

**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)
Грегірчак Н.М.
(підпис) (прізвище та ініціали)

« ___ » _____ 2021 р.

«До захисту допущено»
Завідувач кафедри
Пирог Т.П.
(підпис) (прізвище та ініціали)

« ___ » _____ 2021 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: Перспективи біотехнологічного одержання амінокислот для використання у фармацевтиці

Виконав: здобувач 2 курсу, групи 02

Світлична Вікторія Олександрівна
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник Красінько Вікторія Олегівна
(прізвище, ім'я та по батькові повністю) (підпис)

Консультанти _____
(прізвище та ініціали) (підпис)

(прізвище та ініціали) (підпис)

(прізвище та ініціали) (підпис)

Рецензент Котинський А.В.
(прізвище та ініціали) (підпис)

Засвідчую, що в цій кваліфікаційній роботі немає запозичень із праць інших авторів без відповідних посилань.

Здобувач _____
(підпис)

Київ – 2021 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

Пирог Т.П.

“ 28 ” жовтня 2020 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

Світличної Вікторії Олександрівни
(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Перспективи біотехнологічного одержання амінокислот для використання у фармацевтиці

керівник роботи Красінько Вікторія Олегівна, к.т.н., доцент,
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від “26”жовтня2020 року №868-кс

2. Строк подання здобувачем роботи _____

3. Вихідні дані до роботи джерела наукової літератури, штам *Escherichia coli* ВТУ2.13, ферментер об'ємом 4 м³

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити)Вступ; Розділ 1. Літературний огляд; Розділ 2. Техніко-економічне обґрунтування; Розділ 3. Обґрунтування вибору технологічної схеми біосинтезу субстанції L-тироzinу та технологічної схеми виробництва ЛЗ; Розділ 4. Опис технологічного процесу виробничого біосинтезу та отримання субстанції тирозину; Розділ 5. Опис технологічного процесу виробництва ЛЗ; Список використаної літератури

5. Перелік графічного матеріалу

Апаратурна схема - 3 креслення формату А1; технологічна схема – 2 креслення формату А1 та 1 креслення формату А2

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 28 жовтня 2020 р.

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1.	Розділ 1. Літературний огляд	29.10.2020 – 15.11.2020	
2.	Розділ 2. Техніко-економічне обґрунтування	16.11.2020 – 29.11.2020	
3.	Розділ 3. Обґрунтування вибору технологічної схеми біосинтезу субстанції L-тирозину та технологічної схеми виробництва ЛЗ	30.11.2020 – 13.12.2020	
4.	Розділ 4. Опис технологічного процесу виробничого біосинтезу та отримання субстанції тирозину	14.12.2020 – 27.12.2020	
5.	Розділ 5. Опис технологічного процесу виробництва ЛЗ	28.12.2020 – 10.01.2021	
6.	Оформлення технологічної схеми	11.01.2021 – 17.01.2021	
7.	Оформлення апаратурної схеми	18.01.2021 – 24.01.2021	

Здобувач Світлична В.О.
(підпис) (прізвище та ініціали)

Керівник роботи Красінько В.О.
(підпис) (прізвище та ініціали)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна магістерська робота присвячена аналізу наукової літератури щодо особливостей створення штамів-надсинтетиків L-тирозину, біотехнологічного одержання даної амінокислоти та практичного використання L-тирозину у медицині, сільському господарстві та для біосинтезу інших цінних сполук, а також розробленню технологічної та апаратурної схем виробництва тирозину культивуванням штамму *Escherichia coli* ВТУ2.13, що синтезує 43,14 г/л тирозину за 80 год на середовищі з глюкозою у якості джерела вуглецю, а також розробленню технології виробництва тирозину в капсулах. Розрахована потужність виробництва тирозину - 4145,9 кг/рік. Тирозин використовується для виробництва лікарського препарату в капсулах для лікування захворювань щитоподібної залози, депресивних розладів та хвороби Паркінсона.

Технологічний процес біосинтезу тирозину включає допоміжні роботи (приготування та стерилізацію допоміжних розчинів; приготування та стерилізацію поживних середовищ) та технологічний процес (вирощування посівного матеріалу в три етапи: в колбах на качалці, інокуляторах об'ємом 40 і 0,4 м³, виробничий біосинтезу ферментері об'ємом 4 м³, відділення біомаси центрифугуванням, концентрування, хроматографічне очищення тирозину, кристалізація, сушіння та подрібнення).

Особливості процесу культивування: температура 37⁰С, рН 6,95, швидкість перемішування - 500-1000 об/хв., швидкість подачі аераційного повітря - 2 л/хв., рівень розчинного кисню 40%, тривалість – 80 год. Культивування здійснюють з підживленням. Через 19 годин культивування вносять індуктор ізопропіл-D-тіогалактопіранозид (ІПТГ).

Технологічна схема виробництва тирозину 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, наповнення капсул) та стадії пакування,

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

Робота викладена на 222 сторінках друкованого тексту, містить 25 таблиць, 15 рисунків і складається зі вступу, 5 розділів, списку використаної літератури (144 джерел) та графічної частини (5 креслень формату А1, 1 креслення формату А2).

Ключові слова: *Escherichia coli* ВТУ2.13, L-тирозин, амінокислота, капсули, лікарський засіб, біосинтез.

ЗМІСТ

ВСТУП	6
РОЗДІЛ 1.ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД	7
1.1. Перспективність застосування L-тирозину як передумова розроблення біотехнологій його одержання	7
1.1.1. Перспективи застосування L-тирозину в медицині.....	7
1.1.2. Використання тирозину у сільському господарстві	19
1.1.3. Використання тирозину для біотехнологічного одержання цінних сполук	22
1.2. Біотехнологічні особливості одержання L-тирозину	27
1.2.1. Методи одержання надсинтетиків тирозину	27
1.2.2. Характеристика способів ідентифікації та очищення тирозину	37
РОЗДІЛ 2.ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ	41
2.1.Потреба у цільовому продукті	41
2.2.Розрахунок потужності виробництва	43
2.3.Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера	43
2.4.Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу	44
РОЗДІЛ 3. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ СУБСТАНЦІЇ L-ТИРОЗИНУ ТА ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА ЛЗ	47
3.1.Обґрунтування вибору біологічного агента, поживного середовища для його культивування.....	47
3.2.Обґрунтування вибору способу культивування та типу ферментера.....	57
3.3.Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища	59
3.3.1 Підготовка і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту у колбах на качалці.....	60
3.3.2. Підготовка і стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі.....	61
3.3.3. Підготовка і стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті.....	62
3.3.4 Приготування та стерилізація середовища для виробничого біосинтезу	63

3.3.5. Особливості підготовки допоміжних розчинів	64
3.4. Обґрунтування стадій виділення і очищення L-тирозину	65
3.4.1. Обґрунтування способу відокремлення біомаси	66
3.4.2. Обґрунтування способу виділення цільового продукту з супернатанту.....	72
3.4.3. Обґрунтування способу очищення цільового продукту	76
3.4.4. Обґрунтування способу сушіння тирозину	84
3.4.5. Обґрунтування способу подрібнення тирозину	88
3.5. Обґрунтування вибору технологічної схеми одержання ЛЗ	92
3.5.1. Вибір форми випуску лікарського засобу.....	92
3.5.2. Обґрунтування вибору первинної упаковки та підготовки первинної упаковки	94
3.5.3. Опис лікарського засобу згідно АНД.....	96
3.5.4. Розрахунок річної потужності та кількості серій на рік.....	125
3.5.5. Обґрунтування вибору класів чистоти виробничих приміщень	125
3.5.5.1. Підготовка персоналу та одягу	117
3.5.5.2. Підготовка дезінфікуючих засобів	120
3.5.5.3. Підготовка вентиляційного повітря	123
3.5.6. Обґрунтування вибору підготовки води	126
3.5.7. Вибір технологічних стадій та операцій, обладнання	129
РОЗДІЛ 4. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ ТА ОТРИМАННЯ СУБСТАНЦІЇ ТИРОЗИНУ	133
4.1. Специфікація обладнання ділянки виробничого біосинтезу	133
4.2. Опис технологічної схеми ділянки виробничого біосинтезу	140
4.3. Контроль ділянки виробничого біосинтезу	159
РОЗДІЛ 5. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ ВИРОБНИЦТВА ЛЗ	174
5.1. Матеріальний баланс на серію	174
5.2. Специфікація обладнання ділянки виробництва ЛЗ.....	176
5.3. Опис технологічної схеми ділянки виробництва ЛЗ	181
5.4. Контроль ділянки виробництва ЛЗ.....	195
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	207

ВСТУП

L-тирозин – ароматична амінокислота, яка широко застосовується в харчовій, сільськогосподарській та фармацевтичній промисловості [1]. Цю амінокислоту використовують як попередник фармацевтичних препаратів та інших цінних хімічних речовин, таких як флавоноїди та алкалоїди [2]. Тирозин часто використовується як добавка до їжі та кормів для тварин [3].

Тирозин може ефективно використовуватися для лікування різних захворювань. Дана амінокислота пригнічує апетит, сприяє зменшенню відкладення жирів, сприяє виробленню мелатоніну, який є важливим у нормалізації порушень сну [4]. Також тирозин сприяє підвищенню настрою, так як є попередником нейромедіаторів норадреналіну і дофаміну [5]. Тирозин бере участь у виробництві гормонів щитовидної залози, тобто нормалізує її роботу, покращує функції надниркових, щитовидної залози і гіпофізу [6]. При нестачі тирозину можливий розвиток паркінсонізму – захворювання, пов'язаного з порушенням обміну катехоламінів [7].

Традиційно L-тирозин виготовляють методами екстракції з білоквмісної сировини (відходи харчової та молочної промисловості), однак зростаючий попит на L-тирозин недостатньо задовольняється цими методами внаслідок низькопродуктивного виробництва.

В даний час L-тирозин ефективно виробляється шляхом мікробного синтезу. Протягом кількох десятиліть було зроблено багато спроб збільшити синтез L-тирозину шляхом конструювання генетично модифікованих продуцентів L-тирозину [2].

В основі конструювання мікробних штамів, які здатні до надсинтезу L-тирозину, знаходиться подолання механізмів контролю на шляху біосинтезу тирозину. Найпродуктивніші штами отримують шляхом введення стійких до інгібування за типом зворотнього зв'язку генів ключових ферментів біосинтетичного шляху. Крім цього, ефективним є створення штамів, що експресують тирозин фенол-ліазу, яка трансформує фенол у тирозин.

Отже, біосинтез тирозину за допомогою генно-інженерного штаму *E. coli* ВТУ2.13 з метою лікування та профілактики захворювань щитоподібної залози, депресивних розладів та хвороби Паркінсона є досить *актуальним*.

Новизною роботи є аналіз розрізнених літературних даних стосовно особливостей створення штамів мікроорганізмів, що синтезують тирозин та їхнього культивування і підбір на основі даних опрацьованої науково-технічної літератури найперспективнішого штаму *E. coli* ВТУ2.13, який сконструювали, використовуючи стійкі до інгібування за типом зворотного зв'язку гени ДАГФ-синтази та хоризматмутази, а також видаленням гену *tytR*, який пригнічує синтез генів на шляху біосинтезу тирозину, здатен синтезувати L-тирозин у достатньо високій концентрації (43,14 г/л), порівняно з іншими продуцентами. На основі одержаної субстанції тирозину розроблено технологічну схему одержання лікарського засобу L-тирозину в капсулах.

РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

1.1. Перспективність застосування L-тирозину як передумова розроблення біотехнологій його одержання

1.1.1. Перспективи застосування L-тирозину в медицині

Тирозин – це ароматична амінокислота, міститься в великій кількості у білках, що входять до складу таких харчових продуктів, як соя, курятина, індичка, риба, арахіс, мигдаль, банани, молоко, сир, йогурт, насіння гарбуза і кунжут [8].

Обмін ароматичних амінокислот – фенілаланіну та тирозину – в організмі людини протікає в таких напрямках: утворення пігментів (меланіни – забарвлюють волосся, шкіру, сітківку ока); декарбоксілування з утворенням біогенних амінів (наприклад, тирамін); утворення гормонів щитовидної залози (тироксин), наднирників (адреналін).

Тирозин в організмі перетворюється в ДОФА та дофамін. При нестачі тирозину можливий розвиток паркінсонізму – захворювання, пов'язаного з порушенням обміну катехоламінів. Через порушення обміну ДОФА та дофаміну, виникає гальмування утворення дофаміну із ДОФА в мозку. Пошкодження виникає на рівні чорної субстанції мозку [9].

Тирозин може ефективно використовуватися для лікування різних захворювань.

Наприклад, встановлено, що L-тирозин та L-дигідроксифенілаланін (L-DOPA), крім того, що вони служать субстратами та проміжними речовинами меланогенезу, також є біорегуляторними агентами, що діють не тільки як індуктори та регулятори меланогенезу, але також як регулятори інших клітинних функцій. L-тирозин є модифікатором меланогенезу та меланоцитарного фенотипу, характер і величина ефектів залежать від генетичного фону організму і факторів навколишнього середовища. Існує чимало доказів існування L-тирозинових та L-DOPA рецепторів, але їх точна природа ще не визначена [10].

					НУХТ БТЕК 02.02.12 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Світлична В.О.				РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.	Красінько В.О.						8	33
Консультант						Кафедра БТМ 8		
Н. Контр.								
Затверд.	Пирог Т.П.							

Також вченими на чолі з Hung[11] оцінено здатність L-тирозину викликати шкірну аналгезію. Тирозин транспортується в нервові закінчення для синтезу катехоламінів, такі як епінефрин та норадреналін, які надають місцевий анестезуючий ефект. Крім цього, проведено порівняння між L-тирозином та місцевим анестетиком лідокаїном. Дослідження показали, що і L-тирозин, і лідокаїн викликають дозозалежну шкірну аналгезію. Аналгезію настає через 19 та 22 хвилини після прийняття тирозину та лідокаїну відповідно, та триває 109 та 59 хв після прийняття тирозину та лідокаїну відповідно. Отже, тривалість шкірної аналгезії, викликаної L-тирозином, є довшою, ніж викликаної лідокаїном. L-тирозин має нижчу силу дії, але значно більшу тривалість шкірної аналгезії, ніж лідокаїн. При додаванні L-тирозину до препаратів лідокаїну виявляється більша тривалість шкірної аналгезії порівняно з застосуванням лідокаїну окремо (60 та 50 хв відповідно).

Визначено вплив тирозину на витривалість при здійсненні фізичних вправ та на терморегуляцію [12, 13].

