3000\ldots 3750\text{ см}^{-1}$, виміряних саме від середини перпендикуляра, який проведено через максимум смуги поглинаних ОН- груп і базисної лінії. Перед аналізом спектри були попередньо оброблені за допомогою програмного забезпечення Omnic 32. Для розрахунку площі апроксимації кривої використовують програмне забезпечення Origin Pro 8.0 [4].

5.4 Концентрація вуглецевого компоненту глюкози

Для кількісного ж визначення глюкози, в 1 мл проби береться із культуральної рідини, яку центрифугували протягом 10 хв вже при 3000 об/хв. Глюкозу ж визначали за допомогою вже лактонного біосенсора молочної кислоти SBA-40 C[111].

Суть методу полягає в тому, що після вже іммобілізації глюкозооксидази у складі мембрани із невеликим розміром пор та її

розміщення на поверхні самого робочого електрода система починає функціонувати як біосенсор, який призначений для визначення глюкози. Під дією саме ензиму, глюкозооксидази глюкоза починає окиснюється із утворенням пероксиду водню та так званого D-глюконолактону[111].

Глюконолактон спонтанно починає гідролізуватись до глюконової кислоти, яка вже потім дисоціює на залишок кислоти, а потім і протон. Це, ж у свою чергу, спричинює зміну провідності, яку і, можна реєструвати вже за допомогою так званого кондуктометричного перетворювача.

Протони, ж що утворюються в результаті даної реакції, можна вже реєструвати також за допомогою потенціометричного перетворювача. У разі ж амперометричного визначення утворений у процесі глюкозооксидазної реакції пероксид водню відновлюється на аноді, що і призводить до збільшення сили струму. Струм, який починає виникає під час вимірювання, вже пропорційний концентрації глюкози в самому зразку[4].

5.5 Концентрація амінного азоту

Метод формольного титрування

Суть методу полягає, аби аміногрупи амінокислот блокувались формальдегідом, а вільні ж- карбоксильні групи, які залишаються будуть титрувати лугом. За кількістю ж витраченого на титрування даного лугу визначають кількість COOH-груп. Число ж карбоксильних груп в амінокислотах в середньому приймають вже рівним числу аміногруп (що і цілком справедливо для моноамінокислот, а також для діамінокислот, які вводять відповідні поправки в методику самого титрування).

Для визначення ж амінного азоту, до 1 мл супернатанту культуральної рідини, який отримано під час центрифугування за 10хв (3000об/хв) додають воду вже до загального об'єму- 10 мл. При необхідності ж, розчин потрібно нейтралізувати потенціометрично до Рн в межах- 7,0, шляхом вже додавання як 0,1 М розчину натрію гідроксиду, так і 0,1 М розчину соляної кислоти.

Після нейтралізації також додають 2 мл розчину- формальдегіду 35%, який і попередньо нейтралізований в день аналізу-а саме, 10% розчином натрію

гідроксиду до Рн- 7,0, після чого перемішують та титрують 0,1 М розчином натрію гідроксиду до значення Рн- 9, 1, що, також, і не змінюється при перемішуванні протягом -2 хв, або появи слабо рожевого забарвлення (індикатор - 1% розчин фенолфталеїну). Паралельно ж проводять контрольний дослід (паралельно титрують дистильовану воду).

1 мл 0,1 М розчину натрію гідроксиду повинно відповідати- 1,4 мг амінного азоту [112].

Показники та методи контролю субстанції β -глюкану

Субстанцію, одержану в результаті виділення та очищення β -глюкану, контролюють за такими показниками:

1. Опис;
2. Ідентифікація;
3. рН;
4. Втрата в масі при висушуванні;
5. Супровідні домішки;
6. Важкі метали;
7. Мікробіологічна чистота;
8. Кількісне визначення;
9. Визначення вологості;
10. Термін придатності.

1. Опис.

2. Ідентифікація β -глюкану

Ідентифікація β -глюкану (якісний склад готового продукту)

АСМ (атомно-силова мікроскопія) виконували в зондовій нанолaboratorії «Прима» дослідного комплексу «ІНТЕГРА». Для проведення досліджень наважку полісахариду масою 10 мг розчиняли в 100 см³ диметилсульфоксиду при кімнатній температурі протягом 24 годин при періодичному перемішуванні. Перед нанесенням розчин полісахариду нагрівали і витримували при температурі 100 °С 10 хвилин. Нанесення зразків на

заздалегідь приготовані кремнієві підкладки розміром 12x25 мм проводили методом осадження крапель. При цьому діаметр краплі становив не більше 10 мм, товщина шару – менше 2 мм. Зразки висушували при кімнатній температурі, розчинник випаровувався природним шляхом.

Сканування на мікроскопі проводили в конфігурації «напівконтактний метод» при частоті 1 Гц за допомогою зондового датчика типу CSG10, використовуючи програму управління мікроскопом «NOVA». Отримані зображення були оброблені за допомогою програмного модуля Image Analysis[30].

3. рН. (ДФУ 2.2.3). Методику наведено у пункті 3.1.4.

4. Втрати в масі при висушуванні (ДФУ 2.2.32).

0,2 г субстанції поміщають у попередньо висушений зважений бюкс, сушать при температурі 105 °С протягом 1 год, зважують, за різницею визначають втрати в масі при висушуванні. Втрати мають складати не більше 3,0 %.

5. Супровідні домішки

Визначають вміст домішок таких, як солей амонію, арсену, кальцію, магнію, лужноземельних металів, хлоридів, феруму, фосфатів, фторидів, цинку. Методику наведено у пункті 3.1.4.

6. Важкі метали (ДФУ п. 2.4.8). Методику наведено у пункті 3.1.4.

7. Мікробіологічна чистота. Загальне число аеробних м/о (ТАМС) $\leq 10^3$ КУО/г; загальне число дріжджових та плісневих грибів (ТУМС) $\leq 10^2$ КУО/г; відсутність *Escherichia coli* в 1 г.

8. Кількісне визначення β -глюкану

Підготовкою зразку для інфрачервоної спектроскопії є пресування зразку (субстанції з вмістом β -глюкану) в таблетку з KBr, що містить 4 г полісахариду і 200 мг калій броміду. ІЧ-спектроскопічний аналіз проводили на спектрофотометрі 'FTIR -8301 PC'.

Кількісний аналіз ІЧ-спектрів проводимо за значеннями відносної оптичної щільності, застосовуючи метод базисної лінії і внутрішнього стандарту. Як внутрішній стандарт використовували максимум смуги поглинання при 890 см^{-1} , яка характерна для β -конфігурації глікозидних зв'язків.

Індекс симетричності потрібно оцінювати по відношенню ширини високочастотної, а також і низькочастотної частин поглинання в області $3000\ldots 3750\text{ см}^{-1}$, виміряних від середини перпендикуляра, а також проведеного через максимум смуги поглинання ОН- груп і базисну лінію. Перед самим аналізом, спектри попередньо обробляємо за допомогою так званого програмного забезпечення Omnic 32. Для розрахунку площі вже апроксимації кривої використовуємо програмне забезпечення, яке має назву-Origin Pro 8.0[30].

10. Визначення вологості

Контроль ж вологості вже готового продукту буде проводитися за допомогою спеціального аналізатора вологості “OHAUS MB25”, який дасть змогу швидко, а найголовніше точно визначити вміст води в самому продукті, як вже згадувалося раніше. Принцип ж роботи вологоміра, має наступні положення: досліджуваний зразок зважують, після чого нагрівають до визначеної температури, за спеціально розробленими методиками, а також режимами, після чого його знову ж таки зважують і визначають різницю, що дорівнює втраті-води [113].

Таке ж дослідження дозволяє виявити, а також визначити саму масову частку не лише вільної води, а й також зв'язаної води. Аналізатори води OHAUS MB 25 розроблені із застосуванням передових технологій відокремлення води від загальної маси досліджуваного матеріалу, також проведення аналітичного контролю втрати маси вже після дії теплового випромінювання [113].

Пристрій, типу- MB 25 американської компанії OHAUS, вважають таким класичним вимірювальним приладом, який має відносну точністю контролю-

0,05%. Робочий же діапазон температури, сушіння знаходиться в межах- 50...160 °С, а дискретність складає- 5 °С. Максимальна ж вага досліджуваного зразка становить-110 г [113].

А, 5 г субстанції β -глюкану поміщають у сушильну камеру, сушать при температурі 50-105 °С, а після чого сушіння проводять та визначають різницю маси зразка субстанції до, а також після його висушування. Точність ж вимірювання вологості становить- $\pm 0,5\%$.

Вологість субстанції має становити- 5%.

11.Термін придатності:2,5 роки

Визначення імуностимулювальних властивостей β -глюкану на мурчаках

В умовах віварію було проведено дослід на 20-и здорових мурчаках (одна контрольна і три дослідні групи по 5 особин у кожній групі: I група — імуносупресія без імуностимулятора; II група — без імуносупресії з імуностимулятором; III група — імуносупресія з імуностимулятором). Імуносупресію здійснювали тваринам I та III дослідних груп дворазово з інтервалом кожні 7 діб: підшкірно вводили препарат «Дексафорт» на основі дексаметазону пролонгованої дії (Intervet Schering-Plough Animal Health, Нідерланди). Як імуностимулятор використовували бета-глюкан в дозі 30 мг на кг маси. Препарат задавали випоюванням 1 раз в день щодня протягом 14 діб тваринам II та III дослідних груп після другого введення «Дексафорту». За дії «Дексафорту» у крові досліджуваних тварин встановлено зменшення кількості лейкоцитів, зокрема лімфоцитів, що відображає імуносупресивний стан організму. Випоювання тваринам бета-глюкану призводило до збільшення у їх крові кількості лейкоцитів, зокрема лімфоцитів і тромбоцитів, що вкотре доводить про імуностимулювальні властивості β -глюкану.

Гематологічні дослідження являли собою дослідження кількості еритроцитів і лейкоцитів, визначали методом їх підрахунку в камері Горяєва, вміст гемоглобіну — гемоглобінціанідним методом [113]. Лейкограму виводили на основі підрахунку та диференціації 100 клітин лейкоцитів у мазках

крові, пофарбованих за методикою Романовського-Гімзи. При цьому враховували розмір клітин, величину і форму ядра, наявність та колір зерен у цитоплазмі. Величину гематокриту визначали за допомогою гематокритних капілярів центрифугуванням 10 хв при 3000 об/хв, швидкість осідання еритроцитів (1 год) — з допомогою піпеток Панченкова [113].

Цифровий матеріал статистично опрацьовували за допомогою комп'ютерної програми Microsoft Excel з пакету Microsoft Office 2007. Вірогідність визначали за t-критерієм[113].

Карта контролю

Таблиця 5.26

Карта постадійного контролю виробництва β -глюкану.