Вчені на чолі з Watson [12] встановили, що при застосуванні тирозину при виконанні тривалих фізичних вправ у теплому середовищі, встановлено, що співвідношення тирозину та фенілаланіну до інших амінокислот в плазмі крові збільшується в 2,5 рази після прийому тирозину, і залишається підвищеним протягом виконання фізичних вправ. Проте прийом тирозину не має ефекту на фізичну активність (час виснаження при прийомі плацебо - $61,4 \pm 13,7$ хв, тирозину - $60,2 \pm 15,4$ хв), концентрацію глюкози у крові (4.1 ± 0.2 ммоль/л при прийомі плацебо та 4.2 ± 0.3 ммоль/л при прийомі тирозину), на частоту серцевих скорочень (175 ± 11 ударів/хв. при прийомі плацебо, 177 ± 7 ударів/хв. при прийомі тирозину), температуру шкіри, теплові відчуття. Отже, вживання тирозину не впливає на витривалість під час здійснення фізичних вправ у теплих умовах. Тому доступність тирозину в плазмі крові, очевидно, не є ключовим фактором у процесах втоми. Отже, застосування тирозину для посилення фізичних вправ не є доцільним, тому що зв'язок між фізичними вправами та функцією катехоламінів опосередковується багатьма іншими факторами.

Tumilty зі співавт. підтвердили [13] ці результати. Прийом тирозину не вплинув на час фізичних вправ ($34,8 \pm 6,5$ хв у порівнянні з плацебо $35,2 \pm 8,3$ хв). Концентрація глюкози становить 5.3 ± 0.9 ммоль/л у обох групах. Концентрація лактату - 3.2 ммоль/л при прийомі тирозину та 4.1 ммоль/л при прийомі плацебо. На споживання рідини під час фізичних вправ також тирозин не впливав (311.1 мл при прийомі тирозину та 363.0 мл при плацебо). Температура шкіри при прийомі тирозину становила $34.8 \pm 0.8^\circ\text{C}$, а при плацебо - $35.0 \pm 1.3^\circ\text{C}$.

У холодних умовах збільшення активності симпатичного нерва викликає звуження шкірних судин, щоб мінімізувати втрати тепла. У літніх людей ця рефлекторна реакція на звуження судин порушується, тим самим збільшуючи їх сприйнятливність до надмірних втрат тепла та переохолодження. Оскільки L-тирозин необхідний для вироблення катехоламіну, та посилює рефлекс звуження судин у віковій шкірі, було припущено, що пероральний прийом L-тирозину зменшить зниження температури тіла у холодних умовах у літніх людей.

У роботах [14,15] вивчено вплив L-тирозину на охолодження тіла та активацію метаборефлексу м'язів.

Lang та співавт. встановлено [14], що пероральний прийом тирозину посилює реакцію судинозвуження при впливі холоду у віковій шкірі (зменшення судинної провідності з $0,21$ до $0,15$ потік/мм рт. ст.). Це говорить про те, що додавання тирозину може покращити функцію терморегуляції. Однак прийом L-тирозину практично не впливає на показники артеріального тиску (100 та 102 мм рт. ст. при прийомі плацебо та тирозину відповідно) та частоту серцевих скорочень при фізичних навантаженнях (62 та 63 ударів/хв. при прийомі плацебо та тирозину відповідно).

У роботі [15] встановлено, що пероральний прийом тирозину активував реакцію звуження судин при охолодженні (плацебо = $14,4 \pm 2,0$, тирозин = $32,7 \pm 1,7\%$). Крім того, тирозин покращує підтримку температури протягом охолодження (плацебо = $-0,29 \pm 0,07$, тирозин = $-0,07 \pm 0,07^\circ\text{C}$).

Багато наукових досліджень присвячені вивченню впливу тирозину на пам'ять та когнітивні функції.

Тирозин є попередником нейромодуючих катехоламінів: дофаміну та норадреналіну. Катехоламіни, включаючи дофамін, мають важливе значення для робочої пам'яті. Введення тирозину може попередити погіршення пам'яті в стресових умовах, а також посилити пізнання та пам'ять.

Вченими на чолі з VandeRest [16] встановлено, що при введенні тирозину літнім людям, спостерігається дозозалежне підвищення концентрації тирозину в плазмі крові, а плазмova відповідь є вищою, ніж у молодих дорослих при введенні тієї самої дози тирозину. Продуктивність робочої пам'яті, що залежить від навантаження, знижується при введенні більш високих доз тирозину, особливо літнім людям. Отже, ці результати показують, що підвищення рівня тирозину у плазмі крові, не посилює пам'ять, а навпаки, знижує когнітивне функціонування у літніх людей.

Проте у інших роботах вчених [17, 18, 19, 20], які присвячені вивченню впливу тирозину на когнітивні здібності, показано, що L-тирозин, попередник дофаміну, посилює аспекти когнітивного контролю в ситуаціях з високими когнітивними потребами. Визначено, що особи, у яких рівень дофаміну нижчий, отримують більш корисні ефекти від вживання тирозину, ніж особи, що мають більш високий рівень дофаміну. Ці дані підкріплюють думку про те, що генетична схильність модулює дію тирозину в ролі посилювача пам'яті та пізнавальних здібностей. А також визначено, що тирозин не впливає на дивергентне мислення ("мозковий штурм"), але сприяє конвергентному ("глибокому") мисленню.

Colzato зі співавторами [18] встановили, що при споживанні тирозину при виконанні альтернативних завдань для оцінки дивергентного мислення старанність збільшувалася з 0,8 до 1,1, проте плинність, гнучкість та оригінальність зменшувалися з 15,8 до 15,4 з 11 до 10,8 та з 9,1 до 8,7 відповідно. Проте при виконанні завдань для оцінки конвергентного мислення, визначено, що прийом тирозину покращує його з 4,7 до 5,8. Отже, споживання тирозину сприяє конвергентному мисленню, таким чином позитивно впливає на творчий процес.

Пізніше ними було встановлено [17], що прийом тирозину сприяє підвищенню рівню дофаміну у мозку, тим самим покращуючи когнітивні здібності.

Також вченими з Нідерландів [19] показано, що тирозин стимулює когнітивну гнучкість, тобто тирозин сприяє зменшенню витрат на перемикання з одного завдання на інше. При повторенні завдань час реакції зменшується з 664 до 657 мс, а кількість помилок – з 3,5 до 3,1%, при чергуванні завдань час реакції зменшується з 858 до 822 мс, а кількість помилок – з 9,1 до 8,2 %, а при переключенні з одного завдання на інше - час реакції зменшується з 194 до 165 мс, а кількість помилок – з 5,6 до 5,1 %.

Отже, потенціал використання тирозину для лікування клінічних порушень здається обмеженим, і його переваги, ймовірно, визначаються наявністю та ступенем порушеної функції нейромедіаторів та їх синтезом. На противагу цьому, тирозин ефективно підвищує когнітивні показники, особливо у короткотермінових стресових та/або когнітивно складних ситуаціях.

Наступні роботи направлені на дослідження ефективності тирозину у лікуванні немалінової міопатії. Немалінова міопатія (НМ) - вроджене захворювання, при якому ослаблені скелетні м'язи. Вона виявляється наявністю стрижнеподібних структур, відомих як немалінові тіла або стрижні, при біопсії м'язів. Симптоми даного захворювання у новонароджених проявляються у труднощах при ковтанні і сльозовиділенні, а також схильності до ротових та глоткових виділень.

Messineo зі співавт. [21] було оцінено здатність L-тироzinу покращувати функцію скелетних м'язів при НМ, що викликана домінантними мутаціями α -актину скелетних м'язів. Однак в результаті прийому тирозину показники цілісності скелетних м'язів не були покращені. Крім того, не спостерігалось ніякого корисного впливу на механічні властивості, енергетичний обмін та атрофію скелетних м'язів.

Однак у іншій роботі турецькими дослідниками [22] встановлено, що при лікуванні L-тирозином новонародженого з важкою дихальною недостатністю та генералізованою м'язовою слабкістю, якому діагностували немалінову міопатію, відбулося помітне покращення спонтанних рухів, зменшення сialореї та відновлення сили м'язів. L-тирозин також може запобігти глотковим виділенням і слиновиділенню. Отже, L-тирозин покращує м'язові функції і збільшує

опосередковану катехоламіном симпатичну активність у слинних залозах у пацієнтів з НМ.

Також встановлена ефективність застосування тирозину у терапії різних захворювань – фенілкетонурії, нервовій анорексії, хронічному стресі, післяпологової депресії, ожирінні, гострому пошкодженні нирок, захворюваннях щитоподібної залози.

Фенілкетонурія - це спадкове захворювання, основне лікування якого - дієтичне обмеження амінокислоти фенілаланіну. Дефіцит амінокислоти тирозину вважається причиною деяких нейропсихологічних проблем при фенілкетонурії. Вченими з Великобританії на чолі з Webster [23] визначено, що при прийомі тирозину, поряд із дієтою з обмеженням фенілаланіну, встановлено, що прийом тирозину не впливає на зменшення концентрації фенілаланіну в крові, а також на інші показники (набір ваги, харчування, інтелект, нейропсихологічні показники).

Нервова анорексія характеризується самоіндукованим недоїданням, що впливає на стан тіла, настрої, пізнання. Досліджено, що пероральний прийом тирозину (100 мг/кг/добу) збільшує споживання їжі, покращує когнітивні функції та підвищує рівень катехоламінів у мозку. А також тирозин має позитивний вплив на пам'ять, покращує депресивний настрій. Жодних побічних ефектів при застосуванні тирозину не відмічено. Отже, тирозин може покращити когнітивні функції та психологічні характеристики при нервовій анорексії [24].

Науковцями на чолі з Wang[25] вивчено вплив тирозину на хронічний стрес. Мишей піддавали дії різних стресорів. У мишей з хронічним стресом спонтанна опорно-рухова активність значно знизилася, рівень загального тиреотропіну та загального трийодтироніну в сироватці крові значно знизився, а вміст дофаміну та норадреналіну в гіпокампі та гіпоталамусі значно знизився. Було встановлено, що прийом L-тирозину стримував усі ці зміни, при чому опорно-рухова активність через 2 тижні після прийому тирозину збільшилася та становила 2,71 м, порівняно з контрольною групою (1,86 м), а через 4 тижні становила 1,81 та 1,36 м відповідно. Рівень тиреотропіну підвищився при прийомі тирозину з 0,55 до 0,64 нг/мл, а трийодтироніну – з 29,91 до 35,62 нг/мл. Рівень дофаміну та норадреналіну в

гіпокампі та гіпоталамусі збільшувався при споживанні тирозину приблизно на 0,5 нг/мл. Ці дані свідчать про те, що нейроендокринна мережа відіграє важливу роль при хронічному стресі, а також те, що застосування L-тирозину при даному захворюванні має терапевтичну дію.

Також L-тирозин може використовуватися як антидепресант. Метою дослідження Alabsi та співавт. [26] було вивчення можливого антидепресантного ефекту L-тирозину, у вигляді форми з наночастинками. Щури з гострим та хронічним стресом отримували наночастинки з L-тирозином (5 або 10 мг/кг), розчин L-тирозину (10 мг/кг), флуоксетин (10 мг/кг) або плацебо щодня протягом 21 дня. Результати показали, що загальна рухова активність не змінилася на 2 день експерименту, але було зафіксовано її зниження на 8 день у всіх групах. Однак на 15 та 22 дні відбулося збільшення загальної активності у групах, що приймали наночастинки з L-тирозином 10 мг/кг і флуоксетин 10 мг/кг. Це збільшення відновило базальні рівні опорно-рухової активності. Аналогічні результати спостерігалися і щодо пройденої відстані протягом 30 хв та щодо споживання сахарози. Позитивні результати після лікування наночастинками з L-тирозином у концентрації 10 мг/кг, ймовірно, пояснюються відновленням базальних рівнів мозкового норадреналіну.

Післяпологова депресія (ППД) є найпоширенішим ускладненням при дітонародженні зі ступенем поширеності 13%, і немає ефективного підходу до її профілактики. Канадськими вченими [27] вивчено ефективність застосування тирозину для запобігання ППД. При застосуванні годуючими жінками тирозину, загальний рівень тирозину у грудному молоці не підвищується, а у материнській плазмі зростає: при прийомі 2 г тирозину – з 12 до 25 мкг/мл, при прийомі 5 г – з 12 до 35 мкг/мл, а при прийомі 10 г тирозину – з 12 до 55 мкг/мл. У грудному молоці 98% тирозину знаходиться у вигляді білків або пептидів, а 2% - у вільному стані. Рівень вільного тирозину при застосуванні даної амінокислоти в грудному молоці підвищується до 0,5, 0,8 та 1,7 мг/100 мл молока при прийомі 2, 5 та 10 г тирозину відповідно. Отже, незначний вплив прийому тирозину на його концентрацію в грудному молоці дає підстави для подальших досліджень застосування тирозину в

рамках стратегії профілактики ППД.

Люди з хворобою Паркінсона можуть страждати від ортостатичної гіпотензії та від зниженого рівня норадреналіну, який гальмує симпатичну нервову систему. Леводопа, що використовується при лікуванні хвороби Паркінсона, ще більше знижує рівень норадреналіну, що призводить до більшого зниження артеріального тиску та підвищення ортостатичної гіпотензії. Тирозин - амінокислота, яка є головним попередником норадреналіну. Дослідження американських вчених [28] було направлене на визначення ефектів L-тироzinу на артеріальний тиск, рівня норадреналіну при хворобі Паркінсона. Було призначено 1000 мг L-тироzinу протягом 7 днів. L-тирозин в дозі 1 000 мг протягом 7 днів є безпечним і добре переноситься. Встановлено, що прийом тирозину впливав на підвищення тирозину у плазмі крові (59,2 та 73,1 мкмоль/л у контрольній та дослідній групі відповідно), та підвищення рівня норадреналіну (на 60 та на 103,7 пг/мл у контрольній та дослідній групі відповідно). Проте підвищення тирозину в плазмі крові не впливало на артеріальний тиск та вегетативні реакції під час фізичного навантаження.

Крім цього, Зуєв зі співавт. [29] дослідили ефективність лікування комбінацією L-тироzinу з екстрактом гарцинії камбоджійської, піколінатом хрому, L-карнітином та сухим екстрактом бурих водоростей на антропометричні показники, а також кількість жирової тканини (ЖТ) і характер її розподілу у хворих на цукровий діабет (ЦД) 2-го типу з ожирінням та артеріальною гіпертензією. У результаті було встановлено, що терапія даним препаратом у дозі 1 капсула 3 рази на добу впродовж 12 тижнів призвела до зниження маси тіла на 4,5 % та ІМТ — на 4,60 %. На фоні терапії препаратом також відмічене зменшення загальної кількості ЖТ на 4,16 %. Отже, комбінований препарат, що містить L-тирозин, є ефективним у лікуванні ожиріння у хворих на цукровий діабет.

Гостре пошкодження нирок є міждисциплінарною проблемою, пов'язаною з високою смертністю (50-70 %). Одним із відомих на сьогоднішній день методів лікування цього захворювання є перитонеальний діаліз (ПД). У медичній практиці використовуються розчини для ПД, що відрізняються між собою осмотично активною речовиною, за рахунок якої відбувається ультрафільтрація. Серед таких

лікарських препаратів використовують препарат «Нутриніл ПД 4» з 1.1 % вмістом амінокислот, що містить L-тирозин, а також L-триптофан, L-фенілаланін, L-треонін, L-серин, L-пролін, гліцин, L-аланін, L-валін. Розчини на основі амінокислот також дають можливість одночасно постачати необхідні речовини хворим з недостатністю харчування [30].

Також Владимировою [31] було досліджено хроматографічними методами наявність тирозину, моноіодтирозину та діїодтирозину у сланях ламінарії. Результати показали, що відсотковий вміст тирозину у сланях ламінарії складає 0,00601 %, що відповідає 60,08 мкг/г. Отже, дану лікарську рослину сировину доцільно використовувати для профілактики або лікування захворювань щитоподібної залози - лікування зобної ендемії, в тому числі і вузлового зоба.

Узагальнені дані щодо використання тирозину у терапії різноманітних захворювань, наведені у *табл. 1.1*.

Таблиця 1.1

Використання L-тирозину у медицині

Ціль використання	Ефективність лікування	Механізм впливу на захворювання	Література
Викликання шкірної анальгезії	Анальгезія настає через 19 та 22 хвилини після прийняття тирозину та лідокаїну відповідно, та триває 109 та 59 хв після прийняття тирозину та лідокаїну відповідно.	Тирозин транспортується в нервові закінчення для синтезу катехоламінів, такі як епінефрин та норадреналін, які надають місцевий анестезуючий ефект.	[11]
Вплив на витривалість при здійсненні фізичних вправ та на терморегуляцію	Прийом тирозину не має ефекту на фізичну активність (час виснаження при прийомі плацебо - $61,4 \pm 13,7$ хв, тирозину - $60,2 \pm 15,4$ хв), на частоту серцевих скорочень (175 ± 11 ударів/хв. при прийомі плацебо, 177 ± 7 ударів/хв. при прийомі тирозину), температуру шкіри, теплові відчуття.	Співвідношення тирозину та фенілаланіну до інших амінокислот в плазмі крові збільшується в 2,5 рази після прийому тирозину, і залишається підвищеним протягом виконання фізичних вправ.	[12]
	Прийом тирозину не вплинув на час фізичних вправ ($34,8 \pm 6,5$ хв у порівнянні з плацебо $35,2 \pm 8,3$ хв). Концентрація лактату - 3.2 ммоль/л при прийомі тирозину та 4.1 ммоль/л при прийомі плацебо. На споживання рідини під час фізичних вправ також тирозин не впливав (311.1 мл – тирозин та 363.0 мл - плацебо). Температура шкіри при прийомі тирозину - $34.8 \pm 0.8^\circ\text{C}$, а при плацебо - $35.0 \pm 1.3^\circ\text{C}$.		[13]

Ціль використання	Ефективність лікування	Механізм впливу на захворювання	Література
Охолодження тіла та активація метаборефлексу м'язів	Прийом тирозину посилює реакцію судинозвуження при впливі холоду у віковій шкірі (зменшення судинної провідності з 0,21 до 0,15 потік/мм рт. ст.). Однак прийом L-тирозину практично не впливає на показники артеріального тиску (100 та 102 мм рт. ст. при прийомі плацебо та тирозину відповідно) та частоту серцевих скорочень при фізичних навантаженнях (62 та 63 ударів/хв).	L-тирозин необхідний для вироблення катехоламіну, та посилює рефлекс звуження судин у віковій шкірі.	[14]
	Прийом тирозину активував реакцію звуження судин при охолодженні (плацебо = $14,4 \pm 2,0$, тирозин = $32,7 \pm 1,7\%$). Крім того, тирозин покращує підтримку температури протягом охолодження (плацебо = $-0,29 \pm 0,07$, тирозин = $-0,07 \pm 0,07$ °C).		[15]
Вплив на когнітивні здібності	Спостерігається дозозалежне підвищення концентрації тирозину в плазмі крові. Продуктивність робочої пам'яті знижується при введенні більш високих доз тирозину, особливо літнім людям.	Тирозин є попередником нейромодуючих катехоламінів: дофаміну та норадреналіну, які мають важливе значення для робочої пам'яті.	[16]
	При виконанні альтернативних завдань для оцінки дивергентного мислення старанність збільшувалася з 0,8 до 1,1, проте плинність, гнучкість та оригінальність зменшувалися з 15,8 до 15,4 з 11 до 10,8 та з 9,1 до 8,7 відповідно. Проте при виконанні завдань для оцінки конвергентного мислення, прийом тирозину покращує його з 4,7 до 5,8.		[17]
	При повторенні завдань час реакції зменшується з 664 до 657 мс, а кількість помилок – з 3,5 до 3,1%, при чергуванні завдань час реакції зменшується з 858 до 822 мс, а кількість помилок – з 9,1 до 8,2 %, а при переключенні з одного завдання на інше - час реакції зменшується з 194 до 165 мс, а кількість помилок – з 5,6 до 5,1 %.		[19]
Немалінова міопатія, здатність L-тирозину покращувати функцію скелетних м'язів	Показники цілісності скелетних м'язів не були покращені. Крім того, не спостерігалось ніякого корисного впливу на механічні властивості, енергетичний обмін та атрофію скелетних м'язів.	L-тирозин покращує м'язові функції і збільшує опосередковану катехоламіном симпатичну активність у слинних залозах у пацієнтів з НМ.	[21]
	Відбулося помітне покращення спонтанних рухів, зменшення сиалореї та відновлення сили м'язів. L-тирозин також може запобігти глотковим виділенням і слиновиділенню.		[22]

Ціль використання	Ефективність лікування	Механізм впливу на захворювання	Література
Фенілкетонурія	Прийом тирозину не впливає на зменшення концентрації фенілаланіну в крові, а також на інші показники (набір ваги, харчування, інтелект, нейропсихологічні показники).	Дефіцит тирозину є причиною нейропсихологічних проблем при фенілкетонурії	[23]
Нервова анорексія	Прийом тирозину збільшує споживання їжі, покращує когнітивні функції та підвищує рівень катехоламінів у мозку. А також тирозин має позитивний вплив на пам'ять, покращує депресивний настрій.	Тирозин може покращити когнітивні функції та психологічні характеристики	[24]
Вплив на хронічний стрес	Опорно-рухова активність через 2 тижні після прийому тирозину збільшилася (2,71 м, контроль - 1,86 м), а через 4 тижні- 1,81 та 1,36 м відповідно. Рівень тиреотропіну підвищився при прийомі тирозину з 0,55 до 0,64 нг/мл, а трийодтироніну – з 29,91 до 35,62 нг/мл. Рівень дофаміну та норадреналіну в гіпокампі та гіпоталамусі збільшувався на 0,5 нг/мл.	Нейроендокринна мережа відіграє важливу роль при хронічному стресі	[25]
Антидепресантний ефект	Прийом L-тирозину у кількості 10 мг/кг відновив загальну рухову активність, пройдену відстань протягом 30 хв та споживання сахарози.	Тирозин відновлює базальний рівень мозкового норадреналіну	[26]
Післяпологова депресія	Загальний рівень тирозину у материнській плазмі зростає: при прийомі 2 г тирозину – з 12 до 25 мкг/мл, при прийомі 5 г – з 12 до 35 мкг/мл, а при прийомі 10 г тирозину – з 12 до 55 мкг/мл. Рівень вільного тирозину в грудному молоці підвищується до 0,5, 0,8 та 1,7 мг/100 мл молока при прийомі 2, 5 та 10 г тирозину відповідно.	Незначний вплив тирозину на його концентрацію в грудному молоці та плазмі крові	[27]
Хвороба Паркінсона	Прийом тирозину впливає на підвищення тирозину у плазмі крові (59,2 та 73,1 мкмоль/л у контрольній та дослідній групі відповідно), та підвищення рівня норадреналіну (на 60 та на 103,7 пг/мл).	Тирозин є головним попередником норадреналіну, який знижує артеріальний тиск	[28]

Отже, тирозин є ефективним у лікуванні таких захворювань, як нервова анорексія, хронічний стрес, післяпологова депресія, хвороба Паркінсона, також тирозин покращує когнітивні здібності, посилює судинозвуження при охолодженні тіла, викликає шкірну аналгезію. Проте у лікуванні фенілкетонурії, немалінової міопатії роль тирозину незначна, а також тирозин не впливає на витривалість при здійсненні фізичних вправ та на терморегуляцію.

1.1.2. Використання тирозину у сільському господарстві

Тирозин може використовуватися у тваринництві з метою покращення росту та розмноження тварин (кроликів, кіз, корів) [32-35], на показники лактації корів [34], на забарвлення шерсті цуценят [36].

Затримка статевого дозрівання та зниження народжуваності протягом літніх місяців вважаються однією з найбільш проблем у вирощуванні кроликів. Тому дослідження вчених з Єгипту [32] мало на меті вивчення впливу тирозину на покращення показників кроликів чоловічої статі. Результати виявили, що L-тирозин індукував дозозалежне, значне збільшення маси тіла (на четвертий місяць прийому тирозину маса тіла складала 2960 г, у порівнянні з контрольною групою – 2256 г), маси яєчок (14,04 г при споживанні тирозину, у порівнянні з контролем – 6,61 г) та сироваткового тестостерону (2,580 та 1,143 нг/мл при прийомі тирозину та у контрольній групі відповідно), тироксину (390,7 та 240,3 нг/дл відповідно) та трийодтироніну (3,97 та 1,98 мкг/дл відповідно), порівняно з контрольною групою. До того ж L-тирозин викликав значне збільшення обсягу сперми (1,4 та 0,7 мл на четвертий місяць при прийомі тирозину та у контрольній групі відповідно), кількості сперматозоїдів (4,03 та 3,4 млн/мл відповідно), та відсотку живих сперматозоїдів (92 та 77% відповідно). Отже, додавання L-тирозину у дозі 100 мг/кг сприяє статевій зрілості та поліпшує фертильність самок новозеландських кроликів у літні місяці.

El-Ella зі співавт. [33] визначили вплив перорального введення L-тирозину на діяльність яєчників та репродуктивну здатність кіз. Встановлено, що L-тирозин у кількості 1,0 г/10 кг маси тіла значно збільшував еструс кіз (95,0%), тоді як при отриманні 1,5 г тирозину/10 кг маси тіла спостерігалася незначне збільшення еструсу (90%), порівняно з контрольною групою (80%). Тривалість еструсу найбільша (41,94 год) з дозуванням тирозину 1,0 г, у порівнянні з контролем (13,73 год). При отриманні L-тирозину у кількості 1,5 г збільшилася загальна кількість овуляторних циклів (3,8), порівняно з контролем (2,6). Рівень вагітності був значно більшим при отриманні L-тирозину у кількості 1,5 г (90 %), ніж у контрольній групі (70%). Тривалість вагітності була значно меншою при прийомі тирозину (146,12,

148,07 та 150,44 днів при прийомі тирозину у концентрації 1 та 1,5 г та у контрольній групі відповідно). Кількість дітей, народжених однією самкою, була більшою при прийомі тирозину (2,22-2,24), порівняно з контрольною групою (2,14). Відсоток парних близнюків (76,47-77,78%) та трійнят (22,22-23,53%) був більшим серед тварин, які отримували L-тирозин, ніж у контрольній групі (71,43 та 21,43% близнюків та трійнят відповідно). Рівень смертності новонароджених був значно нижчим у тварин, які отримували L-тирозин у концентрації 1 г/10 кг маси тіла (10%) , порівняно з контрольною групою (20%). Тому прийом L-тирозину може бути рекомендовано в якості терапії, для підвищення рівня продуктивності кіз.

Вчені на чолі з Gabr [34] вивчали вплив перорального прийому L-тирозину у дозі 50 г/корову на 21 день та на 40 день післяпологового періоду на показники лактації корів та на репродуктивні показники. Результати показали, що прийом L-тирозину значно покращив щоденне вироблення молока на 11,5 та 11,8% порівняно з контролем. Споживання тирозину також збільшило відсотки жиру, білку та лактози у молоці (3,83, 3,22 та 4,37 проти 3,72, 2,89 та 4,14%) відповідно. Тирозин має вплив і на репродуктивні показники корів. Так, при прийомі тирозину на 21 день, тривалість періоду від пологів до першого еструсу скоротилася з 35,52 до 24,84 дня. Проте на інші показники (кількість овуляторних циклів, тривалість овуляторних циклів, кількість еструсів) не відмічається позитивного впливу тирозину. Отримані результати показують, що L-тирозин пригнічує ріст фолікулів в яєчнику, що призводить до зниження вказаних параметрів.

Також ними [35] було визначено вплив перорального прийому 0,1 г тирозину/кг маси тіла телят. Кількість еритроцитів (8,98-9,31 проти 8,41) та концентрація глюкози (79,69-82,20 проти 77,57) та креатиніну (1,63-1,64 проти 1,28) в плазмі крові були вищими при прийомі тирозину. Кількість лейкоцитів (11,76, 11,95 та 12,05), концентрації гемоглобіну (9,05, 8,75 та 8,73), плазмових альбумінів (3,76, 3,69, 3,90) та сечовини (30,55, 28,64, 31,41) були майже однаковими для трьох досліджуваних груп. Маса тіла телят через 10 тижнів при прийомі 1 та 2 доз тирозину складала 72,52 та 74,74 кг відповідно, проти 65,29 кг у контрольній групі. Середній щоденний приріст при прийомі тирозину також збільшився та складав 0,71, 0,68 та 0,59 кг при

прийомі 2 доз та 1 дози тирозину та у контрольній групі відповідно. Кількість споживання корму при прийомі тирозину зменшилася, загальна кількість сухих речовин складала 2,05-2,1 кг/кг приросту при прийомі тирозину, порівняно з контрольною групою (2,46 кг/кг приросту). Отже, виявлено сприятливий вплив L-тирози́ну на продуктивні показники телят та покращення показників годування телят.