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
1	2	3	4	5
Кт 1.2. Грубе очищення повітря	Повітря на виході з фільтра грубої очистки, ступінь очищення	Манометр технічний, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення	E = 95 %, тиск згідно паспорту
Кт 1.3. Стиснення повітря	Стиснене ж повітря, тоді температура, тиск	Манометр технічний, термометр	Після стиснення повітря	P = 0,4 МПа, t = 120–150 °C
Кт 1.4. Охолодження повітря та видалення вологи	Охолоджене повітря, вже після видалення зайвої вологи температура	Термометр технічний, психрометричний метод	Після охолодження повітря та видалення зайвої вологи	t = 20°C, W = 60 %
Кт 1.5. Нагрівання повітря	Нагріте повітря, а також температура	Термометр технічний	Після нагрівання повітря	t = 35°C
Кт 1.6. Очищення повітря в головному фільтрі	Повітря ж на виході з індивідуального фільтра, а також ступінь очищення, і гвне-перепад тисків.	Манометр технічний, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у головному фільтрі	E = 99 %, тиск згідно паспорту
Кт 1.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі	Повітря ж на виході з індивідуального фільтра, а також ступінь очищення, і гвне-перепад тисків.	Манометр технічний, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Під час очистки повітря у індивідуальному фільтрі	E = 99,99 %, тиск згідно паспорту

Продовження табл. 5.26

1	2	3	4	5
Кх 2.1.1 Приготування титрувального агенту для накопичення інокуляту 6% HCl	Концентрація самого розчину	Хімічний метод	Після приготування розчину	C=0,1 М
Кх 2.1.2 Приготування та стерилізація титрувального агенту для накопичення інокуляту 6% NaOH	Температура, а також тиск, стерилізації, а також час стерилізації, сама стерильність	Годинник, манометр, термометр технічний, мікробіологічний контроль	Тиск та температура визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P = 0,15 МПа, t=131 °C τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кх 2.2.1 Приготування титрувального агенту для виробничого біосинтезу 6% HCl	Концентрація розчину	Хімічний метод	Після приготування розчину	C=6%

Продовження табл. 5.26

1	2	3	4	5
Кх 2.2.2 Приготування та стерилізація титрувального агенту для виробничого біосинтезу 6% NaOH	Температура, а також тиск стерилізації, час стерилізації, стерильність	Годинник, манометр, термометр технічний, мікробіологічний контроль	Тиск та температура визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P = 0,15 \text{ МПа}$, $t = 131 \text{ }^{\circ}\text{C}$ $\tau = 40 \text{ хв}$, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.1 Приготування та стерилізація запасного розчину солі для накопичення інокуляту в колбах на качалці	Розчин солі, температура та тиск стерилізації, час стерилізації, стерильність	Годинник, манометр, термометр технічний, мікробіологічний контроль	Тиск та температура визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P = 0,15 \text{ МПа}$, $t = 131 \text{ }^{\circ}\text{C}$ $\tau = 40 \text{ хв}$, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1.1 Приготування і стерилізація композиції А для вирощування інокуляту в колбах на качалці	Композиція А, температура та тиск стерилізації, час стерилізації, стерильність	Годинник, манометр, термометр технічний, мікробіологічний контроль	Тиск та температура визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P = 0,05 \text{ МПа}$, $t = 112 \text{ }^{\circ}\text{C}$ $\tau = 30 \text{ хв}$, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1.2 Приготування та стерилізація композиції В для вирощування інокуляту в колбах на качалці	Композиція В, температура та тиск стерилізації, час стерилізації, стерильність	Годинник, манометр, термометр технічний, мікробіологічний контроль	Тиск та температура визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P = 0,15 \text{ МПа}$, $t = 131 \text{ }^{\circ}\text{C}$ $\tau = 40 \text{ хв}$, відсутність мікробіоти

Продовження табл. 5.26

1	2	3	4	5
Кт, Км 4.2.1. Приготування та стерилізація композиції А для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 10 л	Композиція А, температура та тиск стерилізації, час стерилізації, стерильність	Годинник, манометр, термометр технічний, мікробіологічний контроль	Тиск та температура визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P = 0,05$ МПа, $t=112$ °С $\tau = 30$ хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.2.2. Приготування та стерилізація композиції В для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 10 л	Композиція В, температура та тиск стерилізації, час стерилізації, стерильність	Годинник, манометр, термометр технічний, мікробіологічний контроль	Тиск та температура визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P = 0,15$ МПа, $t=131$ °С $\tau = 40$ хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.3.1. Приготування і стерилізація композиції А для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 100 л	Композиція А, температура та тиск стерилізації, час стерилізації, стерильність	Годинник, манометр, термометр технічний, мікробіологічний контроль	Тиск та температура визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P = 0,05$ МПа, $t=112$ °С $\tau = 30$ хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.3.2. Приготування та стерилізація композиції В для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 100л	Композиція В, температура та тиск стерилізації, час стерилізації, стерильність	Годинник, манометр, термометр технічний, мікробіологічний контроль	Тиск та температура визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P = 0,15$ МПа, $t=131$ °С $\tau = 40$ хв, відсутність мікробіоти

Продовження табл. 5.26

1	2	3	4	5
Кт, Км 4.4.1. Приготування і стерилізація композиції А для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 1000 л	Композиція А, температура та тиск стерилізації, час стерилізації, стерильність	Годинник, манометр, термометр технічний, мікробіологічний контроль	Тиск та температура визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P = 0,05 \text{ МПа}$, $t = 112 \text{ }^{\circ}\text{C}$ $\tau = 30 \text{ хв}$, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.4.2 Приготування та стерилізація композиції В для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 1000 л	Композиція В, температура та тиск стерилізації, час стерилізації, стерильність	Годинник, манометр, термометр технічний, мікробіологічний контроль	Тиск та температура визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P = 0,15 \text{ МПа}$, $t = 131 \text{ }^{\circ}\text{C}$ $\tau = 40 \text{ хв}$, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.5.1 Приготування і стерилізація композиції А для біосинтезу в ферментері об'ємом 10 м ³	Композиція А, температура та тиск стерилізації, час стерилізації, стерильність	Годинник, манометр, термометр технічний, мікробіологічний контроль	Тиск та температура визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P = 0,05 \text{ МПа}$, $t = 112 \text{ }^{\circ}\text{C}$ $\tau = 30 \text{ хв}$, відсутність мікробіоти

Продовження табл. 5.26

1	2	3	4	5
Кт, Км 4.5.2 Приготування та стерилізація композиції В для біосинтезу в ферментері об'ємом 10 м ³	Композиція В, температура та тиск стерилізації, час стерилізації, стерильність	Годинник, манометр, термометр технічний, мікробіологічний контроль	Тиск та температура визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P = 0,15 МПа, t=131 °C τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кх 5.1 Приготування та стерилізація 24% пероксиду водню для дезінтеграції клітинної стінки дріжджів	Розчин пероксиду водню, концентрація	Хімічний метод	Після приготування розчину	C=24%
Кт, Км 5.2 Приготування та стерилізація гідроксиду натрію для екстракції β-глюкану	Тиск стерилізації, час стерилізації, стерильність	Годинник, манометр, термометр технічний, ваги, мікробіологічний контроль	Тиск та температура визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P = 0,15 МПа, t=131 °C τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 5.3 Приготування розчину соляної кислоти з цимоліазою для осадження β-глюкану	Розчин соляної кислоти з цимоліазою, концентрація	Хімічний метод	Після приготування розчину	C=2М
Кт, Км 5.4 Приготування розчину соляної кислоти для осадження β-глюкану	Розчин соляної кислоти, концентрація	Хімічний метод	Після приготування розчину	C=2М
Кт, Км 6.1 Підтримання колекційної культури <i>Saccharomyces cerevisia</i>	Культура <i>Saccharomyces cerevisia</i> , тривалість, температура, мікробіологічна чистота	Мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль у процесі збереження	t = 4 °C, τ = 3-4 міс, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 6.2 Вирощування ж робочої культури	Культура <i>Saccharomyces cerevisia</i> , температура, тривалість культивування	Термометр технічний, годинник	Температура визначається безперервно під час культивування	t = 30°C, τ = 5діб, відсутність сторонньої мікробіоти

Продовження табл. 5.26

1	2	3	4	5
Кт, Км 6.3 Вирощування інокуляту в колбах на качалках	Посівний матеріал, а також - тривалість культивування, температура, та швидкість перемішування, мікробіологічна чистота.	Термометр технічний, тахометр, годинник, мікробіологічний контроль	Частота обертів перемішуючого пристрою, також температура – безперервно, під час культивування, мікробіологічний контроль проводиться вже після вирощування.	$t = 30^{\circ}\text{C}$, $n = 200 \text{ об/хв}$, $T = 12 \text{ год}$, відсутність сторонньої мікробіоти.
Кт, Км 6.4 Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 20 л	Посівний матеріал, температура, швидкість перемішування, тривалість культивування, мікробіологічна чистота	Датчик температури, тахометр, годинник, мікробіологічний контроль	Частота обертів перемішуючого пристрою, температура – безперервно під час культивування, відбір проб – кожні 6 годин.	$t = 30^{\circ}\text{C}$, $n = 200 \text{ об/хв}$, $T = 24 \text{ год}$, відсутність сторонньої мікробіоти.
Кт, Км 6.5 Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 200 л	Посівний матеріал, температура, швидкість перемішування, тривалість культивування, мікробіологічна чистота	Датчик температури, тахометр, годинник, мікробіологічний контроль	Частота обертів перемішуючого пристрою, температура – безперервно під час культивування, відбір проб – кожні 6 годин.	$t = 30^{\circ}\text{C}$, $n = 200 \text{ об/хв}$, $T = 24 \text{ год}$, відсутність сторонньої мікробіоти.

Кт, Км 6.6 Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 2000 л	Посівний матеріал, а також температура, та швидкість перемішування, і тривалість культивування, а також мікробіологічна чистота	Датчик температури, тахометр, годинник, мікробіологічний контроль	Частота ж обертів перемішуючого пристрою, а також-температура –вже безпеосердно здійснюється під час культивування, відбір проб – кожні 6 годин.	$t = 30^{\circ}\text{C}$, $n = 200 \text{ об/хв}$, $T = 24 \text{ год}$, відсутність сторонньої мікробіоти.
Кх, Кт, Км 7.1. Виробниче культивування в ферментері об'ємом 20 м^3	Культуральна ж рідина, рН, температура, а також швидкість перемішування, та швидкість подачі аераційного повітря, а також рівень розчинного кисню, концентрація біомаси, концентрація β -глюкану.	Датчики рН, температури, розчинного кисню, тахометр, визначення β -глюкану за допомогою ІЧ-спектроскопії	рН, а також температура, після чого швидкість подачі повітря, а також проби культуральної рідини для вже мікробіологічного контролю, і при визначенні концентрації біомаси, а також концентрації β -глюкану відбираються кожні- 6 годин.	$\text{pH} = 5$, $t = 30^{\circ}\text{C}$, $n = 3000 \text{ об/хв}$, $T = 40 \text{ год}$, $C = 3,5 \text{ г/л}$, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт 8.1 Сепарування культуральної рідини	Час, біомаса	Годинник	Під час процесу відділення культуральної рідини	$n = 10000 \text{ об/хв}$, $T = 130 \text{ хв}$
Кх, Кт 9.1 Дезінтеграція клітинної стінки дріжджів	лізат, концентрація, час	Годинник	Під час процесу дезінтеграції	$C = 24\%$, $T = 130 \text{ хв}$

Закінчення табл. 5.26

1	2	3	4	5
Кт 9.2 Сепарування	β-глюкан, частота обертання, час	Годинник, датчик обертів	Під час процесу сепарування	n=5000 об/хв τ=60 хв
Кх, Кт 10.1 Екстрагування супутніх речовин β-глюкану	Екстракт, температура, час, концентрація	Термометр технічний, годинник	Під час процесу екстрагування	C=3%, t = 75°C, T=1 год
Кт 10.2 Ультрафільтрація	Фільтрат, діаметр пор		Під час процесу фільтрування	t = 80°C
Кх, Кт 10.3 Осадження β-глюкану	Фільтрат β- глюкану, концентрація, час обробки	Годинник	Під час процесу осадження	C=2М, T=60хв
Кх, Кт 10.4 Оброка 2М р-ном HCl з цимоліазою	Осад β- глюкану, концентрація, час обробки, температура	Годинник, термометр	Під час процесу очистки	C = 2М, t=37°C, T=16год
Кт 10.5 Ультрафільтрація	Осад β- глюкану, діаметр пор		Під час процесу фільтрування	d=6нм
Кт 11.1 Сушіння β-глюкану	Сухий β-глюкану, температура, вологість	Термометр технічний, датчик вологості	Температура визначається під час процесу сушіння, вологість після сушіння	t = 1000 °C, W=5%
Кт 12 Подрібнення та просіювання β-глюкану	Подрібнений β-глюкан , d сита, час	Годинник	Розмір отворів перевіряється перед просіюванням	τ=1,25 год, d= 15нм

Розділ 6. Опис технологічного процесу виробництва ЛЗ

6.1 Специфікація обладнання ділянки виробництва ЛЗ

Специфікація обладнання, яке відображене на апаратурній схемі, та наведено табл. 6.27, нижче.