Науковці з Франції [36] встановили, що для підтримки синтезу еумеланіну необхідні більш високі рівні фенілаланіну + тирозину, ніж рекомендовані для росту. Визначено, що дієта із загальним вмістом даних амінокислот в 6 г/Мкал (вище, ніж рекомендується для приросту), забезпечує оптимальний колір чорної шерсті у цуценят, а рівень до 7 г/Мкал може призвести до більш інтенсивного чорного кольору шерсті. Проте рівень тирозину у плазмі до 54 мкмоль/л не гарантував оптимального чорного кольору шерсті і призвів до появи «червонуватого волосся» у цуценят із чорним покриттям.

Вчені з Малайзії [37] досліджували вироблення беталаїну в калусній культурі червоної пітаї (*Hylocereus polyrhizus*) шляхом додавання попередника L-тирози́ну у різних концентраціях (20, 40, 60, 80, 100 мг/л). Встановлено, що додавання 20 мг/л L-тирози́ну найсильніше збільшує вироблення бетаціаніну в 1,5 рази, а утворення беталаїну - у 1,7 разів. Чотири сполуки, а саме бетаціанін, бетаксантин, а також фенольні та флавоноїдні сполуки виявлено у червоно-пігментованих культурах, оброблених 20 мг/л L-тирози́ну.

Отже, тирозин покращує репродуктивні показники кроликів, кіз, проте на репродуктивну здатність корів тирозин не впливає. Однак дана амінокислота покращує вироблення молока у корів, а також підвищує кількість жиру, білку та лактози у молоці. Крім цього, тирозин позитивно впливає на ріст телят, збільшуючи масу тіла та щоденний приріст маси, а також зменшуючи споживання корму тваринами. Також тирозин відіграє роль у забезпеченні чорного забарвлення шерсті у цуценят, шляхом синтезу еумеланіну.

1.1.3. Використання тирозину для біотехнологічного одержання цінних сполук

Тирозин широко використовується для біосинтезу багатьох сполук, наприклад, гідрокситирозолу [38], L-ДОФА [39-45], нарінгеніну [46-47], еріодіонтіолу [48], рествератролу [49], фенольних альдегідів [50], меланоїдних пігментів [51-52].

Гідроксилування тирозину - важлива реакція в біосинтезі багатьох природних продуктів. У роботі Satoh та співавт. [38] продемонстровано, що кофактор *E. coli* тетрагідромонаптерин, може бути використаний як альтернативний кофактор для тирозингідроксилази, при цьому гідроксилування тирозину проводиться без переокислення. Ця платформа була використана для біосинтезу одного з найпотужніших антиоксидантів - гідрокситирозолу. За допомогою штаму *E. coli* JW1380, в який вбудовано гени тирозингідроксилази, гени шляху регенерації тетрагідробіоптерину, що включають птерин-4а-карбіноламіндегідратазу та дигідроптеридинредуктазу, ген L-ДОФА декарбоксилази та ген тираміноксидази, при додаванні у якості субстрату 1 мМ тирозину, отримано 0,19 мМ гідрокситирозолу.

Вчені на чолі з Raval [39] встановили, що *Penicillium jensenii*, ізольований з ґрунту, є потужним продуцентом тирозинази, яка здійснює біотрансформацію тирозину у L-ДОФА, яка використовується в якості терапевтичного засобу при лікуванні хвороби Паркінсона. Встановлено, що штами *P. jensenii* DKP-1-F та DKP-2-F, у порівнянні з іншими досліджуваними штамми, синтезують найбільшу кількість L-ДОФА через 24 год культивування (0,025 мг/мл), яка збільшується до 0,038 мг/мл через 6 діб культивування. Таком було проведено оптимізацію умов культивування, та виявлено, що максимальний вихід L-ДОФА був отриманий при температурі 30 °C, рН 6 і 3 мг/мл тирозину у якості субстрату.

У іншій роботі індійські вчені на чолі з Surwase [40] вивчали біосинтез L-ДОФА з L-тирозину штамом *Bacillus* sp. JPJ. Ця бактерія виробляла 0,497 мг/мл (99,4%) L-ДОФА з 0,5 мг/мл L-тирозину в буфері (рН 8), що містить 1 мг/мл біомаси при інкубуванні при 40 °C протягом 60 хв. Додавання CuSO_4 та L-аскорбінової кислоти виявляли індукуючу дію на синтез L-ДОФА у концентраціях 0,06 та 0,04

мг/мл відповідно. Крім цього, активоване вугілля у концентрації 2 мг/мл сприяло максимальній біоконверсії L-тироzinу в L-ДОФА.

Пізніше ці ж вчені [41] отримали L-ДОФА з тирозину з використанням біомаси *Brevundimonassp. SGJ*. Також вони вивчали дію різних індукторів, таких як карагенан, діатомова земля та активоване вугілля на синтез L-ДОФА. Встановлено, що оптимальними умовами культивування були рН 8, 2 г/л L-тироzinу, 0,04 г/л CuSO_4 , 0,02 г/л L-аскорбінової кислоти, 0,5 г/л карагенану, температура 40 °С та швидкість перемішування 200 об/хв. За даних умов отримано 1,914 г/л L-ДОФА з 1,962 г/л тирозину за 60 хвилин інкубації. Крім цього, багаторазове використання клітин призвело до найвищого виходу 3,81 г/л (95,2%) L-ДОФА з 4 г/л L-тироzinу після 18 год культивування.

Ще одне дослідження вчених з Індії [42] присвячене біосинтезу L-ДОФА з тирозину за допомогою штаму *Streptomyces sp. VRS9*. Культивування штаму проводили при 35 °С та рН 8 протягом 36 годин. Також встановлено, що додавання метіоніну у концентрації 10 мМ на початку експоненційної фази призводить до збільшення синтезу L-ДОФА з 0,49 до 0,9 мг/мл, порівняно з використанням для синтезу тирозину окремо.

Науковці з Пакистану [43] здійснювали мікробну трансформацію тирозину до L-ДОФА за допомогою нещодавно ізольованого штаму грибів *Coriolus versicolor* DOB-4. Біомасу використовували як джерело ферменту тирозинази. Клітини грибів попередньо обробляли метанолом і сушили при 105 °С протягом 2 год. Оптимальне виробництво L-ДОФА було досягнуто при використанні 1,5 мг/мл L-тироzinу в якості основного субстрату. Також встановлено, що лимонна кислота у концентрації 1,5 мг/мл стимулює конверсію тирозину у L-ДОФА. Визначено оптимальні умови біотрансформації: час інкубації - 50 хв та температура 60 °С. За даних умов максимальна концентрація L-ДОФА становила 0,872 мг/мл з 1,002 мг/мл спожитого L-тироzinу.

Вченими на чолі з Gurme [44] оптимізовано процес культивування дріжджів *Yarrowia lipolytica*-NCIM 3450 для отримання L-ДОФА з тирозину. Встановлено, що оптимальні параметри біосинтезу наступні: рН 6,1, 1,665 г/л дріжджового екстракту,

1,449 г/л L-тирозину, 0,0290 г/ CuSO₄. Прогнозований вихід L-ДОФА за цих умов складав 1,331 г/л, тоді як фактичний отриманий вихід становив 1,227 г/л. Перед оптимізацією вихід L-ДОФА становив лише 0,387 г/л, отже оптимізація середовища та умов культивування підвищила вихід L-ДОФА у 3,594 рази.

Ще одне дослідження індійських вчених [45] було направлено на підвищення біотрансформації l-тирозину до l-ДОФА штамом *Aspergillus niger* PA2, що синтезує позаклітинну тирозиназу. Оптимальне рН біосинтезу становило 6,0, а температура - 30°C, оптимальна концентрація тирозину – 5 мг/мл. При даних умовах було отримано високий рівень l-ДОФА 2,44 мг/мл при споживанні 2,9 мг/мл тирозину за 120 годин біотрансформації.

. Флавоноїди - важливий клас рослинних поліфенолів, які мають різноманітні переваги для здоров'я. У роботі вчених на чолі з Лу [46] розроблений штам *Saccharomyces cerevisiae* Y-35 P-P на основі штаму *S. cerevisiae* BY47412 для біосинтезу флавоноїдного нарінгеніну з використанням тирозину як попередника. Встановлено, що покращення біосинтезу нарінгеніну відбувалося при використанні модифікованої системи GAL, що надекспресує гени нарінгеніну, а також при модифікації шляху біосинтезу тирозину з усуненням інгібування за типом зворотного зв'язку. При даних модифікаціях отримано 84 мг/л нарінгеніну, що в 20 разів вище, порівняно з батьківським штамом.

Наступне дослідження Wu та співавт. [47] також присвячено біосинтезу нарінгеніну. Для збільшення продуктивності синтезу даного флавоноїду налагоджено біосинтетичний шлях жирних кислот у *E. coli* BL21 (DE3) з антизмістовною РНК з метою збалансування потреб у малоніл-КоА для синтезу цільового продукту. Було продемонстровано, що ген-замовчуючий ефект антизмістовної РНК можна налаштувати шляхом спрямування антизмістовної РНК у різні положення 5-UTR області цільового гена. Виходячи з цього принципу, активність антизмістовної РНК була кількісно підібрана, щоб збалансувати потребу в малоніл-КоА для росту клітин та виробництва (2S)-нарінгеніну. При застосуванні даного методу отримано штам *E. coli* з геном abF-R38+fabB-R48, при культивуванні якого у середовищі з 3 мМ тирозину вихід нарінгеніну збільшився на 431% та

становив 391 мг/л. У порівнянні, батьківський штам синтезує лише 31 мг/л нарінгеніну.

Ще один флавоноїд – еріодіонтіол, що володіє протизапальною та антиоксидантною активністю, також можна отримати з тирозину. Вченими з Китаю [48] урізаний рослинний флавоноїд P450 та флавоноїд-3'-гідроксилаза були функціонально експресовані у вигляді злитого білку з усіченою P450-редуктазою (tCPR) у клітинах *E. coli*. Це дозволило сконструйованому штаму *E. coli* синтезувати еріодіонтіол із L-тирозину одночасно спільно експресуючи злитий білок з тирозинамонійліазою, 4-кумарат-КоА-лігазою, халконсинтазою та халконізомеразою. Крім того, метаболічна інженерія була використана для посилення доступності малоніл-КоА для досягнення метаболічного балансу та експресії генів для посилення накопичення еріодіонтіолу. Такий підхід збільшив синтез еріодіонтіолу на 203%, у порівнянні з контрольним штамом. Також було встановлено оптимальну температуру культивування, яка складала 25°C, оптимальну концентрацію індуктора ізопропіл-D-тіогалактопіранозиду – 0,6 мМ. При культивування штаму *E. coli* BMF2 при даних оптимальних умовах на середовищі з 1 мМ тирозину у якості субстрату отримано 107 мг/л еріодіонтіолу.

Дослідження науковців з Китаю [49] полягало у розробленні штаму *E. coli*, що містить гени ферментів тирозинамонійліази (TAL), 4-кумарат:КоА-лігази (4CL), стилбен-синтази (STS), малонатсинтетази та малонатпереносного білку, з метою отримання ресвератролу з L-тирозину. Ресвератрол має терапевтичну дію завдяки його антиоксидантному, протизапальному, протипухлинному та хіміопреventивному ефектам. Використовуючи цю стратегію, з отриманих 27 штамів найбільш продуктивний штам *E. coli* S16 зміг продукувати 35,02 мг/л ресвератролу з L-тирозину (при його концентрації у середовищі 3 мМ).

Фенольні альдегіди, такі як протокатеховий альдегід, гідроксибензальдегід та ванілін, привернули велику увагу своїм широким застосуванням у якості лікарських засобів, ароматизаторів, харчових добавок, складових косметичних засобів. Корейські вчені на чолі з Jang [50] розробили штам *E. coli* для експресії ферментів, таких як тирозинамонійліази (TAL), p-кумарат-3-гідроксилази (C3H), ферулоїл-КоА-

синтетази (FCS) та еноіл-КоА-гідратази (ECH). При спільній експресії TAL і СЗН з FCS і ECH, отриманий штам *E. coli* M3 здатен перетворювати тирозин (200 мг/л) в кофеїнову кислоту (191,8 мг/л), яка потім перетворюється в протокатеховий альдегід. Аскорбінову кислоту використовували як інгібітор утворення меланіну, при цьому вихід синтезованого протокатехового альдегіду та п-гідроксибензальдегіду становив $31,0 \pm 5,6$ і $24,0 \pm 4,2$ мг/л відповідно. Також встановлено, що утворення меланіну на основі кофеїнової кислоти спостерігається у більш високій концентрації $40,9 \pm 6,2$ мг/л/год при спільній експресії FCS та ECH у присутності кофеїнової кислоти.

Крім цього, тирозин використовується у біосинтезі меланоїдних пігментів. Vasanthakumar зі співавт. [51] виділили штам *Penicillium chrysogenum* 54-1255 ATCC28089, який здатний до синтезу коричневого пігменту піомеланіну *in vitro* при вирощуванні в середовищі, що містить тирозин (2 г/л). Встановлено, що інгібітори шляху біосинтезу меланіну, такі як трициклазол та коїкова кислота, не змогли інгібувати утворення даного пігменту. Також досліджено, що піомеланін синтезується тільки при наявності тирозину у середовищі.

Бразильські дослідники [52] культивували штами *Sporothrix*, такі як *S. brasiliensis* (58 штамі), *S. schenckii* (14 штамі) та 1 штам *S. globosa*, у середовищі з тирозином з метою отримання меланоїдних пігментів. Всі штами, окрім одного, змогли продукувати меланоїдний пігмент з негативним зарядом у через 9 днів інкубації. Мутантний штам *S. schenckii* також синтезує дигідроксинафталін-меланін у присутності тирозину. Встановлено, що сулькотріон пригнічує синтез пігменту. 73 штами змогли синтезувати пігмент на культуральних середовищах з тирозином (10 мМ) при 37 °C за 9-12 днів культивування, хоча рівень експресії пігменту був нижчим, ніж при 25 °C для більшості штамі. За 20 днів культивування при 37 °C 11 штамі (15,1%) утворювали лише невелика кількість меланоїдного пігменту, 36 (49,3%) культур були світло-коричневими, 24 (32,9%) - темно-коричневими, та лише 2 (2,7%) були чорними.