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.01 КР ПЗ</i>			
<i>Зм.</i>	<i>Арк</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розробив.</i>		<i>Багатиренко</i>			<i>Розділ 6. Опис технологічного процесу виробництва ЛЗ</i>	<i>Літера</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Консульт</i>							141	192
<i>Керівник</i>		<i>Тетеріна С.М</i>				143 <i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Зав.Кафедр</i>		<i>Стабніков В.П</i>						

**Специфікація обладнання ділянки виготовлення лікарського препарату
β-глюкану в капсулах**

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
ПМ-1	Пральна машина	1	Машина, завантаження сухої білизни- до 30 кг. Геометричний ж об'єм внутрішнього барабана складає 300 куб.дм.
СШ-2	Сушильна шафа	1	Завантажувальна ж маса сухої білизни- складає -25 кг. Геометричний ж об'єм внутрішнього барабана становить- 514 куб.дм. Продуктивність ж становить -75 кг/год.
С-3	Стіл для пакування одягу	1	Розмір в мм: 300×1000×600.
СТ-4	Стерилізатор паровий для стерилізації інвентарю та одягу	1	Виробник: Робочий об'єм: 400 л (діаметр 0.7 м х 1.1 м). Робочий тиск не більше 0,22 Мпа. Максимальна температура 134°C.
Ст-5	Стелаж для зберігання і транспортування білизни	1	На колесах, які обертаються фірми "Unit"(Німеччина), має три просторі полиці, а також- завантажувальна маса сухої білизни складає :3х35кг.
Д-6, Д-9, Д-12	Об'ємно-ваговий дозатор	3	Дозатор виробництва НВП "Техноаги". Точність зважування становить 0,1%
Р-7	Реактор змішувач для приготування 3% розчину перекису водню	1	Реактор із матеріалу сталь об'єм, якого становить 160 л, оснащений також перемішуючим пристроєм, виробник Україна.

1	2	3	4
Н-8, Н-11, Н-14, Н-15, Н-24, Н-28	Насос Відцентровий	6	Насос фірми Debem MB 100, виготовлений із високоякісної сталі. Продуктивність становить- 12,6 м³/год, а потужність електродвигуна складає- 120кВт. Виробник: «Debem» (Україна).
Р-10	Реактор змішувач для приготування 6% розчину перекису водню	1	Реактор із нержавіючої сталі об'єм якого складає- 160 л, оснащений так званим, перемішуючим пристроєм, виробником є «Стройторгсервис» (Україна).
Р-13	Реактор змішувач для приготування 76% розчину етанолу	1	Реактор із нержавіючої сталі об'єм якого складає- 160 л, оснащений так званим, перемішуючим пристроєм, виробником є «Стройторгсервис» (Україна).
Ф-16	Патронний фільтр	1	Фільтр „Укрфільтр”, із розміром пор - 0,45 мкм, габарити мають насупні розміри (Д х Ш х В) (мм):122 х 122 х 116
З-17	Збірник води	1	Збірник для зберігання водопровідної води, об'ємом 8 м³

Н-18	Нагнітаючий насос	1	Автоматична установка водопостачання Stichl SR200, продуктивність складає 3м ³ /год., а максимальний тиск становить - 6 бар, максимальна ж температура- 40 °С.
Ф-19	Патронний фільтр	1	Фільтр „Укрфільтр”, із розміром пор - 0,45 мкм, габарити мають насупні розміри (Д х Ш х В) (мм): 122 х 122 х 116
Ф-20	Пісочний фільтр	1	Фільтром виступає кварцевий пісок, який має розміри- 2,0-3,0 мм
Ф-21	Вугільний фільтр.	1	Фільтр New filter, фільтруючий матеріал – гранульоване активоване вугілля, ефективний адсорбент, який здатний усувати домішки з молекулярною масою понад 40 Да. Робоча ж температура становить : 4-30 ° С, а робочий тиск: 3-7 атм, продуктивність складає-2,3 м ³ /год.
П-22	Установка для пом'якшення води	1	Представлений іонообмінним катіонітом, продуктивність якого становить -1,8-2,0 м ³ /год.
Ф-23	Патронний фільтр	1	Фільтр „Укрфільтр”, із розміром пор - 0,45 мкм, габарити мають насупні розміри (Д х Ш х В) (мм): 122 х 122 х 116
Н-25	Висконапірний насос	1	Насос Tsurumi, тиск 55-60 бар. Максимальний напір:66м. Потужність:22КВт.

1	2	3	4
ЗО-26	Установка зворотного осмосу	1	Установка Ecosoft MO12000LPD MINI, яка має продуктивність- 2 м³/год очищеної води
З-27	Збірник очищеної води	1	Збірник для очищеної води об'єм якого складає- 4 м³
Ф-29	Фільтр патронний.	1	Фільтр „Укрфільтр”, із розміром пор - 0,45 мкм, габарити мають насупні розміри (Д х Ш х В) (мм): 122 х 122 х 116.
О-30	Опромінювач води ультрафіолетовий.	1	Фірми -Aquafilter FP3-PLUS (Україна), потужність якого становить- 40 Вт, а напруга- 220 В, максимальний ж робочий тиск сягає вже до 8 бар, а продуктивність складає -2,721 л / год, максимальна температура води 40 ° С
ПЗ-31	Повітрозабірник	1	Повітрозабірник серії DANI ВЗ-12-1-1, виробник Росія, із продуктивність -1800 м³/год. Обладнаний металевою сіткою для видалення механічних забруднень.
Ф-32, Ф-38	Фільтр грубої очистки	2	Фірми Alterair (Україна), а фільтруючий матеріал – являє собою - пінополіуретан, із ефективністю очищення 65-90%частинок та розміром 5 мкм, перепад тиску становить 250 Па
В-33, В-37	Вентилятор	2	Продуктивність складає-1800 м³/год, а частота обертання сягає-2800 об/хв.
К-34	Кондиціонер	1	Потужність сягає -1,15 Вт, а напруга в межах -220-240 В, холодоагентом є R410A,а теплопродуктивність становить-4 кВт, виробником є Чехія.

1	2	3	4
Ф-35	Фільтр тонкої очистки	1	Ефективність очищення сягає 70% частинок розміром до 1 мкм, фільтруючий ж матеріал являє собою-скловолокно.
Ф-36	Фільтр НЕРА	1	Фільтр ж фірми New Filter -Україна, ефективність очищення якого сягає 99.95%, а фільтруючим матеріалом є склопапір
З-39, З-45	Збірник для β -глюкану	2	Реактор із сталі нержавіючої, об'єм якого складає -250 л, виробником є «Стройторгсервис» (Україна)
З-40, З-46	Збірник для допоміжних речовин	2	Реактор із сталі нержавіючої, об'єм якого складає -100 л, виробником є «Стройторгсервис» (Україна)
В-41, В-42	Ваги	2	Вантажопідйомність сягає- 120-150 кг. Межі ж зважування від 10 до 150 кг . А ціна ділення 50 г. Погрішність сягає $\pm 0,15$ кг.
С-43	Вібросито	1	Виробник завод “Прогресс”. Потужність складає -2,2 кВт. Продуктивністю є 700 кг/год.
С-44	Вібросито	1	Виробником є завод “Прогресс”. Споживана потужність складає- 2,2 кВт. Продуктивністю є 700 кг/год. Загрузка-вручну вивозка відбувається самоплином.
Р-47	Реактор змішувач для отримання порошку для наповнення	1	Реактор із сталі об'єм складає 250 л, який оснащений перемішуючим пристроєм, виробником є «Стройторгсервис» (Україна)
З-48	Збірник порошку для наповнення	1	Реактор із сталі об'єм складає 250 л, який оснащений перемішуючим пристроєм, виробником є «Стройторгсервис» (Україна).

1	2	3	4
КН-49	Установка для наповненню желатинових капсул	1	Установка типу SD фірми ІМА (Китай), із продуктивністю 25000 капсул за годину. Загрузка, а також вручну вигрузка- відбувається- самоплином.
З-50	Збірник для наповнених капсул	1	Реактор із сталі об'ємом- 250 л, який оснащений перемішуючим пристроєм, виробником є «МашТех (Росія)».
З-51, З-53, З-55	Збірник для некондиційних капсул	3	Реактор із сталі об'ємом- 40 л, який оснащений перемішуючим пристроєм, виробником є «МашТех (Росія)».
С-51	Сито для обезпилювання капсул	1	Діаметр отвору сита сягає (5,0+0,09) мм, а завантаження і вивантаження відбувається- вручну.
З-52	Збірник для знепиленних капсул	1	Реактор із нержавіючої сталі складає об'єм- 250 л, при чому оснащений перемішуючим пристроєм.
ФЛ-54	Лінія фасовки капсул у флакони	1	Автоматична ж лінія для фасування капсул , яка має назву- МашТех (Росія). Автомат здійснює фасування капсул безпосередньо, у флакони, а також конвеєрні ваги, та автомат для запайки та нанесення маркування на флакон .
ПМ-56	Машина для упаковки флаконів в коробки	1	Машина типу CVC 1600 (Росія), продуктивність якої сягає 30-50 упаковок за хв.

1	2	3	4
ПМ-57	Машина для пакування у групову упаковку	1	Машина типу Romaco Promatic PAK 100 (Італія), продуктивність якої сягає – 5 коробок на хв.
РМ-58	Машина для різки некондиційних капсул	1	Продуктивність сягає- 60 кг/год. Загрузка, а також вручну вигрузка відбувається самоплином, виробником є Україна.

6.2 Опис технологічного процесу виробництва ЛЗ

Технологічна схема отримання β -глюкану, яка представлена і відображає таку лікарську форму як, капсули : (санітарна підготовка виробництва (а саме, підготовка персоналу, за тим технологічного одягу, після чого дезінфікуючих засобів, а також - приміщень, та самого обладнання), за тим підготовка вентиляційного повітря, а також підготовка води очищеної, та підготовка сировини), крім того, сам технологічний процес (а саме, підготовка маси для наповнення капсул, та саме наповнення капсул) та стадії пакування, а також маркування, і відвантаження (крім того, фасування капсул у блістери, а також пакування у картонні пачки та пакування пачок вже саме у групову тару).

ДР 1. Підготовка персоналу до роботи

ДР 1.1. Навчання персоналу

При прийнятті ж на саму роботу персоналу необхідно пройти підготовку за фахом, періодично персонал проходить так званий технологічний інструктаж. Також навчання персоналу включає також вивчення посадових інструкцій, а також правил внутрішнього розпорядку підприємства, при чому вивчення вимог санітарії, а також правил особистої гігієни, і заходів пожежної безпеки.

ДР 1.2. Перевірка знань персоналу

Після ж закінчення навчання, робітники обов'язково повинні пройти перевірку отриманих знань, згідно правилам GMP - у формі тестування; а також по знанням СОП.

ДР 1.3. Підготовка до роботи у чистих приміщеннях

У гардеробній ж верхнього одягу персонал повинен знімати верхній одяг, а також надягати перехідний одяг (халат, або ж шапочку або ж косинку, тапочки), що використовують для переміщення персоналу поза виробничими зонами.

В якості ж, дезінфікуючого засобу використовують «*Sterillium*». Витрата якого виходячи із розрахунку 9-10 мл на людину вдень, то обробку рук проводять відповідно до вимог інструкції. Дезобробку рук необхідно проводити через кожні 2-3 години, але ж і не менше, 3 разів в зміну.

Після того, як надіто вже весь комплект одягу (*від ДР 2.6*), тоді персонал повинен обробити руки вже антисептиком, а також рукавички після чого він входить у виробничі приміщення. При необхідності ж вийти з виробничого приміщення персонал повинен робить операції перевдягання, у зворотному порядку.

Контроль мікробної мікрофлори рук персоналу здійснюється за допомогою так званих змивів тампонами, після чого ж обробка рук антисептиками.

Під час вже самого виробничого процесу в змивах з рук (рукавичок) допускається вже наявність не більше, як 10 мікроорганізмів (бактерій, а також і грибів сумарно) на 100 см² площі поверхні одягу чи площі однієї рукавички, та не допускається наявність бактерій родів *Enterobacteriaceae*, *S.aureus* та *P.aeruginosa*.