Таким чином, амінокислота тирозин може не тільки безпосередньо використовуватися для створення лікарських засобів, а й використовуватися для утворення інших лікарських речовин (L-ДОФА, нарінгеніну, рествератролу, фенольних альдегідів), антиоксидантів (гідрокситирозолу), пігментів (меланіну, піомеланіну), тому виробництво тирозину є дуже актуальним.

1.2. Біотехнологічні особливості одержання L-тироzinу

Традиційно L-тирозин виготовляють методами екстракції з білоквмісної сировини (відходи харчової та молочної промисловості), однак зростаючий попит на L-тирозин недостатньо задовольняється цими методами внаслідок низькопродуктивного виробництва [2].

Також для отримання L-тироzinу використовують хімічний синтез шляхом гідроксилування L-фенілаланіну. Незважаючи на переваги з точки зору собівартості та продуктивності, хімічний синтез спричиняє забруднення навколишнього середовища та утворення токсичних побічних продуктів [53].

Тому в даний час L-тирозин ефективно виробляється шляхом мікробного синтезу. Протягом кількох десятиліть було зроблено багато спроб збільшити синтез L-тироzinу методами надекспресії ферментів біосинтетичного шляху, введенням ферментів стійких до інгібування за типом зворотного зв'язку [2].

1.2.1. Методи одержання надсинтетиків тирозину

Для ідентифікації штамів, що продукують тирозин, було розроблено кілька методів [54-55].

Мао та співавт. [54] здійснювали біосенсорний скринінг-аналіз, заснований на синтезі бетаксантину, з метою скринінгу штамів, що синтезують L-тирозин. Було встановлено лінійну залежність між вмістом позаклітинного L-тироzinу та утворенням жовтого пігменту. Так, при інтенсивності флуоресценції 500, концентрація синтезованого треоніну становила 100 мкг/мл, а при інтенсивності флуоресценції 2500 – 600 мкг/мл. Крім того, жовтий пігмент, який накопичував високопродуктивний штам L-тироzinу, можна легко відрізнити неозброєним оком, порівняно зі штамом дикого типу. Отже, ця стратегія скринінгу мутантних бібліотек є перспективною у пошуках високо продукуючих штамів L-тироzinу.

Stephanopoulos та співавт. [55] розробили спосіб ідентифікації штамів бактерій, що продукують L-тирозин, що включає культивування в середовищі одного або декількох бактеріальних штамів, здатних до синтезу L-тироzinу і які експресують тирозиназу, яка має здатність перетворювати L-тирозин в меланін з наступним визначенням кількості утвореного меланіну, де продукція меланіну штамом вказує на те, що штам продукує L-тирозин.

Кількість меланіну, що утворюється одним або декількома штамми бактерій, позитивно корелює з кількістю L-тироzinу, що утворюється одним або декількома штамми бактерій. Кількість меланіну, що утворюється одним або декількома штамми бактерій, визначається візуальним або спектрофотометричним методом. Розроблена стратегія може бути ефективною при скринінгу великих комбінаторних бібліотек у пошуках штамів, що надсинтезують L-тирозин.

Загальний біосинтетичний шлях ароматичних амінокислот - шикіматний шлях. Проте синтез L-тироzinу метаболічно затратний, тому у клітинах синтезується лише така кількість тирозину, яка необхідна для росту клітин. При конструюванні мікробних штамів, які здатні до надсинтезу L-тироzinу, необхідно подолати механізми контролю на шляху біосинтезу тирозину. У минулому з цією метою переважно використовували мутагенез та селекційні процеси, оскільки було мало інформації про метаболічні шляхи, що беруть участь у біосинтезі L-тироzinу. Однак, нові знання про біосинтетичні шляхи та засоби генної інженерії дозволили раціонально розробити мікробні штамми, які надсинтезують цю амінокислоту.

Juminaga зі співавт. [56] було модифіковано біосинтетичний шлях для отримання L-тироzinу за допомогою штаму *E. coli*MG1655 шляхом кодування ферментів, що перетворюють еритрозо-4-фосфат (E4P) і фосфоенолпірувату (PEP) в L-тирозин, на двох плазмідах.

На *рис. 1.1.* представлено біосинтетичний шлях утворення тирозину з глюкози. Основне вузьке місце біосинтетичного шляху, пов'язане з біфункціональною діяльністю хінат/шикіматдегідрогенази (YdiB), яка спричиняє накопичення проміжних продуктів дегідрохінату (DHQ) та дегідрошикімату (DHS) та побічного продукту хінату (QUIN). Це вузьке місце було подолано шляхом заміни гену YdiB

на його паралог AroE, в результаті чого значно збільшився вихід шикімату (SHIK), який далі перетворюється на тирозин (рис. 1.1).

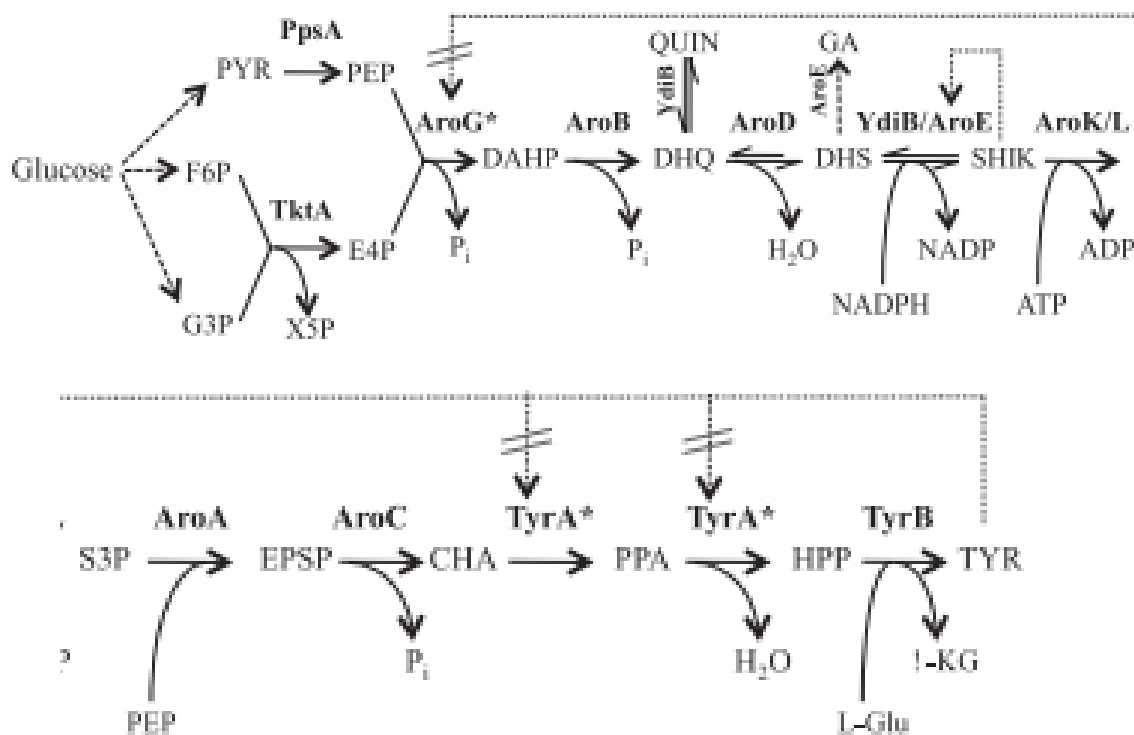


Рис. 1.1. Шлях біосинтезу тирозину

*Примітка: Скорочення: PYR – піруват, PEP - фосфоенолпіруват; F6P – фруктозо-6-фосфат; X5P – ксилулозо-5-фосфат; E4P - еритрозо-4-фосфат; DAHP - 3-дезоксид-арабіно-гептулозонат-7-фосфат; DHQ - 3-дегідрохінат; DHS - 3-дегідрохікімат; SHIK - шикімат; S3P - шикімат-3-фосфат; EPSP - 5-енолпірувілшикімат-3-фосфат; CHA - хоризмат; PPA - префенат; HPP - 4-гідроксифенілпіруват; TYR - тирозин. Ферменти: PpsA - фосфоенолпіруватсинтаза; TktA - транкетолаза А; AroG – ДАГФ-синтаза; AroB - дигідрохінатсинтаза; AroD - дигідрохінатдегідратаза; YdiB - хінат/шикіматдегідрогеназа; AroE - шикіматдегідрогеназа; AroK / L - шикіматнакіназа I / II; AroA - EPSP синтаза; AroC - хоризматсинтаза; TyrA - хоризматмутаза / префенатдегідрогеназа; TyrB - тирозинамінотрансфераза. Пунктирні лінії вказують, де відбувається інгібування за типом зворотного зв'язку.

Інгібування ферментів AroG і TyrA було подолано за допомогою відповідних стійких до зворотного зв'язку мутантів.

Шикіматна конверсія в L-тирозин була покращена за рахунок заміщення шикіматкінази AroK на її ізофермент AroL.

Ці модифікації біосинтетичного шляху дозволили збільшити синтез тирозину до 2 г/л.

Наступний штам науковці на чолі з Kim [57] конструювали, використовуючи стійкі до інгібування за типом зворотного зв'язку гени *aroG* та *tyrA* як початкові мішені для надмірної експресії тирозину, які кодують 3-дезоксид-7-фосфогептулатсинтазу та хоризматмутази/префенатдегідрогеназу відповідно. При цьому різні комбінації генів надмірно експресують у штамі *E. coli* дикого типу та штамів, у яких видаляли ген *tyrR*. Ген *TyrR* пригнічує синтез генів *aroG*, *aroF*, *aroL* і *tyrP* на шляху біосинтезу тирозину.

Штам *E. coli* ВТУ2.13, що надмірно експресує вищезгадані гени, разом з видаленням транспортеру L-тирозину *tyrR* продукує 43,14 г/л L-тирозину.

За допомогою використання транскрипційної інженерії, дослідникам під керівництвом Santos [7] вдалося створити три штами з двох окремих бібліотек мутагенезу (*groA* і *groD*), які виявили збільшення синтезу L-тирозину на 114%, в порівнянні з батьківським штамом, що мав високу продуктивність синтезу тирозину.

В свою чергу батьківський штам був одержаний шляхом подолання кінетичних та регуляторних обмежень на шляху біосинтезу тирозину:

1. видалення гену *tyrR* для обходу регуляції транскрипції;
2. делеція *pheA*, щоб усунути втрату проміжних продуктів шляху;
3. надмірне експресування генів, стійких до інгібування за типом зворотного зв'язку ДАГФ-синтази (*aroGfbr*) та хоризматмутази/префенатдегідрогенази (*tyrAfbr*).

Оперон *tyrAfbr-aroGfbr* був поставлений під конститутивний контроль та інтегрований у бактеріальну хромосому.

При культивуванні продуцента *E. coli*P2 додавали ізопропіл- β -D-тіогалактопіранозид для індукції гену *pCL1920 :: tyrAfbraroGfbr*. Також додавали L-фенілаланін, так як продуцент є ауксотрофом за фенілаланіном. Культивування

даного штаму *E. coli*P2 дало можливість отримання L-тироzinу у концентрації 13,8 г/л за 36 год.

Huang зі співавт. було розроблено [3] новий підхід до синтезу тирозину в *E. coli* шляхом експресії фенілаланін-4-гідроксилази (P4H), яка може перетворювати фенілаланін у тирозин, а також обхід загального гальмування зворотного зв'язку.

Для створення L-тирозин продукуючого штаму (*E. coli* SCK1), Kim та співавт. [2] використовували сильний конститутивний промотор BVA_J23100, за допомогою якого було підвищено рівень транскрипції всіх генів біосинтетичного шляху L-тироzinу.

Крім того, послідовність 5'-UTR була розроблена для досягнення максимального вираження кожного гена в шляху біосинтезу тирозину. На основі N-кінцевої послідовності кодування кожного гену, можна отримати максимальний рівень експресії генів.

Таким чином, кожен ген біосинтетичного шляху експресувався під контролем синтетичного конститутивного промотору та 5'-UTR з використанням притаманного термінатора (рис. 1.2).

Стійкі до зворотного зв'язку варіанти генів AroGfbr та TyrAfbr були заміщені ферментами дикого типу для дерегуляції інгібування зворотного зв'язку L-тироzinом. При цьому синтез L-тироzinу інженерним штамом *E. coli* був збільшений до 3,0 г/л.

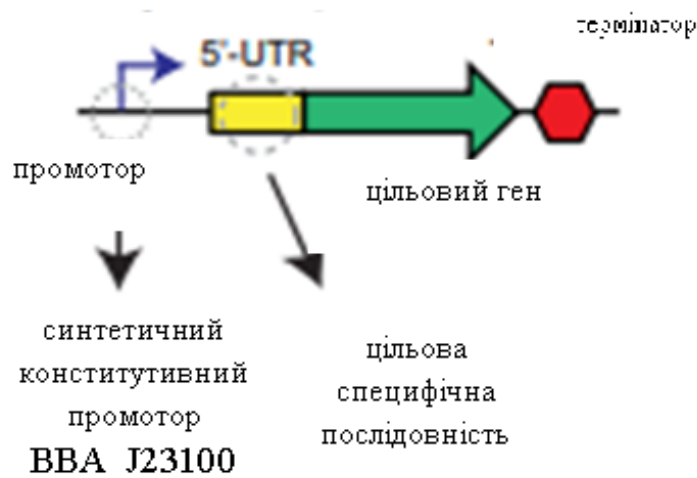


Рис. 1.2. Регулювання синтезу тирозину з використанням синтетичного промотора

Вчені на чолі з Jo [58] встановили здатність до синтезу тирозину з ацетату, який є досить перспективним зважаючи на невелику ціну та доступність ацетату як субстрату.

Використовуючи інженерний штаб *E. coli* SCK-APG4 з оптимізованим шляхом біосинтезу (в тому числі максимізації використання вуглецю для катаболізму ацетату та синтезу тирозину, а також оптимізації гліоксигенезу та гліоксилатного циклу), використовуючи синтетичні промотори та 5'-нетрансльовані області (UTR), можна отримати 0,7 г/л тирозину.

Крім того, загальний шлях повинен бути оптимізований, щоб уникнути нестачі попередників біосинтезу, а саме фосфоенолпірувату і еритрозо-4-фосфату.