ДР 2. Підготовка технологічного одягу

ДР 2.1. Прання технологічного одягу

Прання одягу проводять в спеціальній пральній машині (ПМ-1), протягом 20-30 хвилин із моменту вже включення машини. На кожний ж кілограм одягу, повинно припадати не менш ніж 10 л розчину вже миючого засобу. Для прання ж слід використовувати синтетичні миючі засоби, вони володіють низькими піноутворюючими властивостями. Із концентрацією розчину – 2 г/л, рекомендована ж температура прання майже- 90°C.

ДР 2.2. Ополіскування технологічного одягу

Після вже закінчення прання одяг необхідно кілька разів ополіскують, при чому протягом 20-30 хвилин водою вже очищеною (*від ДР 6.4*).

ДР 2.3. Сушіння технологічного одягу

Після вже прання одяг потрібно струсити, а вже потім розвішувати його в спеціальну шафу (СШ-2), в яку через фільтр тонкого очищення поступає саме тепле повітря при температурі вже 100°C протягом -120 хвилин, задля його дезінфекції.

ДР 2.4. Пакування технологічного одягу

Після закінчення вже сушки кожен ж комплект технологічного одягу загортають приблизно у два шари пергаменту на столі (С-3). Після цього ж, згортки поміщають в контейнери, після чого одяг передають на наступну стадію-стерилізацію.

ДР 2.5. Стерилізація технологічного одягу

Стерилізацію ж технологічного одягу проводять вже у стерилізаторах (СТ-4) при вже надлишковому тиску 0,11 МПа, а температурі- 132 °С, протягом 45 хвилин. Після закінчення ж процесу стерилізації необхідно спустити пару, а також підсушити одяг і після чого охолодити його стерильним повітрям.

ДР 2.6. Зберігання технологічного одягу

Зберігаються на стелажах (Ст-5) в спеціальному окремому приміщенні, із вже забезпеченням збереження упаковки, що по класу чистоти і перевищує приміщення, в якому одяг повинен експлуатуватися при відносній вже вологості приміщення не більше, ніж 60%.

Мікробіологічний ж контроль одягу здійснюють вибірково при чому у декількох робітників, але ж не рідше ніж раз у тиждень. У змивах ж допускається і наявність не більше, ніж 10 мікроорганізмів (а саме, бактерій та грибів вже сумарно) на 100 см² площі поверхні, при відсутності ж бактерій родини-*Enterobacteriaceae*.

ДР 3. Підготовка дезінфікуючих розчинів

ДР 3.1. Приготування розчину перекису водню 3% та 6%.

Для приготування вже 100 л 3 % розчину перекису водню у реактор-змішувач (Р-7) об'єм, якого становить- 160 л, та обладнений перемішуючим пристроєм, вже через об'ємно-ваговий дозатор (Д-6) вносять призно 11 л 30% розчину перекису

водню, а також додають- 89 л води очищеної (від ДР 6.4) і після чого вмикають перемішуючий пристрій.

ДР 3.2. Приготування розчину етанолу 76%.

Для приготування ж 100 л спирту етилового 76 % у реактор-змішувач (Р-13) об'ємом 160 л, вносимо- 79,2 л 96% етилового спирту, після чого додають- 20,8 л води очищеної (від ДР 6.4) та після вмикають перемішуючий пристрій. Приготовлений ж розчин спирту етилового 76% зберігають в спеціально герметично закритій скляній посудині в самому прохолодному місці не більше 5-6 діб.

ДР 3.3. Приготування робочого розчину «біолонг»

Для дезінфекції поверхонь потрібно приготувати- 0,3% розчин «біолонг». У відро об'ємом- 10 л заливають -30 мл концентрату дезінфікуючого розчину, а також- 10 л водопровідної води. Зміна ж відра відбувається через кожні вже 10 м² приміщення.

ДР 3.4. Приготування робочого розчину «Сараклін»

Для дезінфекції ж поверхонь, побхідно приготувати вже 0,1% розчин «Сараклін». У відро об'єм якого- 10 л додають також 10 мл концентрату дезінфікуючого розчину, після чого-10 л водопровідної води. Зміна ж відра відбувається вже через кожні 10 м² приміщення.

Розчин, який використовують вже для щоденної обробки стін, та дверей, а також -підлоги, зовнішніх поверхонь технологічного обладнання, а також- обробки виробничої зони вже контролю якості.

ДР 4. Підготовка виробничих приміщень

ДР 4.1. Щоденне прибирання

Щоденне ж очищення, а також- дезінфекцію приміщень проводять по закінченню виробничого процесу, та особливо після кожної зміни. Збирають розсипані тверді інгредієнти. Відходи при фасовці, а також упаковці препарату.

Проводять вологе прибирання вже теплою водою із застосуванням також робочого розчину «біолонг» (від ДР 3.3) або ж «Сараклін» (від ДР 3.4), із розрахунком- 100 мл/м², при цьому протираючи поролоновою губкою панелі, а

також стіни, та двері, крім цього ручки дверей, та повітропроводи, чи опалювальні прилади, а простір за ними, потім цим ж розчином миють вже підлогу. Обробку ж приміщень починають вже в точці, найбільш віддаленої від даних дверей.

Після використання матеріали для обробки протягом 2-3 годин знешкоджують замочуванням в розчині пероксиду водню 6% (від ДР 3.1).

ДР 4.2. Генеральне прибирання

Генеральну ж підготовку виробничих приміщень D класу чистоти потрібно проводити вже робочим розчином «біолонг» (від ДР 3.3) або ж «Сараклін» (від ДР 3.4).

Також проводиться очищення і освітлювального оснащення, а також скляних поверхонь, та віконних рам.

На поверхнях ж виробничих приміщень у процесі виробництва допускається не більше, як 1 КУО на 100 см² площі поверхні, а також не допускається наявність вже бактерій родини *Enterobacteriaceae*, *S. Aureus*, а також *P.aeruginosa*; повинні бути відсутніми залишки також миючих розчинів на поверхні вже самих приміщень.

ДР 5. Підготовка обладнання, інвентарю та трубопроводів

ДР 5.1. Миття обладнання та комунікацій

Перед самим початком технологічного процесу, а також після закінчення роботи або ж перед самим виготовленням кожної серії нового найменування препарату (щомісячно) апаратуру, або ж устаткування, інвентар (а саме: змішувач, та сушильна шафа, автомати для упаковки і ін.) звільняють їх від залишків продукту попередньої операції, та очищають вручну за допомогою лопатки.

Після чого ж зовнішні частини устаткування, та інвентар, а також розбірні деталі не дотичні із продуктом, вже миють серветками із тканини та забитими краями або ж паролоновими губками, змоченими тим самим миючим 3% розчином перекису водню (від ДР 3.1), промивають вже гарячою водою із питною з температурою вже 40-60°C. Матеріали ж, і інвентар для обробки устаткування потрібно також маркувати, та вже зберігати в спеціальному приміщенні і використовувати строго за назначенням.

Потім обладнання промивають вже водою очищеною до одержання позитивного результату.

ДР 5.2. Технічний огляд обладнання

Технічний огляд обладнання потрібно здійснюється технологом, або ж самим майстром ділянки. При виявленні ж недоліків, або ж несправності обладнання проводиться його ремонт.

ДР 5.3. Дезінфекція обладнання та комунікацій

Внутрішні частини устаткування, а також самі розбірні деталі, які ж і стикаються із продуктом, піддають дезінфекції- 76% розчином етилового спирту (від ДР 3.2). Після ж використання матеріали для обробки протягом 2-3 годин знешкоджують, а саме за допомогою замочування в розчині пероксиду водню 6% (від ДР 3.1).

ДР 6. Підготовка води очищеної

ДР 6.1. Подача води

Водопровідна вода ж через патронний фільтр (Ф-16), а саме за допомогою насосу (Н-15) поступає в спеціальний накопичувальний збірник (З-17). Оптимальна ж температура води, що подається на установку очищення води складає вже - 25⁰С, для цього ж в збірник (З-17) добавляють і гарячу воду.

ДР 6.2. Отримання води знесоленої

ДР 6.2.1. Очистка через пісочний фільтр

Питна вода (від ДР 6.1) із збірника (З-17) вже за допомогою насосу (Н-18) подається на так званий патронний фільтр (Ф-19), а далі вже на сам пісочний фільтр (Ф-20), при цьому ж підтримується і постійне значення тиску в лінії вже подачі води 3-4 бар. Пісочний ж фільтр затримує домішки розміром- до 10 мкм.

ДР 6.2.2. Очистка через вугільний фільтр

Після пісочного ж фільтра вода (від ДР 6.2.1), яка поступає на вугільний фільтр (Ф-21), а фільтрація вже через вугільний патронний фільтр дозволяє і знизити концентрацію органічних речовин, а також хлору.

ДР 6.2.3 Пом`якшення води

Вода (від ДР 6.2.2) ж , яка подається на установку пом'якшення води (П-22), а вода вже після установки пом'якшення, повинна мати жорсткість не більшу 0,3 мг-екв/дм³, а інакше установку відключають вже на регенерацію.

ДР 6.2.4. Остаточна очистка води від механічних домішок

Пом'якшена ж вода (від ДР 6.2.3) поступає на патронний фільтр (Ф-23), який вже служить для остаточної очистки від вже механічних домішок перед насосом так званого початкового тиску. Насос вже початкового тиску (Н-24) підвищує й початковий тиск води перед вже високонапірним насосом (Н-25) до значення в межах 3,5-4,0 бар.

ДР 6.3. Отримання води очищеної

ДР 6.3.1. Зворотньоосмотичне фільтрування

Насос (Н-25) підвищує вже тиск води (від ДР 6.2.4) десь до 30-65 бар, та в результаті чого приблизно до 30 % поданої води проштовхують вже на сторону чистої води проходячи через мембрани модуля установки, зворотного осмосу (ЗО-26). Іони солей, або ж інші забруднення -не можуть проникнути через мембрану, і разом із залишком поданої води починають витіснятися наступною порцією води, що надходить вже до модуля.

Концентрат, який через клапан при нормальній роботі установки направляється вже на каналізаційний колектор (до ЗВ 13.1), для його здійснення контролю вже очищеної води та відбирають пробу, через вентиль їх відбору проби.

Якщо ж електропровідність очищеної води менша за межу 10 мкС/см, то ж очищена вода направляється в так званий збірник очищеної води (З-27).

ДР 6.4. Розподіл води очищеної

Вода очищена (від ДР 6.3.1) вже із збірника (З-27) за допомогою насоса (Н-28) подається через патронний фільтр (Ф-29) із розміром пор -0,2 мкм, а також бактерицидний опромінювач (О-30) в саме замкнутий циркуляційний контур, із якого і надходить на виробництво.

ДР 7. Підготовка вентиляційного повітря

Очищення ж повітря, що подається у саме виробничі приміщення класу чистоти D, проводять 3-х східчастій системі, а саме: попередньої, тонкої і надтонкої очистки.

ДР 7.1. Забір повітря

Повітря вже через повітрозбірник (ПЗ-31) потрапляє на самі фільтри грубої очистки.

ДР 7.2. Грубе очищення повітря

Попереднє ж очищення вхідного повітря від пилу здійснюються в таких фільтрах грубої очистки (клас G3) (Ф-32), а саме через пінополіуретан з ефективністю очищення 65-90% частинок розміром 5 мкм.

ДР 7.3. Транспортування технологічного повітря

Після ж фільтрів (Ф-32) вже попереднього очищення, повітря, надходить у систему вентиляції за рахунок спеціальних вентиляторів (В-33).

ДР 7.4. Регуляція термодинамічних показників повітря

Повітря ж надходить у кондиціонер (К-34), де воно і охолоджується, а з повітря конденсується волога, після чого ж, додатково підігрівається до температури вже десь 30-35°C, а вологість повітря має становити- 60%.

ДР 7.5. Тонке очищення повітря

Далі ж повітря вже поступає на фільтри тонкого очищення, в якості яких, і використовують фільтри (Ф-35) із скловолокном в якості фільтруючого матеріалу. Ефективність ж очищення становить- 70% частинок розміром 1 мкм. В процесі ж експлуатації фільтри з тонкого очищення повітря не піддаються обробці, а згодом підлягають заміні на вже нові.