Більше того, активність гліоксилатного циклу відіграє вирішальну роль у утворенні даних попередників (рис. 1.3). Ацетат використовується для поповнення попередників через гліоксилатний цикл. Тим часом ацетат має метаболізуватися і через цикл три карбонових кислот (ЦТК) для генерації АТФ та НАДН, що також необхідні для синтезу тирозину. Отже, оптимізація активності гліоксилатного циклу визначає розподіл ацетату між циклами гліоксигенезу та ЦТК.

Асиміляція ацетату та шлях гліоксигенезу активується надмірною експресією *acs* (ацетил-КоА синтетази) та *pck* (фосфоенолпіруваткарбоксикінази) у штамі *E. coli* SCK1.

Активність гліоксилатного циклу контролюється шляхом зміни експресії ключового гена *aceA*, що кодує ізоцитратліазу.



Рис. 1.3. Шлях синтезу тирозину з ацетату

*Примітка: CIT – цитрат, ICT – ізоцитрат, α -KG – α -кетоглутарат, SUC – сукцинат, MAL – малат, OAA – оксалоацетат, PEP – фосфоенолпіруват, DAHP - 3-дезоксид-арабіно-гептулозонат-7-фосфат, G-6-P – глюкозо-6-фосфат, E-4-P – еритрозо-4-фосфат, TYR – тирозин, aceA – ізоцитратліаза, acs - ацетил-КоА синтетаза, pck – фосфоенолпіруваткарбоксікіназа.

Стратегія оптимізації шляху перетворення ацетату на тирозин здійснюється шляхом перетворення ацетату до ацетил-КоА, який далі може метаболізуватися двома різними шляхами: окисненням до CO₂ та генеруванням АТФ та НАДН у ЦТК або перетворюватися до попередників метаболітів та клітинної біомаси через гліоксилатний цикл. При цьому слід враховувати поповнення попередників (фосфоенолпірувату від оксалоацетату) та споживання енергії на виробництва тирозину.

Ху та співавт. [1] розробили ще один спосіб отримання L-тирозину, який полягає в тому, що гени TPL (тирозин фенол-ліази - ферменту, що каталізує оборотне перетворення L-тирозину до пірувату, фенолу та аміаку) з бактерій *Citrobacter freundii* (CfTPL), *Erwinia herbicola* (EhTPL) та *Rhodobacter capsulatus* (TutA) кодон-оптимізують та надмірно експресують в *E. coli* BL21. Таким чином, біосинтез тирозину відбувається з таких попередників, як фенол, піруват натрію та амоній хлорид, які трансформуються у тирозин за допомогою ферменту тирозин фенол-ліази. За допомогою даного методу отримують концентрацію тирозину у 3 рази більшу, ніж у вихідного штаму CfTPL. Максимальний вихід тирозину становить 48,5 г/л.

Цими ж вченими у 2020 році [53] отримално високопродуктивні мутанти *E. coli*, що синтезують L-тирозин в достатній кількості, шляхом експресії теплоіндукованого вектору, що переносить два ферменти стійкості до зворотного зв'язку (ДАГФ-синтази *aroGfbr* та хоризматмутази / префенатдегідрогенази *tyrAfbr*), які вводили в штам *E. coli* HG, що продукує фенілаланін, щоб він міг синтезувати L-тирозин безпосередньо з глюкози. Крім того, була застосована технологія CRISPR-Cas9 для пригнічення біосинтетичних шляхів L-фенілаланіну та L-триптофану. Регуляторний білок *TyrR*, який опосередковує біосинтез та транспортування

ароматичних амінокислот, також було видалено для збільшення продукції L-тироzinу. Отриманий штам *E. coli* з подвійним геном, одержаним за допомогою теплоіндукованої експресійної плазмиди pAP-aroGfbr-tyrAfbr, синтезує 55,54 г/л L-тироzinу.

Наступний штам *E. coli* ΔCOS1, здатний до надсинтезу тирозину, дослідники під керівництвом Kang [59] отримали шляхом перенесення векторів генів aroGfbr (ген 3-дезоксид-арабіногептулозонат-7-фосфатсинтази) та tyrAfbr (ген хоризматмутази / префенатдегідрогенази). При цьому не відбувається інгібування за типом зворотного зв'язку 3-дезоксид-арабіногептулозонат-7-фосфат (ДАГФ) синтази (aroG) і хоризматмутази / префенатдегідрогенази (tyrA). У даного штаму *E. coli* ΔCOS1 оптимізований шлях отримання ароматичних сполук, в результаті чого сильно збільшується потік метаболізму в напрямку утворення L-тироzinу. Вихід тирозину становить 450 мг/л.

Noda та співавт. [60] визначили, що за допомогою штаму *E. coli* ATCC31882 можна синтезувати декілька похідних хоризмату, включаючи 4-гідроксибензоат, 4-амінобензоат, 2-амінобензоат, L-тироzin, 3-гідроксибензоат, фенол та цис,цис-муконову кислоту.

На основі цього штаму *E. coli* ATCC31882, який здатний до надсинтезу L-фенілаланіну, створено штам *E. coli*CFT5, який здатен переключатися з синтезу L-фенілаланіну на синтез L-тироzinу. Зокрема, для отримання штаму CFT5 був введений ген *E. coli* tyrAfbr (мутований ген). Ген tyrA кодує хоризматмутазу/префенатдегідратазу, діяльність мутантного гену не піддається зворотньому інгібуванню L-тирозином. Цей штам продукує L-тироzin у концентрації 1620 мг/л через 96 год культивування, що в 10,8 разів більше, порівняно з вихідним штамом.

Також науковці на чолі з Kumari [8] здійснюють біотрансформацію фенолу до L-тироzinу з використанням штаму *Citrobacter freundii* MTCC 2424, що містить високоактивну тирозинфеноллазу (ТФЛ). Максимальний вихід L-тироzinу становить 69% (6,49 г/л) при використанні в якості компонентів поживного середовища амоній хлориду 0,25 М, фенолу 0,1 М і пірувату натрію 0,2 М у

боратному буфері (0,1 М), рН 8,5 при температурі 35 °С. Однак більш висока концентрація фенолу є інгібітором біотрансформації, оскільки фенол інактивує ТФЛ.

Перспективним є метод обмеження утворення біомаси з одночасним забезпеченням подальшого виробництва цільового продукту. Значне накопичення біомаси призводить до збільшенню витрат на очищення продукту, оскільки концентрація біомаси може сягати більше 90 г/л у процесі промислового біосинтезу.

Пригнічення утворення біомаси можна здійснювати шляхом додавання інгібіторів росту. Проте додавання антибіотиків або токсинів інгібує ріст клітин, що часто призводить до загибелі клітин. Тому додають такі інгібітори росту, які спричиняють затримку біосинтезу амінокислот (наприклад, валін), нуклеїнових кислот (5-флуоурацил), білків (тетрациклін, канаміцин), зупинка росту клітин при цьому пов'язана зі зниженим метаболізмом. Обмеження поживних речовин - це звичайна умова, з якою бактерії стикаються в природному середовищі, регуляторні механізми клітин дозволяють адаптуватися до коливання доступності поживних речовин.

Лі та співавт. [61] було досліджено отримання тирозину за допомогою пригнічення утворення біомаси штаму *E. coli* MG1655 на основі обмеження поживних речовин або додавання інгібіторів росту, таких як валін, 5-флуоурацил, тетрациклін та канаміцин. При цьому підвищений вихід тирозину досягається шляхом обмеження фосфату, сульфату або магнію в поживному середовищі. Зокрема, обмеження сульфату призводить до збільшення масового виходу тирозину на 50% (685.9 ± 27.0 мг/л). Синтез тирозину здійснюється протягом більше 10 год після пригнічення росту клітин.

Узагальнені дані щодо способів отримання штамів-продуцентів тирозину наведені у *табл. 1.2*.

Характеристика способів отримання надсинтетиків тирозину

Штам	Спосіб отримання	Вихід тирозину	Література
<i>E. coli</i> MG1 655	Модифікація біосинтетичного шляху: заміна гену <i>YdiB</i> на його паралог <i>AroE</i> , в результаті чого значно збільшився вихід шикімату, який далі перетворюється на тирозин. Інгібування ферментів ДАГФ-синтази (<i>AroG</i>) і хоризматмутази (<i>TyrA</i>) було подолано за допомогою відповідних стійких до зворотного зв'язку мутантів. Шикіматна конверсія в L-тирозин була покращена за рахунок заміщення шикіматкінази <i>AroK</i> на її ізофермент <i>AroL</i> .	2 г/л	[56]
<i>E. coli</i> ВТУ2.1 3	Штам конструювали, використовуючи стійкі до інгібування за типом зворотного зв'язку гени <i>aroG</i> та <i>tyrA</i> як початкові мішені для надмірної експресії тирозину, які кодують ДАГФ-синтазу та хоризматмутазу відповідно. А також видаляли ген <i>tyrR</i> , який пригнічує синтез генів <i>aroG</i> , <i>aroF</i> , <i>aroL</i> і <i>tyrP</i> на шляху біосинтезу тирозину.	43,14 г/л	[57]
<i>E. coli</i> P2	Штам одержаний шляхом подолання кінетичних та регуляторних обмежень на шляху біосинтезу тирозину: видалення гену <i>tyrR</i> для обходу регуляції транскрипції; делеція <i>pheA</i> , щоб усунути втрату проміжних продуктів шляху; надмірне експресування генів, стійких до інгібування за типом зворотного зв'язку ДАГФ-синтази (<i>aroGfbr</i>) та хоризматмутази/ префенатдегідрогенази (<i>tyrAfbr</i>). Оперон <i>tyrAfbr-aroGfbr</i> був поставлений під конститутивний контроль та інтегрований у бактеріальну хромосому.	13,8 г/л	[7]
<i>E. coli</i> BW2 5113	Штам отримано шляхом експресії фенілаланін-4-гідроксилази (P4H), яка може перетворювати фенілаланін у тирозин, а також обхід загального гальмування зворотного зв'язку.	0,401 г/л	[3]
<i>E. coli</i> SCK1	Для створення штаму використовували сильний конститутивний промотор <i>BVA_J23100</i> , за допомогою якого було підвищено рівень транскрипції всіх генів біосинтетичного шляху L-тирозину. Крім того, послідовність 5'-UTR була розроблена для досягнення максимального вираження кожного гена в шляху біосинтезу тирозину. На основі N-кінцевої послідовності кодування кожного гену, можна отримати максимальний рівень експресії генів. Стійкі до зворотного зв'язку варіанти генів <i>AroGfbr</i> та <i>TyrAfbr</i> були заміщені ферментами дикого типу для дерегуляції інгібування зворотного зв'язку L-тирозином.	3,0 г/л	[2]
<i>E. coli</i> SCK-APG4	Оптимізація шляху біосинтезу (максимізація використання вуглецю для катаболізму ацетату та синтезу тирозину, оптимізація гліоконеогенезу та гліоксилатного циклу). Асиміляція ацетату та шлях гліоконеогенезу активується надмірною експресією <i>acs</i> (ацетил-КоА синтетази) та <i>rck</i> (фосфоенолпіруваткарбоксікінази). Активність гліоксилатного циклу контролюється шляхом зміни експресії ключового гена <i>aceA</i> , що кодує ізоцитратліазу.	0,7 г/л	[58]

Штам	Спосіб отримання	Вихід тирозину	Літера тура
<i>E. coli</i> BL21	Гени TPL (тирозин фенол-ліази - ферменту, що каталізує оборотне перетворення L-тирозину до пірувату, фенолу та аміаку) з бактерій <i>Citrobacter freundii</i> (CfTPL), <i>Erwinia herbicola</i> (EhTPL) та <i>Rhodobacter capsulatus</i> (TutA) кодон-оптимізують та надмірно експресують в <i>E. coli</i> BL21. Таким чином, фенол, піруват натрію та амоній хлорид трансформуються у тирозин за допомогою ферменту тирозин фенол-ліази.	48,5 г/л.	[1]
<i>E. coli</i> HRP	Штам отримують шляхом експресії теплоіндукованого вектору, що переносить два ферменти стійкі до зворотного зв'язку (ДАГФ-синтази <i>aroGfbr</i> та хоризматмутази <i>tyrAfbr</i>), які вводили в штам <i>E. coli</i> HG, що продукує фенілаланін, щоб він міг синтезувати L-тирозин безпосередньо з глюкози. Крім того, була застосована технологія CRISPR-Cas9 для пригнічення біосинтетичних шляхів L-фенілаланіну та L-триптофану. Регуляторний білок <i>TyrR</i> також було видалено для збільшення продукції L-тирозину.	55,54 г/л	[53]
<i>E. coli</i> ΔCOS1	Штам отримано шляхом перенесення векторів генів <i>aroGfbr</i> та <i>tyrAfbr</i> .	450 мг/л	[59]
<i>E. coli</i> CFT 5	Штам створено на основі штаму <i>E. coli</i> ATCC31882, який здатний до надсинтезу L-фенілаланіну. Для цього було введено ген <i>tyrAfbr</i> , що кодує хоризматмутази/префенатдегідратази, діяльність цього мутантного гену не піддається зворотньому інгібуванню L-тиозином.	1620 мг/л	[60]
<i>Citrobacter freundii</i> MTCC 2424	Даний штам містить високоактивну тирозинфенолліазу (ТФЛ), яка трансформує фенол до L-тирозину.	6,49 г/л	[8]
<i>E. coli</i> MG1655	Пригнічення утворення біомаси штаму на основі обмеження поживних речовин або додавання інгібіторів росту, таких як валін, 5-флуоурацил, тетрациклін та канаміцин.	685.9 ± 27.0 мг/л).	[61]

Отже, найчастіше штамми-продуценти тирозину отримують шляхом генної інженерії. Найпродуктивніші штамми отримують шляхом введення стійких до інгібування за типом зворотнього зв'язку генів ключових ферментів біосинтетичного шляху - ДАГФ-синтази і хоризматмутази, а також видаляють регуляторний ген *TyrR*. Крім цього, ефективним є створення штамів, що експресують тирозин фенол-ліазу, яка трансформує фенол у тирозин.

1.2.2. Характеристика способів ідентифікації та очищення тирозину

З метою ідентифікації тирозину у культуральній рідині було розроблено кілька методів [62-63].

Rahman та співавт. [62] розробили простий, чутливий і селективний електрохімічний датчик на основі політіонінового модифікованого анодованого склоподібного вуглецевого електрода для виявлення L-тироzinу у присутності аскорбінової кислоти, дофаміну та сечової кислоти при фізіологічному рН у фосфатному буферному розчині. Даний датчик демонстрував відмінну селективність щодо виявлення тирозину за наявності більш високих концентрацій аскорбінової кислоти, дофаміну та сечової кислоти. Межі чутливості та виявлення становлять $1,05 \text{ мкА/см}^2 / \text{мкМ}$ і $0,57 \text{ мкМ}$ відповідно. Датчик демонстрував відмінну стабільність і відтворюваність.