ДР 7.6. Надтонке очищення повітря

На останньому ж етапі повітря знаходить вже на НЕРА-фільтри (Ф-36) зі скло папером, який виступає в якості фільтруючого матеріалу, вже для видалення частинок розміром- 0,3 мкм. Ефективність ж очищення- 99,95%. Після даної стадії очистки повітря подається вже у приміщення класу чистоти- D.

Проводиться мікробіологічний контроль для очищеного повітря не рідше ніж 1 разу на тиждень, повинно ж бути не більше- 200 КУО життєздатних мікроорганізмів на 1 м³ повітря.

ДР 8. Підготовка сировини

Сировина, а також допоміжні матеріали, які і використовуються при виробництві β-глюкану в капсулах, надходять зі складу заводу на візках або ж автокарах в первинній тарі постачальника із обов'язковою вказівкою статусу сировини та наявністю протоколу, аналізу вхідного контролю. Отримана вже зі складу сировина зберігається і в спеціально відведеній коморі, в кількості необхідній для виробництва такої однієї серії.

ДР. 8.1. Зважування сировини

Субстанцію ж β-глюкану, вже зважують на вагах (В-41), після чого і переносять у збірник (З-39). На вагах зважують також зважують(В-42) магній стеарат, а також целюлозу мікрокристалічну, і крохмаль картопляний, після чого це переносять у збірник (З-40)

ДР. 8.2. Просіювання сировини

Після чого, β-глюкан (від ДР 8.1) вже просіюють на просіювачі (С-43) із ситом таких номерів, як №11 або №20. Завантаження супроводжується вже вручну, за допомогою совка, а вивантаження здійснюється самоплином у збірник (З-45).

Допоміжні речовини (від ДР 8.1) просіюють вже на просіювачі (С-44) із ситом №32 або №38. Завантаження проводять вручну, також із допомогою совка, а вивантаження здійснюється самоплином безпосередньо у збірник (З-46).

ТП 9. Одержання маси для наповнення капсул

ТП 9.1. Змішування

Здійснюється в самому реакторі-змішувачі (Р-47). А Сировину (від ДР 8.2) завантажують із збірників (З-45, З-46) вже до реактора-змішувача (Р-47) за допомогою, так званого вакуумного завантаження та перемішують протягом 3 хвилин. Готова ж маса для наповнення капсул вже вивантажується у збірник (З-48).

ТП 10. Наповнення капсул, знепилювання і полірування

ТП 10.1. Наповнення капсул

Заповнюють відбувається спочатку порожніми капсулами бункери для капсул. Наповнення ж, капсул проводиться у спеціальному автоматичному режимі, при тиску стиснутого повітря – 6 бар (0,6МПа), та тиску вакууму – 0,02 бар (0,002 МПа). Наповнення ж, твердих желатинових капсул здійснюється у п'ять операцій: 1) спочатку здійснюється орієнтування порожніх капсул, 2) тоді розкриття порожніх капсул, 3) а також, наповнення корпусу капсули, який здійснюється вже шляхом подання наповнювача із бункера по дозувальному каналові, з якого і порошок надходить у корпус самої капсули. Після цього ж відбувається, 4)з'єднання, а також закриття тіла та кришечки капсули, 5)далі ж, капсули заклеюються так званою, підпавленою стрічкою желатину або ж полівінілового спирту. Далі йде відбракування порожніх капсул (легко відсмоктуються, при меншій масі), які вже і, вивантажуються у збірник (З-50).

Вивантаження наповнених капсул здійснюється стиснутим повітрям відразу на обезпилювач (С-51).

ТП 10.2. Знепилювання і полірування капсул

Обезпилювання і полірування капсул (від ТП 10.1) здійснюють, безпосередньо, на установці (С-51). Обезпилені ж капсули надходять у сам збірник (З-52). Некондиційні ж капсули направляються у збірник (З-53).

ПМВ 11. Фасування капсул, пакування і маркування

ПМВ 11.1. Фасування капсул у флакони

Капсули (від ТП 10.2) вже із збірника (З-52) завантажують в сам бункер фасувального автомату для фасування капсул (ФЛ-54).

Капсули ж із бункера автоматично по конвеєру проходять через станцію розпізнавання, де і відбувається відлік приблизно 60 капсул, та їх фасування за допомогою спеціального погрузного сопла у флакон, що і виключає можливість втрати продукту. Після цього ж флакони із капсулами переміщаються за допомогою стрічки.

Після чого флакони з капсулами проходять по вагам, перевіряється маса флаконів із самими капсулами. Система ж подає звуковий сигнал при виявленні якогось відхилення у фазі.

Далі ж, вже за допомогою ватонабивного автомату, здійснюється і накладання вати у флакон із самими капсулами, аби ж капсули не стиралися в самому процесі транспортування, або ж при зберігання.

Після цього ж, здійснюється закручування кришки.

Далі відбувається герметичне запаювання горлечка флакону так званою алюмінієвою мембраною, що і, гарантує справжність, а також стійкість продукту та захищає їх від зовнішніх факторів під час самого транспортування.

Для закупорювання ж мембраною флакон із попередньо закрученою кришкою по конвеєру надходить на сам автомат до індукційного запаювання. Індукційна ж котушка випромінює таке високочастотне електромагнітне поле, а алюмінієвий диск нагрівається і полімер, нанесений на даний диск та плавиться і припаюється до горлечка флакона.

Після цього ж, флакони направляються на етикетування.

На самій етикетці, виготовленій поліграфічним способом друку, попередньо вказують саму назву препарату(β -глюкан), а також концентрацію(500 мг), виробника, і умови зберігання.

При проходженні ж стрічки з етикетками через спеціальний друкарський пристрій на етикетку наносять номер серії, а також термін придатності.

При русі флаконів по транспортеру флакони затискуються направляючими і стеновими роликами, та на них вже і приклеюється етикетка.

Розфасовані у флакони капсули передають на операцію ПМВ 11.2.

ПМВ 11.2 Пакування флаконів у пачки.

Пакування ж флаконів з капсулами (від ПМВ 11.1) у вторинну упаковку – картонні пачки здійснюється на спеціальній фасувально-пакувальній машині (ПМ-56). На самих картонних пачках попередньо, зазначають назву виробника, його також товарний знак, а також адресу, і назву препарату латинською та українською

мовами, концентрація, та умови зберігання, реєстраційний номер, і насамперед, штриховий код.

Упаковки передають на станцію ПМВ 11.3.

ПМВ 11.3. Пакування пачок у групову тару

Пачки (від ПМВ 11.2) вкладаються десь по 35 штук у коробки на автоматі (ПМ-57). У кожен ж, коробку вкладається так званий талон «Пакувальник №», коробка обклеюється стрічкою. Під стрічку ж вкладають етикетку, затвердженого зразка.

Готова ж продукція із відповідним маркуванням, знаходиться вже на піддонах або ж стелажах в приміщеннях карантинного збереження до позитивного результату контролю готової вже продукції. Зберігається ж готова продукція на складі у сухому захищеному від світла місці, а саме при температурі від 15°C до 25°C.

ЗВ 12. Знешкодження відходів

ЗВ 12.1. Знешкодження рідких відходів

Виробничі стічні води (від мийки приміщень, устаткування, інвентарю) (від ДР 2.1.1, 2.1.2, 2.5, 4.1, 4.2, 5.1, 6.2.3, 6.3.1, 7.4) по санітарно - хімічних показниках відповідають нормативним вимогам та можуть зливатися в міську каналізаційну мережу без попереднього очищення.

ЗВ 12.2. Знешкодження твердих відходів

Тверді ж відходи (пил лікарських засобів), які осідають в рукавних фільтрах систем місцевих відсмоктувань та вакуумних пилеприбирань збираються в спеціальні мішки, а після чого вже утилізуються. Збір та утилізація твердих відходів виробництва (упаковки, тари і т. д.) направляються вже на переробку, так пластмасові флакони піддають знов повторному використанню після вже переробки.

ЗВ 12.3. Очистка відрацьованого повітря.

Відпрацьоване ж повітря із виробничих приміщень за допомогою вентилятора (В-37) направляється вже на фільтри класу G3 (Ф-38) та там очищається від пилу та

різних домішок, ефективність ж очищення складає від 65 до 90% частинок розміром -5 мкм.

6.3. Контроль ділянки виробництва ЛЗ

Контроль мікробіологічної чистоти рук та одягу персоналу, який працює у виробничих приміщеннях

Використовують метод змивів тампонами.

Випробування ж проводять у лабораторії, при чому дотримуючись правил асептики. Тампон ретельно потрібно ополіснути в пробірці, яка містить 10 мл буферного розчину із натрію хлоридом, а також пептоном рН 7.0.

Потім з кожної пробірки, яка містить змивну рідину, роблять посів дець по 1 мл в дві чашки Петрі, із поживним середовищем для вирощування бактерій та в дві з поживним середовищем для вирощування грибів, використовуючи один з наведених нижче методів, описаних в ДФУ (розділ 2.6.12):

- метод глибинного висівання;
- метод двошарового висівання.

Після чого 5 мл змивної рідини вносять у флакон із 50 мл рідкого поживного середовища N 3, описаного вже в ДФУ (розділ 2.6.13).

При проведенні ж випробування на наявність *S.aureus* і *P.aeruginosa* , а також 5 мл змивної рідини вносять вже у 50 мл відповідних рідких поживних середовищ, так само описаних в ДФУ (розділ 2.6.13).

Чашки Петрі з поживним середовищем для вирощування бактерій інкубують при температурі 32.5 ± 2.5 °C, з поживним середовищем для вирощування грибів - при температурі 22.5 ± 2.5 °C протягом 5 діб, флакони з поживними середовищами N 3 і N 8 - при температурі 32.5 ± 2.5 °C протягом 48 год.

У разі ж наявності росту мікроорганізмів, на поживних середовищах партію поживного середовища вважають вже непридатною.

Облік результатів: Після того як закінчується інкубація, то для кожного змиву із однієї руки підраховують кількість колоній вже на всіх чашках Петрі з кожним поживним середовищем, а після чого знаходять середнє арифметичне значення та, множачи його на 10.

При наявності ж візуальних ознак росту, як у флаконах із живильним середовищем №3 проводять так звану, ідентифікацію бактерій родини *Enterobacteriaceae* по ДФУ (розділ 2.6.13).

При проведенні ж випробування на наявність *S.aureus* і *P.aeruginosa*- ідентифікацію мікроорганізмів проводять, із використанням методу, описаним у ДФУ (розділ 2.6.13).

Контроль мікробіологічної чистоти поверхонь виробничих приміщень

Випробування методом відбитків.

Готують агарові пластини одним з наведених нижче способів:

- в чашки ж, Петрі діаметром 100 мм по радіусам 4 -шматки марлі, стерилізують, а потім заливають поживним середовищем. Після чого, застигання середовища його розрізають на 4 сектори, дотримуючись правил асептики;
- заливають таке поживне середовище у поглиблення кришечки та дають застигнути;
- використовують ж готові агарові пластини.

Перед вже подачею у бокс з матеріалами у виробничі приміщення їх зовнішні поверхні обробляють- спиртом етиловим (об'ємна частка 76 %).

Для виявлення росту бактерій використовують поживне середовище №1, для виявлення росту грибів - поживне середовище №2 для контролю мікробіологічної чистоти лікарських засобів, які описані в ДФУ (розділ 2.6.13).

Облік результатів: При випробуванні методом змивів для кожної контрольної точки підраховують кількість колоній в усіх чашках Петрі з кожним поживним середовищем, знаходять середнє арифметичне значення і, множачи його на 10, обчислюють кількість бактерій та грибів у змивах із 100 см² площі поверхні.

При випробуванні методом відбитків для кожної контрольної точки підраховують число колоній на всіх агарових пластинах з кожним поживним середовищем, знаходять середнє арифметичне значення і обчислюють число бактерій та грибів на 100см² площі поверхні по формулі:

$$X = \frac{100 \cdot x \cdot N}{S}$$

Де X - число колонієутворюючих мікроорганізмів на площі 100 см^2 ; N - середнє арифметичне значення числа колоній мікроорганізмів; S - площа пластини (см^2).