Китайські вчені [63] з'ясували, що безпосередньо електрохімічно відновлений оксид графену (ЕВОГ), який був отриманий потенціостатичним відновленням відшаровуваних графен-оксидних листів на склоподібному вуглецевому електроді, виявив значно покращену вольтаметричну реакцію на амінокислоти L-триптофан і L-тирозин, порівняно з модифікованим хімічно відновленим оксидом графену. Електрод з ЕВОГ показав хорошу відтворюваність і був використаний для визначення тирозину з лінійними діапазонами $0,5\text{--}80,0 \text{ моль/л}$, межі виявлення $0,2 \text{ моль/л}$. Отже, за допомогою цього модифікованого електрода можна виявити тирозин з високою чутливістю, низькою межею виявлення та хорошою відтворюваністю.

Технологія виділення та очищення тирозину включає відділення біомаси центрифугуванням або фільтруванням, та очищення тирозину кристалізацією [64-65].

Після біосинтезу L-тирозин виділяють фільтруванням. Для очищення L-тирозину осад тирозину суспендують у воді і змішують з 10 н НСІ , поки частинки L-тирозину не розчиняться повністю. Далі розчин витримують на льоду протягом 1 години та фільтрують щоб видалити білкові агрегати. Потім фільтрат збирають і поступово титрують до рН $7,0$ аміачною водою ($25\text{--}28\%$). Після цього частинки L-тирозину, що виділилися під час титрування аміаком, відновлюють фільтруванням, двічі промивають крижаною водою і сушать при $60 \text{ }^\circ\text{C}$, після чого ще раз промивають етанолом. Нарешті, очищений L-тирозин перекристалізують або

шляхом зміни температури або додаванням аміаку. Вихід тирозину при даному методі очистки становив 70-75%, а чистота - $98 \pm 0,5\%$ [64].

Ще один метод виділення тирозину полягає у тому, що тирозин відокремлюють від біомаси за допомогою селективного центрифугування при 5630 об/хв. Перед центрифугуванням біомасу інактивують шляхом підвищення рН до 10,5. Потім рН знижують до 8-9. Далі здійснюють мембранну фільтрацію для відділення залишків біомаси від розчиненого тирозину. Отриманий пермеат, що містить тирозин при рН 11,5, повільно підкислюють 40–50% розчином сірчаної кислоти до рН 9,0, при цьому відбувається кристалізація тирозину. Швидкість додавання кислоти - в межах 1–5 мл/хв на літр об'єму. Кристали тирозину відновлювали фільтруванням. Вихід тирозину з використанням даного способу очищення становить 86% [65].

Додатковою стадією очистки може бути розділення енантіометрів тирозину, щоб отримати чистий L-тирозин. Індійські вчені на чолі з Gogoi [66] продемонстрували стратегію розділення енантіомерів тирозину з використанням одномісних вуглецевих нанотрубок (ОВНТ) за допомогою простої ковалентної функціоналізації. Ковалентну функціоналізацію ініціювали на поверхні ОВНТ шляхом включення групи COOH з подальшим хлоруванням і амідуванням, використовуючи D-триптофан як хоральний зонд. Встановлено, що при обробці рацемічної суміші тирозину на мембрані, D-ізомер переважно адсорбувався на мембрані, тоді як L-ізомер вибірково транспортувався через неї. Отримували вихід енантіомеру до 98,86% при оптимізованих умовах, що включають концентрацію ОВНТ 0,2% в мембрані, робочий тиск 4 бар, робоча температура 35 °C.

Отже, за допомогою наведених методів можна отримати L-тирозин з високим ступенем чистоти та з невисокими втратами (до 30%).

Таким чином, L-тирозин широко використовується у медицині та сільському господарстві, а також для виробництва інших лікарських речовин, тому виробництво тирозину є дуже актуальним. Розробка продуцентів тирозину, здатних до синтезу підвищених концентрацій тирозину, здійснюється шляхом генної інженерії. Методи очищення тирозину дозволяють отримати дану амінокислоту з

високим ступенем чистоти. Зважаючи на це, створення технології промислового виробництва тирозину є дуже перспективним.

РОЗДІЛ 2. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

2.1. Потреба у цільовому продукті

L-тирозин як лікарський засіб сприяє підвищенню настрою, так як є попередником нейромедіаторів норадреналіну і дофаміну, отже може застосовуватися для профілактики депресії[5].

Тирозин важливий і для роботи ендокринної системи, оскільки він бере участь у виробництві гормонів щитовидної залози, тобто нормалізує її роботу, покращує функції надниркових, щитовидної залози і гіпофізу [67]. Також L-тирозин є важливим для попередження хвороби Паркінсона [7].

Препарати, що містять тирозин, випускаються у вигляді капсул (табл. 2.1).

Таблиця 2.1

Препарати, що містять L-тирозин

Торгова назва	Форма випуску	Вміст тирозину	Виробник	Джерело
L-тирозин	Капсули	400 мг	Еліт-фарм, Україна	[1]
L-тирозин	Капсули	500 мг	Solgar, США	[2]
Віта-тирозин	Капсули	400 мг	Vitaline, США	[3]
L-тирозин	Капсули	500 мг	Now Foods, США	[4]
Йодин Тирозин	Капсули	500 мг	Lek, Словенія	[5]

*Примітка: 1 - https://www.medtechnika.com.ua/l-tirozin-50-kapsul.html?gclid=EA1aIQobChMIxuCxjP_T6AIVnMqyCh2IowKdEAQYASABEGl9BfD_BwE, 2 - <https://biovit.com.ua/l-tirozin/l-tirozin-500-mg-50-kapsul>, 3 - http://vitaline.ru/bads/products/vita_tyrosine.html, 4 - https://fitomarket.ru/catalog/vitaminy_i_mineraly/aminokisloty_1/l_tirozin/l_tirozin_500_mg_120_kapsul_now/, 5 - <https://www.add.ua/jodin-tirozin-kapsuly-60.html>

Для розрахунків приймемо, що вміст тирозину в 1 капсулі складає 400 мг. L-тирозин рекомендують приймати по 1 капсулі 3 рази на добу. Курс прийому становить 3-4 тижні [67].

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 2. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ		
Розроб.	Світлична В.О.				Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.	Красінько В.О.					41	6
Консультант					Кафедра БТМ 41		
Н. Контр.							
Затверд.	Пирог Т.П.						

L-тирозин переважно застосовується для лікування та профілактики захворювань щитоподібної залози, депресивних розладів та хвороби Паркінсона.

За даними МОЗ України у структурі ендокринних захворювань патологія щитоподібної залози складає 47,3 % [6]. Загальна кількість хворих на хвороби ендокринної системи, розладу харчування, порушення обміну речовин складає 928 на 100 000 населення [68]. Отже, кількість хворих на хвороби щитоподібної залози складає:

$$928 - 100\%$$

$$X - 47,3\%$$

$$X = 47,3 \times 928 / 100 = 439 \text{ чол. на } 100\ 000 \text{ населення.}$$

Населення України становить 42 220 000 чоловік, отже, кількість хворих становить:

$$439 \text{ чол} - 100\ 000 \text{ населення}$$

$$x - 42\ 220\ 000 \text{ населення}$$

$$x = 42220000 \times 439 / 100000 = 185346 \text{ чоловік.}$$

Згідно з статистикою МОЗ України в Україні зареєстровано 23874 хворих на хворобу Паркінсона [69]. На депресивні розлади в Україні страждає 481 763 особи [70].

Отже, сумарна кількість хворих в Україні на захворювання щитоподібної залози, депресивні розлади та хворобу Паркінсона складає $185346 + 23874 + 481763 = 690983$ чоловік.

Узагальнюючі дані щодо потреби в тирозині в Україні наведені у *табл. 2.2*.

Таблиця 2.2

Вихідні дані для розрахунку річної потреби в L-тирозині

Доза препарату на добу, мг тирозину	Тривалість прийому, днів	Кількість препарату на 1 людину, мг тирозину	Загальна кількість хворих	Загальна кількість тирозину на всіх хворих, мг
1200 (3 капсули)	25	30000	690983	20729490000

2.2. Розрахунок потужності виробництва

Загальна кількість тирозину на всіх хворих становить $20729490000 \text{ мг} = 20729490 \text{ г} = 20729,49 \text{ кг}$

Так як на ринку фармацевтичних препаратів існує багато засобів, що містять L-тирозин, то прийmemo, що частка власного виробництва – 20%.
 $G_{\text{гп}} = 20729,49 \times 0,2 = 4145,9 \text{ кг}$

Знаючи синтезувальну здатність продуцента, можемо розрахувати кількість культуральної рідини, яку необхідно одержати, щоб забезпечити на рік населення України лікарським препаратом, що містить L-тирозин:

При вирощуванні культури *E. coli* ВТУ2.13 отримуємо концентрацію тирозину, яка складає $43,14 \text{ г/л}$ [57].

Отже для отримання $4145,9 \text{ кг}$ (4145900 г) необхідно:

$V_{\text{кр}} = 4145900 / 43,14 = 96103,4 \text{ л}$ культуральної рідини

2.3. Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера

Річна потреба тирозину складає $G_{\text{гп}} = 4145,9 \text{ кг}$.

Приймаємо кількість робочих трудоднів (Трд) 250, тоді кількість продукту за цикл становить:

$G_{\text{цк}} = G_{\text{нт}} \times T_{\text{цф}} / 24 \times \text{Трд} = 4145,9 \times 88,5 / 24 \times 250 = 61,15 \text{ кг/цикл}$

де $T_{\text{цф}}$ – цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу (80 год) та час підготовки ферментера до роботи. Підготовка ферментера включає: миття та огляд (1,5 год), перевірка на герметичність (1,5 год), підігрів апарату (0,5 год), стерилізація апарату (1 год), охолодження апарату (1 год), завантаження середовища (1,5 год), засів (0,5 год), вивантаження культуральної рідини (1 год).

Отже, $T_{\text{цф}} = 80 + 1,5 + 1,5 + 0,5 + 1 + 1 + 1,5 + 0,5 + 1 = 88,5 \text{ год}$

Кількість циклів: $N_{\text{ц}} = G_{\text{нт}} / G_{\text{цк}} = 4145,9 / 61,15 = 67,79 = 68$

K_1 – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій. Приймаємо $K_1 = 1,1$.

Враховуючи частку сухих речовин в готовому продукті, яка складає 0,95, та втрати при виділенні (25%), об'єм культуральної рідини складатиме:

$$V_{кр} = K1 \cdot G_{цк} \cdot C_{гп} / R_{кр}(1 - E_{св}) = 1,1 \cdot 61,15 \cdot 0,95 / 43,14 \cdot (1 - 0,25) = 1,975 \text{ м}^3/\text{цикл}$$

При одержанні культуральної рідини потрібно врахувати її втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять 15% (Eф).

Отже, кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом становитиме:

$$V_{цк} = V_{кр} / (1 - E_{ф}) = 1,975 / (1 - 0,15) = 2,324 \text{ м}^3$$

2,324 м³ культуральної рідини (V_{цк}) можна отримати у ферментері, геометричний об'єм якого має становити:

$$V_{г} = V_{цк} / K_{зап} = 2,324 / 0,6 = 3,87 \text{ м}^3,$$

де K_{зап} = 0,6 – коефіцієнт заповнення.

Знаходимо найближчий за геометричний об'ємом ферментер V_ф = 4 м³.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_{зап} = V_{цк} / V_{ф} = 2,324 / 4 = 0,581, \text{ що не перевищує заданого значення.}$$

2.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

Виробничий біосинтез тирозину здійснюватиметься у ферментері з геометричним об'ємом V_ф = 4 м³.

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

Тоді кількість поживного середовища в ферментері буде становити:

$$V_{пс1} = V_{роб1} / (1 + X_{ф}) = 2,324 / (1 + 0,1) = 2,113 \text{ м}^3,$$

де X_ф = 0,1 – доза посівного матеріалу.

Кількість посівного матеріалу становить $V_{пм1} = V_{роб1} - V_{пс1} = 2,324 - 2,113 = 0,211 \text{ м}^3 = 211 \text{ л}$

Для одержання 0,211 м³ інокуляту в посівному апараті враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять 10%.

Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становитиме:

$$V_{\text{роб}2} = V_{\text{пм}1} / (1 - E_{\text{па}}) = 0,211 / (1 - 0,10) = 0,234 \text{ м}^3 = 234 \text{ л.}$$

Кількість інокуляту $V_{\text{роб}2}$ можна одержати під час культивування продуцента у посівному апараті геометричним об'ємом $V_{\text{па}2} = V_{\text{роб}2} / K_{\text{зап}} = 0,234 / 0,6 = 0,39 \text{ м}^3$. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{сф}} = 0,4 \text{ м}^3$. Уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{31} = V_{\text{роб}2} / V_{\text{сф}} = 0,234 / 0,4 = 0,585.$$

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

Тоді кількість поживного середовища в інокуляторі буде становити:

$$V_{\text{пс}2} = V_{\text{роб}2} / (1 + X_{\text{па}}) = 0,234 / (1 + 0,1) = 0,213 \text{ м}^3,$$

де $X_{\text{па}} = 0,1$ – доза посівного матеріалу.

Кількість посівного матеріалу становить $V_{\text{пм}2} = V_{\text{роб}2} - V_{\text{пс}2} = 0,234 - 0,213 = 0,021 \text{ м}^3 = 21 \text{ л.}$

Для одержання 21 л посівного матеріалу в інокуляторі враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять 10%.

Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу в інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{роб}3} = V_{\text{пм}2} / (1 - E_{\text{ін}}) = 21 / (1 - 0,10) = 23,3 \text{ л.}$$

Кількість інокуляту $V_{\text{роб}3}$ можна одержати під час культивування у інокуляторі геометричним об'ємом $V_{\text{ін}3} = V_{\text{роб}3} / K_{\text{зап}} = 23,3 / 0,6 = 38,8 \text{ л.}$ Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{сф}} = 40 \text{ л.}$ Уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{31} = V_{\text{роб}3} / V_{\text{сф}} = 23,3 / 40 = 0,583.$$

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

Тоді кількість поживного середовища в інокуляторі буде становити:

$$V_{\text{пс}3} = V_{\text{роб}3} / (1 + X_{\text{ін}}) = 23,3 / (1 + 0,1) = 21,2 \text{ л,}$$

де $X_{\text{ін}} = 0,1$ – доза посівного матеріалу.