При проведенні випробування на наявність бактерій родини *Enterobacteriaceae*, *S. aureus* та *P. aeruginosa* ідентифікацію мікроорганізмів проводять використовуючи методи, що описані у ДФУ (розділ 2.6.13).

На поверхнях ж виробничих приміщень у процесі виробництва допускається не більше 1 КУО на 100 см^2 площі поверхні та не допускається наявність бактерій родини *Enterobacteriaceae*, *S. aureus* та *P. aeruginosa*. Результати випробувань реєструють.

Контроль видалення мийних засобів з поверхні приміщень

Наявність ж аніонних поверхнево-активних речовин, у промивній воді визначають шляхом їх додавання до 50 см^3 останньої порції промивної води по 5 крапель 1 % розчину фенолфталеїну та додають 15 см^3 хлороформу, після чого 10 см^3 змішаного індикатору та 10 см^3 0,004 моль/дм³ розчину гіаміну 1622. Зникнення ж рожевого та поява сіро-синього забарвлення свідчить про наявність цих залишків мийних засобів на основі аніонних поверхнево-активних речовин.

Контроль мікробіологічної чистоти технологічного обладнання

Проведення випробувань: Кожний ж тампон необхідно ретельно виполіскують у пробірці, яка містить- 10 мл стерильного буферного розчину із натрію хлоридом та пептоном на рівні- рН 7.0.

Чашки Петрі ж з поживним середовищем для вирощування бактерій інкубують при температурі порядку $32.5 \pm 2.5 \text{ }^\circ\text{C}$, з середовищем для вирощування грибів - при температурі $22.5 \pm 2.5 \text{ }^\circ\text{C}$ не менше- 5 діб.

При проведенні ж випробування на наявність бактерій родини *Enterobacteriaceae*, *S. aureus* та *P. aeruginosa*, 5 мл змивної рідини вносять вже у 50 мл відповідних рідких поживних середовищ, які інкубують при температурі $32.5 \pm 2.5 \text{ }^\circ\text{C}$ протягом 48 год.

Облік результатів: Після всього закінчення терміну інкубації, проводять перегляд чашок на їх наявність росту мікроорганізмів. При проведенні ж

випробувань на наявність бактерій родини- *Enterobacteriaceae*, *S.aureus* і *P.aeruginosa* ідентифікацію мікроорганізмів проводять використовуючи методи, які описані у ДФУ (розділ 2.6.13).

У змивах ж із технологічного обладнання безпосередньо, після їх обробки не повинні бути життєздатні м/о.

Контроль повноти видалення дезінфікуючих засобів з поверхні обладнання

Повноту ж видалення перекису водню із поверхні об'єктів контролюють шляхом додавання до 1 см³ останньої порції, а саме промивної води 0.2 см³ розведеної ж соляної кислоти. Поява такого синього забарвлення ефірного шару, після збовтування свідчить про наявність залишків саме перекису водню на поверхні оброблених об'єктів.

Допускається ж контролювати повноту видалення таких залишків дезінфекційних, а також мийно-дезінфекційних засобів із групи, а також з робочих поверхонь технологічного обладнання, комунікацій, а також інвентарю, за допомогою індикаторного паперу (ТУ 6-09-3409).

Індикаторний йод-крохмальний папір зволожують промивною водою. Зміна кольору індикаторного паперу до синього чи синьо-чорного свідчить про наявність залишків дезінфекційних засобів із групи окислювачів на поверхні об'єкту.

Контроль вмісту мікроорганізмів в повітрі

Контроль ж вмісту мікроорганізмів, в повітрі виробничих приміщень слід проводити вже під час самого виробничого процесу приміщень класу D, не рідше як одного разу на тиждень, так званим аспіраційним методом, який і заснований на принципі ударної дії струму повітря

Випробування аспіраційним методом: У кожній контрольній точці, відбирають проби в дві або більше чашки Петрі з поживним середовищем для вирощування бактерій та поживним середовищем для вирощування грибів.

Об'єм ж проби залежить, і від очікуваної концентрації мікроорганізмів, а саме у повітрі. Сумарний ж об'єм проби має бути таким, аби ж для кожної контрольної

точки- сумарне число колоній, які вже зросли на поверхні агару в усіх чашках Петрі, не менше- 40.

Мінімальний сумарний об'єм проби V (м^3) у кожній контрольній точці обчислюють за такою формулою:

$$V = \frac{40}{N}$$

Де N - максимальна допустима кількість мікроорганізмів в 1м^3 повітря приміщень класу чистоти, що досліджується.

Мінімальний ж об'єм проби $V(i)$ (м^3), що припадає на кожну чашку, обчислюють за даною формулою:

$$V = \frac{V_i}{n}$$

Де V - мінімальний сумарний об'єм проби в кожній контрольній точці; n - кількість чашок Петрі, що використовуються в кожній контрольній точці.

Облік та інтерпретація результатів: Після закінчення інкубації проводять підрахунок кількості колоній мікроорганізмів, що утворилися в чашках Петрі з кожним поживним середовищем, знаходять середнє арифметичне значення і обчислюють кількість бактерій та грибів в 1 м^3 повітря.

Карта постадійного контролю наведена у *табл. 5.3*.

Карта контролю

Таблиця 6.28

Карта постадійного контролю виробництва L-тирозину в капсулах

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
1	2	3	4	5
Км 1.3 Підготовка до роботи у чистих приміщеннях	Кількість колонеутворюючих одиниць, а також руки персоналу	Мікробіологічний метод, метод змивів тампонами	Не рідше одного разу на місяць, безпосередньо, вже після їх обробки та перед надяганням рукавичок, вже під час виробничого процесу - не рідше, як одного разу на тиждень, проте, вибірково у декількох робітників.	Після обробки ж рук антисептиками, в самих змивах з рук не повинні бути, міститися життєздатні м/о. Під час виробничого ж, процесу в змивах з рук може допускатися наявність вже не більше 10 мікроорганізмів (бактерій і грибів сумарно) на 100 см ² площі.
Кт, Кх 2.1 Прання технологічного одягу	Концентрація миючого засобу, сам одяг, час прання	Хімічний метод, термометр технічний, годинник	Під час прання одягу	C=0,3%, t=90°C, τ = 20-30 хв
Кт 2.2 Ополіскування технологічного одягу	Одяг, час ополіскування	Годинник	Під час ополіскування одягу	τ = 20-30 хв
Кт 2.3. Сушіння технологічного одягу	Одяг, температура повітря, час сушіння	Термометр технічний, годинник	Під час сушіння одягу	t=100°C, τ = 120 хв
Кт 2.5 Стерилізація технологічного одягу	Одяг, тиск температура пари, час стерилізації	Термометр технічний, манометр технічний, годинник	Під час стерилізації одягу	P=0,11 МПа, t=132 °C, τ = 45 хв

1	2	3	4	5
Кт, Км 2.6 Зберігання технологічного одягу	Одяг, вологість повітря, кількість колонійутворюючих одиниць	Логометр, мікробіологічний метод	Під час зберігання одягу, мікробіологічний контроль - вибірково у декількох робітників нерідше одного разу на тиждень.	W=60%, у змивах допускається наявність не більше 10 мікроорганізмів (бактерій і грибів сумарно) на 100 см ² площі поверхні, при відсутності бактерій родини <i>Enterobacteriaceae</i>
Кт, Кх 3.1 Приготування розчину перекису водню 3 та 6%	Розчин перекису водню, концентрація розчину, час зберігання	Хімічний метод, годинник	Після приготування розчину	C=3%, 6%, τ = 24 год
Кт, Кх 3.2 Приготування розчину етанолу 76%	Розчин етанолу, концентрація розчину, час зберігання	Хімічний метод, годинник	Після приготування розчину	C=76%, τ = 5-6 діб
Кх 3.3 Приготування робочого розчину «біолонг»	Розчин «біолонг», концентрація розчину	Хімічний метод	Після приготування розчину	C=0,3%
Кх 3.4 Приготування робочого розчину «Сараклін»	Розчин концентрація розчину «Сараклін»	Хімічний метод	Після приготування розчину	C=0,1%
Кт, Кх 4.1 Щоденне прибирання	Поверхні ж виробничих приміщень та кількість колонеутворюючих одиниць, а також наявність миючих засобів	Мікробіологічний метод змивів тампонами або ж, метод відбитків, а хімічний метод за допомогою залишків аніонних поверхнево-активних речовин.	Мікробіологічний ж контроль - не рідше ніж, одного разу на тиждень, а хімічний контроль - кожного разу.	У процесі ж виробництва допускається не більше ніж 1 КУО на 100 см ² площі та поверхні та не допускається наявність бактерій родини <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>S. Aureus</i> .

1	2	3	4	5
Кт, Кх 4.2. Генеральне прибирання	Поверхні виробничих приміщень; кількість колонеутворюючих одиниць, наявність миючих засобів	Мікробіологічний метод змивів тампонами або ж, метод відбитків, хімічний метод за залишками аніонних поверхнево-активних речовин	Мікробіологічний контроль - не рідше одного разу на тиждень під час виробничого процесу і не рідше одного разу на місяць після обробки дезінфекційними розчинами, хімічний контроль - кожного разу	Безпосередньо вже після обробки різними дезінфекційними розчинами, які не повинні знаходити життєздатні мікроорганізми. У процесі ж виробництва допускається не більше, як 1 КУО на вже 100 см ² площі поверхні та не допускається їх наявність бактерій родини <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>S. aureus</i> та <i>P. aeruginosa</i> ;
Кт 5.1 Миття обладнання та комунікацій	Обладнання та комунікації, температура води	Термометр технічний	Під час миття обладнання	t=40-60 °C
Кт 5.3 Дезінфекція обладнання	Обладнання та комунікації, час дезінфекції, кількість колонеутворюючих одиниць, наявність дезінфікуючих засобів	Годинник, мікробіологічний метод змивів тампонами, хімічний метод	Під час самої вже дезінфекції обладнання, а також мікробіологічний контроль - не рідше одного разу вже на місяць .	τ = 2-3 год, у змивах з технологічного обладнання безпосередньо після їх обробки не повинні знаходитися життєздатні мікроорганізми, відсутність залишків дезінфікуючих розчинів на поверхні обладнання
Кт 6.1 Подача води	Вода питна, температура води	Термометр технічний	Під час подачі води	t=25 °C
Кт 6.2.1 Очистка води через пісочний фільтр	Вода після пісочного фільтру, тиск	Манометр технічний	Під час фільтрації	P=3-4 бар
Кх 6.2.3 Пом'якшення води	Вода після пом'якшення, жорсткість води	Хімічний метод	Після пом'якшення	C= не більше 0,3 мг-екв/дм ³

1	2	3	4	5
Кт 6.2.4 Остаточка очистка від механічних домішок	Вода питна, тиск	Манометр технічний	Під час фільтрації	P=3,5-4 бар
Кт 6.3.1 Зворотноосмотичне фільтрування	Вода знесолена, тиск	Манометр технічний	Під час фільтрації	P=30-65 бар
Кт 7.2. Грубе очищення повітря	Повітря на виході з фільтра грубої очистки, ступінь очищення	Перевірка ступеня очищення, згідно паспорту фільтра Манометр технічний	Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення	E = 65-90 % (частинок розміром 5 мкм) тиск згідно паспорту
Кт 7.4 Регуляція термодинамічних показників повітря	Повітря, температура, вологість	Термометр, логометр	Після кондиціювання повітря	t = 30-35 °C, W=60%
Кт 7.5 Тонке очищення повітря	Повітря, ступінь очищення	Перевірка ступеня очищення, згідно паспорту фільтра Манометр технічний	Після очистки повітря у фільтрі тонкого очищення	E = 70 % (частинок розміром 1 мкм) тиск згідно паспорту
Кт 7.6 Надтонке очищення повітря	Повітря, ступінь очищення, кількість колонеутворюючих одиниць	Перевірка ступеня очищення, згідно паспорту фільтра Манометр технічний	Після очистки повітря у фільтрі надтонкого очищення, мікробіологічний контроль- не рідше 1 разу на тиждень	E = 99,95 % (частинок розміром 0,3 мкм) тиск згідно паспорту, не більше 200 КУО на м³
Кт 8.2 Просіювання сировини	Діюча та допоміжні речовини, діаметр сита	Візуальний контроль	Перед просіюванням	Діаметр отворів сита по номеру сита.
Кт 9.1. Змішування	Діюча та допоміжні речовини, час	Годинник	Під час змішування	$\tau = 3$ хв

Закінчення табл. 6.28

1	2	3	4	5
Кт 10.1 Наповнення капсул	Капсули, тиск повітря, тиск вакууму	Манометр технічний	Під час наповнення	Р(повітря)=6 бар (0,6 МПа), Р(вакууму)=0,02 бар (0,002 МПа)
Кт 11.1 Фасування капсул у флакони	Капсули, кількість капсул у флаконі	Датчик наповнення	Під час фасування	N= 90 капсул
Кт 11.3. Пакування пачок у групову тару	Пачки, кількість пачок у коробці	Візуальний контроль	Під час пакування	N= 35 штук
Кт 13.3. Очистка відпрацьованого повітря	Повітря, ступінь очищення	Перевірка ступеня очищення, згідно паспорту фільтра Манометр технічний	Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення	E = 65-90 % (частинок розміром 5 мкм) тиск згідно паспорту

Список використаної літератури

- 1)David Smith. Herd Immunity. *J. Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2019, 35(3):593-604. doi: 10.1016/j.cvfa.2019.07.001.
- 2)Ханюков О.О., Гашинова К.Ю., Євстігнєєв І.В. Імунодефіцитні стани у клінічній практиці. *Наукові праці ДМА.* 2019, 6(2):15-20.
- 3)Anne Geller, Rejeena Shrestha , Jun Yan. Yeast-Derived β -Glucan in Cancer. *J Mol Sci.* 2019, 20(15):3618. doi: 10.3390/ijms20153618
- 4)Man Z., Xin J., Yin-Feng Y. β -Glucan from *Saccharomyces cerevisiae* induces SBD-1 production in ovine ruminal epithelial cells via the Dectin-1-Syk-NF- κ B signaling pathway. 2019,53(2):304-315. doi: 10.1016/j.cellsig.2018.10.018.
- 5) Мокросноп В.М. Продуцирование запасного полисахарида микроводорослью *Euglena gracilis*. *J.Algologia.* 2018, 28(2):136-151. <https://doi.org/10.15407/alg28.02.136>. <file:///D:/Downloads/03-Mokrosnop.pdf>
- 6) Шарова Н.Ю. Динамика биосинтеза бета-глюканов микроорганизмами *Aspergillus niger*, *Streptomyces lucensis* и *Streptomyces violaceus* в процессе их культивирования на различных средах. *НИУ ИТМО.*2020,2(5):49-60.
- 7)Hemmo A. F., Taco W., Geert W. J. Diagnostic Yield of Next Generation Sequencing in Genetically Undiagnosed Patients with Primary Immunodeficiencies: a Systematic Review. *J Clin Immunol.* 2019,39(6):577-591. doi: 10.1007/s10875-019-00656-x.
- 8)Населення України певних вікових категорій. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://countrymeters.info/ru/Ukraine>
- 9)Capucine Picard, Alain Fischer. Contribution of high-throughput DNA sequencing to the study of primary immunodeficiencies. *J Immunol.* 2014, 44(10):2854-61. doi: 10.1002/eji.201444669.

- 10) Nikita Raje, Sarah Soden, Douglas Swanson. Utility of next generation sequencing in clinical primary immunodeficiencies. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2014,14(10):468. doi: 10.1007/s11882-014-0468-y.
- 11) Клінічна та лабораторна імунологія. Національний підручник / За ред. Кузнецової Л.В., Бабаджана В.Д., Фролова В.М.- Київ: ООО «Полиграф плюс», 2012. – 922 с.
- 12) Афиногенова В.П, Лукачев И.В, Костинов М.П. Иммуноterapia: механизм действия и клиническое применение иммунокорректирующих препаратов. *Лечащий врач.* 2010, 4(3): 9–14.
- 13) Nemirovskaya V.P., Kovtun M.V., Abramtseva N.V. Immunomodulators of bacterial origin registered. *Biologics.* 2014,5 (3): 19–26.
- 14) Chuan-lin Y., Zhengguang Z., Linsheng L., Hualei C., Huiling G., Nana C., Xianguo Yang Effects of lipopolysaccharides of *Bacterium prodigiosum* on tumor growth and immunosuppression in mice. *J.Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2010, 29(10).
- 15) Holst O., Molinaro A. Microbial Glycobiology: Structures Relevance and Applications. *J Elsevier.* 2009, 15(2):48-57.
- 16) Orysa O., Marianna O. Indicators of phagocytosis in women with acne during comprehensive treatment that included immunotherapy and probiotics. *Wiad Lek.* 2018,71(2):144-147.
- 17) Chao Y., Bin W., Pan H., Ying L., Li P. Genomic analysis of the aconidial and high-performance protein producer, industrially relevant *Aspergillus niger* SH2 strain. *J Gene.* 2014, 541(2):107-14. doi: 10.1016/j.gene.2014.03.011.
- 18) Wenger, M. D., Dephillips, P., Bracewell D. G. A microscale yeast cell disruption technique for integrated process development strategies. *Biotechnology Progress.* 2010, 24(3):606-614.
- 19) Egidio I., Antonella T., Carla B., Paola C., Amalia F., Massimo G., Antonio C., Franca P. *Candida albicans* cell wall comprises a branched beta-D-(1-->6)-glucan with beta-D-(1-->3)-side chains. *J Carbohydr Res.* 2010, 343(6). doi: 10.1016/j.carres.2008.02.020.

- 20)Man Z., Xin J. β -Glucan from *Saccharomyces cerevisiae* induces SBD-1 production in ovine ruminal epithelial cells via the Dectin-1-Syk-NF- κ B signaling pathway. 2019, 5(3):304-315. doi: 10.1016/j.cellsig.2018.10.018. Epub 2018 Oct 26.
- 21)Rosy A, Chorostowska-Wynimko J. Bacterial immunostimulants — mechanism of action and clinical application in respiratory diseases. *Pneumonologia i Alergologia Polska*. 2008, 7(6): 353-360.
- 22)Suarez, N., Ferrara, F., Rial, A., Dee. Bacterial Lysates as Immunotherapies for Respiratory Infections: Methods of Preparation. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*.2020,8(2). doi:10.3389/fbioe.2020.00545
- 23)Beini Sun, Shuang Yu, Dongying Zhao, Sihan Guo, Xiaohua Wang, Kai Zhao. Polysaccharides as vaccine adjuvants. *Vaccine*.2018,5(3):87-93. doi: 10.1016/j.vaccine.2018.07.040
- 24)Ільїнська І.Ф, Копосова І.В, Ткаченко І.В. Загальна характеристика імуностимуляторів та їх характеристика. 2017.
- 25)Козлов В.Н. Возможные направления в решении проблемы классификации иммуномодулирующих препаратов. *Аллергология и иммунология*. 2013, 4(2):15-20.
- 26)Шапкіна К.І Розробка технологій препаратів β -глюкану. Наукові праці ОНАХ. 2014.
- 27)Ahme L.M. Application of Microwave Technology in Food Preservation and Processin. Conventional and Advanced Food Proccesing Technologies.2014,3(2):437-470. doi:10.1002/9871118406281.ch18
- 28)Frances M., Carmona E., Vishwajeet P., Richard E. Macrophage Internalization of Fungal β -Glucans Is Not Necessary for Initiation of Related Inflammatory Responses. *Fungal and Parasitic Infections*.2019,5(3).doi: 10.1128/IAI.73.10.6340-6349
- 29)Елінова Н.П, Кашкіної М.А, Аркадьєвої Г.Е Технології отримання водорозчинної форми β -глюкану його протипухлинну активність. 2016, 2(4):25-35.
- 30)Черно Н. К, Станкевич Г.Н. Розробка технології бета-глюкана клітинних

стінок дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*. *Харчова наука і технологія*. 2013, 11(3):15-21.

31)Черно Н.К, Бурдо О.Г, Науменко К.І. Використання зверх частотного випромінювання при виділенні полісахаридів із клітинної стінки дріжджів.

Харчова наука і технології. 2016, 10(2):8-13.

32)Ovsyannikova, L.V., Komarova, E.L. Comparative characteristics of the proteolytic enzymes of plant – papain and bromelain. 2012, 5(4).

33)Черно Н.К, Коваленко О.В, Шапкіна К.І. Отримання водорозчинного β -глюкану. *Біопроцеси*. 2012, 4(21).

34)Бычков А.Л. Изменения клеточной стенки при механической активации растительной и дрожжевой биомассы. *Химия растительного сырья*. 2010, 4(2).

35)Черно Н.К, Озоліна С.О. Франкціонування полісахаридів гливи звичайної *Pleurotus Ostreatus*. *Біопроцес*. 2013, 4(25).

36)Jun L., Jiqing T., Xiuting L., Qiaojuan Y., Junwen M., Zhengqiang J. Curdlan (*Alcaligenes faecalis*) (1 $\rightarrow$ 3)- β -d-Glucan Oligosaccharides Drive M1 Phenotype Polarization in Murine Bone Marrow-Derived Macrophages via Activation of MAPKs and NF- κ B Pathways. 2019, 24(23).

37)Kapteyn J.C., Montijn R.C., Dijkgraaf G.J., Klis F.M. Identification of beta-1,6-glucosylated cell wall proteins in yeast and hyphal forms of *Candida albicans*. *J Cell Biol*. 2010, 65(2):402-407.

38)Ashokkumar S., Myoungjin K., Hyeong Chul J., Keun K. Strain Selection and Optimization of Mixed Culture Conditions for *Lactobacillus pentosus* K1-23 with Antibacterial Activity and *Aureobasidium pullulans* NRRL 58012 Producing Immune-Enhancing β -Glucan. *J Microbiol Biotechnol*. 2018, 28(5):697-706. doi: 10.4014/jmb.1801.01052

39)Edna S., Sandra J., Olga Borges C. β -glucan particles as a new adjuvant for the hepatitis B antigen. *European. Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics Volume*. 2018, 25(2): 33-43.

40)Jia W., Shanshan J., Shanshan W., Yifan C., Ruiwei C. Effect of filamentous fungi fermentation on the extractability and physicochemical properties of β -glucan in oat bran. *J Food Chem.* 2018,3(4).

41)Wenger, M. D., Dephillips, P., Bracewell D. G. A microscale yeast cell disruption technique for integrated process development strategies. *Biotechnology Progress.*2010, 24(3):606-614.

42)Ahme L.M. Application of Microwave Technology in Food Preservation and Processin. *Conventional and Advanced Food Proccesing Technologies.*2014,437-470.

43)Westphal O., Jann K. *Bacterial lipopolysaccharide-extraction with phenol.* *Methods Carbohydr Chem.* 2012, 4(2):83-91.

44)Vaclav V., Luca V., Petr S. β -glucan as a new tool in vaccine development. *J Immunol.* 2020, 91(2):107-116.

45)Albershein P., Nevis D.J., English P. D., Karr A. A. Method for analysis of sugars in plantcell–wall polysaccharides by gas–liquid chromatography. *Carbohydr Res.* 2010,3(4):340-345.

46)Тонева-Давидова Е.Г. Способи отримання β -глюкану клітинної стінки дріжджів. *Біохімічні дослід.* 2017, 25(5):77-90.

47) Marika L. Added β -Glucan as a source of fibre for consumers. *Espoo.* 2016.

48)Catalli, A. Chitin and β -glucan polysaccharides as immunomodulators of airway inflammation and atopic disease. *Drug Discovery.* 2010, 4(3):175-189.

49)Vassileios Varelas, Maria Liouni. An evaluation study of different methods for the production of β -D-glucan from yeast biomass. *Drug Test Anal.* 2016,8(1):46-55.

50) Zeinab Takaloo, Mohsen Nikkhah, Robabeh Nemati, Nezam Jalilian, Reza H Sajedi. Autolysis, plasmolysis and enzymatic hydrolysis of baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*): a comparative study. *World J Microbiol Biotechnol.* 2020,36(5):68-76.

51)Candida Lucas, Ieso Miranda Castro. Biotechnological potential of yeast isolates from cachaça. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2015,42(2):237-46.

52)Yang Liu, Gangliang Huang. Extraction, characterization and antioxidant activities of mannan from yeast cell wall. *Int J Biol Macromol*. 2012, 15(11):952-956.

53)Nicole Dalonso , Gustavo Henrique Goldman, Regina Maria Miranda Gern. β -(1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)-Glucans: medicinal activities, characterization, biosynthesis and new horizons. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2015,99(19):789-906.

54)Anna Bzducha-Wróbel, Stanisław Błazejak, Anna Kawarska, Lidia Stasiak-Róžańska, Iwona Gientka, Ewa Majewska. Evaluation of the efficiency of different disruption methods on yeast cell wall preparation for β -glucan isolation. *Molecules*. 2014,19(12):209-241. doi: 10.3390/molecules191220941.

55)Господарська Х.О, Грищук Л.А. Можливості застосування бета-глюканів в імунореабілітації пацієнтів із запальними захворюваннями верхніх дихальних шляхів. *Медична газета «Здоров'я України 21 сторіччя»*.2021, 4 (497):20-60.

56)Властивості препарату “Бета-іmun”. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://1sa.com.ua/beta-imun-320-mg-kapsuly-30.html#:~:text=Бета-іmun%20застосовувати%20дорослим%20по,повторити%20кілька%20разів%20на%20рік>.

57)Вітаглюкан. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://apteka911.ua/shop/vitaglyukan-sirop-dlya-ukrepleniya-immuniteta-flakon-100-ml-p138253>

58)Полісахариди в косметології. [Електронний ресурс]Режим доступу: <https://www.pleyana.com/archive/betaglucan/>

59)Челябієва В.М, Сиза О.І, Савченко О.М. Технології полісахаридів та їх застосування в харчовій промисловості. 2018. – 123 с.

60)Анализ роста рынка полисахаридов для лекарственных средств, проведенный ИТ-сектором. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://taganrog.press/без-рубрики/201439/анализ-роста-рынка-полисахаридов-для/>

61) Фармацевтична енциклопедія / голова ред. ради та автор передмови В. П. Черних: Нац.фармац. ун-т України. — 2-ге вид., переробл. і доповн. — Київ: МОРІОН, 2010. —1632 с

62) Чуєшов В.И. *Технология лекарств промышленного производства*. — 2-е вид. —Харьков: НФаУ, 2012. — Т.1 — С. 334 - 362

63) Чука М.В Аналіз ринку капсул. *Фармацевтичний огляд*.2014,2(3).

64) Соціально-фармацевтичні аспекти застосування ліків. [Електронний ресурс]Режим доступу: <https://health-ua.com/article/63526-tabletka-chinktcy-sho-takoli-krashe>

65) Puritan's Pride Beta Glucans 200 mg-60 Caplets. [Електронний ресурс]Режим доступу: <https://stylus.ua/puritans-pride-beta-glucans-200-mg-60-caplets-p442691c12823.html>

66)Swanson Ultra- BetaRight Beta Glucan. [Електронний ресурс]Режим доступу:<https://www.swansonvitamins.com/swanson-ultra-betaright-beta-glucans-250-mg-60-caps>

67)Solgar Beta Glucans, 60 таблеток. [Електронний ресурс]Режим доступу: <https://ru.iherb.com/pr/Solgar-Beta-Glucans-60-Tablets/24391>

68)Jarrow Formulas, Beta Glucan Immune Support 60 Capsules. [Електронний ресурс]Режим доступу: https://bio.org.ua/item/4023-jarrow_formulas_beta_glucan_immune_support_60_capsules.html?lng=ru

69)Now Foods, Beta-1,3/1,6-D-Glucan. [Електронний ресурс]Режим доступу: <https://goodhealth.kiev.ua/beta-glucan/>

70)Казахстан Ulife "Beta Glucans". [Електронний ресурс]Режим доступу: <http://medoptic.kz/biologicheski-aktivnyie-dobavki/beta-glucan-beta-glyukan-kapsulyi-500mg/>

71)ООО "Новалик-Фарм" "Бета-імун". [Електронний ресурс]Режим доступу: <https://compendium.com.ua/info/251747/beta-immun/>

72) Австрія SANWEZZA "Beta Glucans". [Електронний ресурс]Режим доступу: <https://ru.iherb.com/c/beta-glucan>

73)Wellmune "Beta Glucans". [Електронний ресурс]Режим доступу:
<https://prom.ua/Beta-glyukan-500.html>

74) Abbott "ОРБИ Актив". [Електронний ресурс] Режим доступу:
https://catalysis.com.ua/viusid/?gclid=CjwKCAjw7J6EBhBDEiwA5UUM2ktwqAcOU8qLfyVVxwA43GnxP3fRBArBfvjeyEAVKDVLDH5H3PXEB0C8GoQAvD_BwE

75)Вибір форми лікарського засобу. [Електронний ресурс] Режим доступу:
<http://www.eurasiancommission.org/ru/act/tehnreg/deptexreg/LSMI/Documents/Руководства%20по%20определению%20возможности%20использования%20лекарственной%20формы%20в%20педиатрической%20практике.pdf>

76) Кузнецова Л.В., Бабаджан В.Д., Харченко Н.В. Імунологія.2018.

77)Ахваткина Н.Б, А.А. Махалова А.А. Особенности иммунитета детского возраста.2012, 6 (16).

78)Субстанція бета-глюкану. [Електронний ресурс]Режим доступу:
https://russian.alibaba.com/Popular/CN_beta-glucan-Trade.html

79)Bimedcal "Пеноксал". [Електронний ресурс] Режим доступу:
<http://www.biotech-inter.com/partnership/zaregistrirovannye-preparaty>

80)Молекулярна маса азоту. [Електронний ресурс]Режим доступу:
<http://ru.solverbook.com/spravochnik/ximiya/molyarnayamassa/molyarnaya-massa-azota/#:~:text=е.-,м.,строения%20атома%20представлена%20на%20рис>

81)Ферментер біореактор "BIOSTAT" [Електронний ресурс]Режим доступу: http://sartorius.com.ua/fermenter_bioreaktor_biostat_c-dcu.html

82)Флотація.[Електронний ресурс]Режим доступу:
<https://science.lpnu.ua/uk/ctas/vsi-vypusky/volume-2-number-1/flotaciya-yak-stadiya-kavitaciyno-flotaciynoyi-tehnologiyi>

83)Фільтрація. [Електронний ресурс]Режим доступу:
<http://forum.beersfan.ru/threads/Фильтрация-от-дрожжей-Осаждение-дрожжей-осветление.1104/>

84)Ультрафільтрація. [Електронний ресурс]Режим доступу:
<https://www.membranium.com/ru/about-us/articles/ultrafiltraciya-i-obratnyj-osmos/>

- 85)Типи центрифуг. [Електронний ресурс]Режим доступу: <https://labcentrifuge.ru/information/articles/405/>
- 86)Типи центрифуг. [Електронний ресурс]Режим доступу: <http://medical-enc.com.ua/centrifugi.htm>
- 87)Сепаратор Альфа лаваль брукс. [Електронний ресурс]Режим доступу:https://opeks.energy/teploobmenniki/?gclid=Cj0KCQiA5OuNBhCRARIsACgaiqVaokf0spitqFR0OLiY0BS4i8W7EqsSdb-qznLnNBayxgcBmC9F-lMaAqFwEALw_wcB
- 88)Механічні дезінтегратори. [Електронний ресурс]Режим доступу: <https://www.hielscher.com/uk/ultrasonic-disintegrators.htm>
- 89)Хімічна дезінтеграція. [Електронний ресурс]Режим доступу: <https://www.medsprava.com.ua/article/497-deznfektsya-vidi-ta-metodi-provedennya>
- 90)Розпилювальна сушарка. [Електронний ресурс]Режим доступу: <http://ua.fishflour.com/65-sushilna-ustanovka-raspyluyucha.html>
- 91)Вакуум сушарка. [Електронний ресурс]Режим доступу: <https://vakum.com.ua/vakuumnaya-sushka-vidy-vakuumnoj-sushki-oborudovanie-dlya-vakuumnoj-sushki-v-ukraine/>
- 92)Стрічкова сушарка. [Електронний ресурс]Режим доступу: <https://agrotimes.ua/article/strichkova-susharka/>
- 93)Сидоров Ю.І Розпилювальні сушарка. *Біотехнології*.2012,2(4).
- 94)Молоткові дробарки. Електронний ресурс]Режим доступу: https://bioekoprom.com.ua/ua/katalog/izmelchiteli/drobilki_motlotkovyie/drobilka_molotkovaya_--em-60--/
- 95)Дробарка з простим хитанням щокі. [Електронний ресурс]Режим доступу: <https://ela.kpi.ua/handle/123456789/28386?mode=full>
- 96) Види дробилок (классификация дробильного оборудования) [Електронний ресурс]Режим доступу: <https://www.tmzdo.ru/articles/vidy-drobilok-klassifikatsiya-drobilnogo-oborudovaniya.html>
- 97)Фасувально-пакувальна машина. [Електронний ресурс]Режим доступу: <https://flagma.ua/products/q=фасовочно+укупорочная+машина/>

- 98)Маркувальна машина. [Електронний ресурс]Режим доступу:
<https://prozorro.gov.ua/tender/UA-2020-02-13-001784-c>
- 99)Про затвердження методичних рекомендацій щодо виконання санітарно-гігієнічних вимог та проведення мікробіологічного контролю у виробництві нестерильних лікарських засобів.[Електронний ресурс]Режим доступу: LIGA:ZAKON
- 100)Бланідас Актив. [Електронний ресурс] Режим доступу:
<https://lysoform.shop/product/blanidas-aktiv-1l/>
- 101)Санікон. [Електронний ресурс] Режим доступу:
<https://uk.interdez.com.ua/product/dezinficiruyuschee-sredstvo-sanikon-interdez-kiev>
- 102)Сараклін. [Електронний ресурс] Режим доступу:
<https://moz.gov.ua/uploads/ckeditor/Відкриті%20дані/2021/04/20/2021-реєстр%20деззасобів%201-155.pdf>
- 103)Біо лонг. [Електронний ресурс] Режим доступу:
<https://biolong.pro/disinfection-for-hands/sa-cap-5/>
- 104)Стерилиум. [Електронний ресурс] Режим доступу:
<https://tabletki.ua/Стерилиум/>
- 105) Біо лонг. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://biolong.pro>
- 106)Септікс. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.t-klio.dp.ua/uk/produktsiia-septix/septiks-dlia-vyhribnykh-iam/biopreparat-saneks-50-sredstvo-dlya-ochistki-vyigrebnyih-yam-to-buy>
- 107)Антисептик АХД-200. [Електронний ресурс] Режим доступу:
https://hlorka.in.ua/site_search?search_term=АХД&utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=ahd_which&network=g&placement=&adposition=&keyword=антисептик%20ахд&yagla=&gclid=EAiaIQobChMIr-uw2qzp9AIVFWIYCh0rQQuHEAAYAIAAEgJZBvD_BwE
- 108) Фасовка таблеток и порошков.[Електронний ресурс] Режим доступу:
<https://biolight.com.ua/fasovka-gotovoj-produktsii/>
- 109)Мікробіологічний контроль. [Електронний ресурс]Режим доступу:
http://sartorius-sd.com.ua/files/brochura_microbiological_control_rus.pdf

110) Фото *Saccharomyces cerevisiae*. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://ru.dreamstime.com/дрожжи-saccharomyces-cerevisiae-image126324703>

111) Пешкова В.М, 2, Саяпіна О.А, Солдаткін О.О, Дзядевич С.В. Традиційні та біосенсорні методи традиційні та біосенсорні методи визначення моно та дисахаридів. Біо лонг технологія. 2010, 3(3).

112) Метод формального титрування 2018. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://docs.cntd.ru/document/gost-25179-90>

113) Аналіз вологості. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://prom.ua/Analizator-vlazhnosti-ohaus.html>

114) Мартинів Ю.В, Кісера Я.В Імуностимулювальна дія бета-глюкану за медикаментозної імуносупресії мурчаків. *The Animal Biology*. 2020, 22(1).