Кількість посівного матеріалу становить $V_{\text{пм}3} = V_{\text{роб}3} - V_{\text{пс}3} = 23,3 - 21,2 = 2,1 \text{ л.}$

Кількість інокуляту для засіву інокулятора $V_{\text{пмз}}=2,1$ л можна одержати культивуванням продуценту у колбах на качалці. Для цього використовують качалочці колби об'ємом $V_{\text{колб}}=750$ мл та коефіцієнтом заповнення $K_{\text{зк}}=0,2$.

Тоді кількість колб для одержання посівного матеріалу становить:

$$N_{\text{колб}} = V_{\text{пмз}} / (V_{\text{колб}} \cdot K_{\text{зк}}) = 2100 / 750 \cdot 0,2 = 14$$

Таким чином, для одержання посівного матеріалу необхідно 14 качалочних колб.

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу L-тирозину у ферментері об'ємом 4 м^3 з коефіцієнтом заповнення 0,6 буде проходити у 3 етапи. Приймаємо до встановлення один ферментер об'ємом 4 м^3 , один посівний апарат об'ємом $0,4 \text{ м}^3$, один інокулятор об'ємом 40 л.

РОЗДІЛ 3. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ СУБСТАНЦІЇ L-ТИРОЗИНУ ТА ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА ЛЗ

3.1. Обґрунтування вибору біологічного агента, поживного середовища для його культивування

Для біосинтезу тирозину зазвичай використовують генно інженерні штами *Escherichia coli*, оскільки вони дозволяють отримати досить високий вихід тирозину.

Для підтримки плазмідів продуцентів в поживні середовища додають антибіотики (найчастіше, канаміцин, ампіцилін, хлорамфенікол). Також у середовища для культивування додають амінокислоти, якщо продуценти є ауксотрофними мутантами (наприклад, за фенілаланіном). Також можуть додаватися індуктори ферментів на шляху біосинтезу тирозину (наприклад, ізопропіл- β -D-тіогалактопіранозид).

Здебільшого накопичення біомаси продуцента та біосинтез тирозину здійснюють на різних поживних середовищах.

Встановлено здатність до синтезу тирозину з ацетату. Використовуючи інженерний штам *E. coli* SCK-APG4 з оптимізованим шляхом біосинтезу (в тому числі максимізації використання вуглецю для катаболізму ацетату та синтезу тирозину, а також оптимізації гліоконеогенезу та гліюксилатного циклу), використовуючи синтетичні промотори та 5'-нетрансльовані регіони (UTR), можна отримати 0,7 г/л тирозину [58].

Для отримання L-тирозину, гени TPL (тирозин фенол-ліази - ферменту, що каталізує оборотне розщеплення L-тирозину до пірувату, фенолу та аміаку) з бактерій *Citrobacter freundii* (CfTPL), *Erwinia herbicola* (EhTPL) та *Rhodobacter capsulatus* (TutA) були кодон-оптимізовані та надмірно експресовані в *E. coli* BL21. У середовище для біосинтезу тирозину додають фенол, піруват натрію та амоній хлорид, які трансформуються у тирозин за допомогою ферменту тирозин фенол-

					НУХТ БТЕК 02.02.12 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Світлична В.О.			РОЗДІЛ 3. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ СУБСТАНЦІЇ L- ТИРОЗИНУ ТА ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА ЛЗ	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Красінько В.О.					47	86
Консультант						Кафедра БТМ 47		
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

ліази. За допомогою даного методу був отриманий вихід тирозину у 3 рази більший, ніж у штаму CfTPL. Максимальний вихід тирозину становив 48,5 г/л [1].

Також було розроблено біосинтетичний шлях для отримання L-тирозину за допомогою штаму *E. coli*MG1655 шляхом кодування ферментів, що перетворюють еритрозо-4-фосфат (E4P) і фосфоенолпірувату (PEP) в L-тирозин, на двох плазмідах. Внаслідок генетичних модифікацій збільшився вихід шикімату. Шикіматна конверсія в L-тирозин була покращена за рахунок заміщення шикіматкінази AroK на її ізофермент AroL. Ці модифікації біосинтетичного шляху дозволили збільшити синтез тирозину до 2 г/л [56].

За допомогою використання транскрипційної інженерії, вдалося створити три штами з двох окремих бібліотек мутагенезу (*groA* і *groD*), які виявили збільшення синтезу L-тирозину на 114%, в порівнянні з батьківським штамом, що мав високу продуктивність синтезу тирозину. Ізопропіл- β -D-тіогалактопіранозид додавали для індукції гену pCL1920 :: *tyrAfbraroGfbr*. Також додавали L-фенілаланін, так як продуцент є ауксотрофом за фенілаланіном. Культивування даного штаму *E. coli*RpoA14R у середовищі R при додаванні підживлювального розчину дало можливість отримання L-тирозину у концентрації 13,8 г/л за 36 год [7].

Використовуючи стійкі до інгібування за типом зворотного зв'язку гени *aroG* та *tyrA* як початкові мішені для надмірної експресії тирозину, які кодують 3-дезоксид-7-фосфогептулонатсинтазу та хоризматмутазу/префенатдегідрогеназу відповідно, різні комбінації генів були надмірно експресовані у штамі *E. coli* дикого типу та штамів, у яких видаляли ген *tyrR*. Штам *E. coli* ВТУ2.13, що надмірно експресує вищезгадані гени, разом з видаленням транспортеру L-тирозину *tyrR* продукував 43,14 г/л L-тирозину [57].

У табл. 3.1 представлено порівняльну характеристику особливостей одержання L-тирозину з використанням різних штамів *E. coli*.

Таблиця 3.1

Порівняльна характеристика складу поживного середовища та умов культивування продуцентів тирозину

Біологічний агент	Склад поживного середовища, г/л	Тривалість культивування, год	Особливості процесу біосинтезу	Концентрація тирозину, г/л	Література
<i>E. coli</i> SCK-APG4	<p>Середовище №1:</p> <ul style="list-style-type: none"> • ацетат – 5; • MgSO₄·7H₂O – 0,5; • NH₄Cl – 2; • NaCl – 1; • дріжджовий екстракт - 2; • 100 мМ калій фосфатний буфер; • стрептоміцин - 50 мкг/мл, • канаміцин - 50 мкг/мл, • ампіцилін - 100 мкг/мл <p>Середовище №2:</p> <ul style="list-style-type: none"> • ацетат - 10; • MgSO₄·7H₂O – 0,5; • NH₄Cl – 2; • NaCl – 1; • дріжджовий екстракт - 2; • 100 мМ калій фосфатний буфер; • стрептоміцин - 50 мкг/мл, • канаміцин - 50 мкг/мл, • ампіцилін - 100 мкг/мл 	42	37 °С, 200 об/хв., рН 6.5–6.8, середовище №1 використовуються для накопичення біомаси, середовище №2 – для біосинтезу тирозину.	0,7	Jo M., Noh M.H., Lim H.G., Kang C.W., et. al. Precise tuning of the glyoxylate cycle in <i>Escherichia coli</i> for efficient tyrosine production from acetate. <i>Microb. Cell Fact.</i> 2019; 18(1): 57.doi: 10.1186/s12934-019-1106-0.
<i>E. coli</i> MG1655	<ul style="list-style-type: none"> • Глюкоза - 5; • 10 мл 0,132 М(23 г/л) розчину К₂НРО₄ • 100 млМОРS буферу; • розчин тіаміну 1 мг/мл – 0,1 мл; • Карбеніцилін - 100 мкг/мл; • Хлорамфенікол - 30 мкг/мл, • канаміцин – 50 мкг/мл; • 50мкМ - 1 мМ (0,125 г/л) ПТТГ 	48	37°С, 200 об/хв.	2,169	Juminaga D., Baidoo E.E., Redding-Johanson A.M., Batth T.S., et. al. Modular engineering of L-tyrosine production in <i>Escherichia coli</i> . <i>Appl. Environ. Microbiol.</i> 2012; 78(1): 89-98. doi:10.1128/AEM.06017-11

<i>E. coli</i> BL21	<p>Середовище №1 (Лурія-Бертані):</p> <ul style="list-style-type: none"> • NaCl – 10; • дріжджовий екстракт - 5; • триптон – 10; • канаміцин - 50 мкг/мл; <p>Середовище №2:</p> <ul style="list-style-type: none"> - дріжджовий екстракт - 24; - триптон – 12; - KH_2PO_4 – 17 мМ (2,3 г/л); - K_2HPO_4 – 72 мМ (12,5 г/л); - гліцерин – 4; - канаміцин - 50 мкг/мл; <p>Середовище №3:</p> <ul style="list-style-type: none"> - піруват натрію – 0,1 М (11 г/л); - фенол – 0,1 М (9,4 г/л); - амоній хлорид – 0,3 М (16 г/л); - Тритон-Х 100 - 2. <p>Підживлювальний розчин:</p> <ul style="list-style-type: none"> - піруват натрію – 0,1 М (11 г/л); - фенол – 0,1 М (9,4 г/л); - амоній хлорид – 0,3 М (16 г/л). 	31,5	<p>37 °С, 220 об/хв, у середовищі №1 протягом 12 годин - для накопичення біомаси,</p> <p>середовище №2 протягом 14 годин – для експресії ферменту тирозин фенол ліази,</p> <p>середовище №3 – для біотрансформації (40 °С, рН 8, 5,5 годин).</p> <p>Підживлювальний розчин додається через 1 годину після початку біосинтезу 3 рази кожні 1,5 години.</p>	48,5	<p>Xu S., Zhang Y., Li Y., Xia X., et. al. Production of L-tyrosine using tyrosine phenol-lyase by whole cell biotransformation approach. <i>Enzyme Microb. Technol.</i> 2019; 131: 109430. doi: 10.1016/j.enzmictec.2019.109430</p>
---------------------	--	------	---	------	--

<p><i>E. coli</i>RpoA14 R</p>	<p>Середовище №1 (Лурія-Бертані):</p> <ul style="list-style-type: none"> • NaCl – 10; • дріжджовий екстракт - 5; • триптон – 10; • канаміцин - 50 мкг/мл; <p>Середовище №2 (R середовище):</p> <ul style="list-style-type: none"> - KH_2PO_4 – 13,3; - $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – 4; - Лимонна кислота – 1,7; - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 1,2; - розчин мікроелементів – 10 мл; - тіаміну хлорид – 4,5 мг; - глюкоза – 27,5; - фенілаланін – 0,5; - хлорамфенікол - 68 мкл/мл. <p>Підживлювальний розчин:</p> <ul style="list-style-type: none"> - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 19,7; - глюкоза – 770; - NH_3 – 25 % (250 мл). <p>Розчин мікроелементів:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Fe цитрат – 6; - $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 1,5; - $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,8; - H_3BO_3 – 0,3; - $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,25; - $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,25; - $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,15; - етилен-динітрило-тетраоцтової кислоти натрієва сіль $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,84. 	48	<p>Середовища №1 (37 °C, 225 об/хв, 12 год) – для накопичення біомаси.</p> <p>Середовище №2 (37 °C, pH 7, 100-1000 об/хв., розчинний кисень – 25%, 36 год) – для біосинтезу тирозину, процес з підживленням</p>	13,8	<p>Santos C.N.S., Xiao W., Stephanopoulos G. Rational, combinatorial, and genomic approaches for engineering L-tyrosine production in <i>Escherichia coli</i>. <i>Proc. Natl. Acad. Sci.</i> 2012; 109 (34): 13538-13543. doi:10.1073/pnas.1206346109</p>
<p><i>E. coli</i> ВТУ2.13</p>	<p>Середовище №1:</p> <ul style="list-style-type: none"> - дріжджовий екстракт - 24; - триптон – 12; - KH_2PO_4 – 17 мМ (2,3 г/л); - K_2HPO_4 – 72 мМ (12,5 г/л); - глюкоза – 10. 	96	<p>Розмноження клітин здійснюється у середовищі №1 протягом 2-6 годин, при 37 °C, 200 об/хв</p>	43,14	<p>Kim B., Binkley R., Kim H.U., Lee S.Y. Metabolic engineering of <i>Escherichia coli</i> for the enhanced production of</p>

<p><i>E. coli</i> BTY2.13</p>	<p>Середовище №2:</p> <ul style="list-style-type: none"> - KH_2PO_4 – 6,67; - $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – 4; - лимонна кислота – 0,8; - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 15; - глюкоза – 30; - дріжджовий екстракт – 3; - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,8; - розчин мікроелементів – 5 мл; - 3-(N-морфоліно) пропансульфонова кислота - 25 мМ (5,2 г/л); - канаміцин – 100 мкг/мл. <p>Середовище №3:</p> <ul style="list-style-type: none"> - KH_2PO_4 – 3; - K_2HPO_4 – 7,33; - лимонна кислота – 0,85; - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 15; - глюкоза – 20; - дріжджовий екстракт – 5; - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,8; - розчин мікроелементів – 5 мл - ізопропіл-D-тіоґалактопіранозид - 1мМ (0,238 г/л); - канаміцин – 100 мкг/мл. <p>Підживлювальний розчин:</p> <ul style="list-style-type: none"> - глюкоза – 700; - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 9; - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 73; - дріжджовий екстракт – 5; - розчин мікроелементів – 15; - 35% HCl – 1 мл <p>Розчин мікроелементів:</p> <ul style="list-style-type: none"> - $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 10; - CaCl_2 – 1,35; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 2,2; - $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,58; - $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 1; - $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; - $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ – 0,2; 35% HCl – 10 мл. 		<p>Накопичення біомаси здійснюється у середовищі №2 протягом 12 годин, при 37 °С, 200 об/хв, рН 6,8.</p> <p>Біосинтез тирозину – у середовищі №3 - протягом 80 годин, при 37 °С, 500-1000 об/хв, розчинний кисень 40%, рН 6,95.</p> <p>Процес біосинтезу здійснюється з підживленням</p>	<p>l-tyrosine. <i>Biotechnol. Bioeng.</i> 2018; 115(10): 2554-2564. doi: 10.1002/bit.26797</p>
-----------------------------------	--	--	--	--

Найголовнішим критерієм при виборі біологічного агента є його здатність рости на найбільш дешевих поживних середовищах.

Тому наступний етап вибору продуцента включає розрахунок та порівняння вартості поживного середовища для культивування продуцентів, що здатні до синтезу тирозину у більших концентраціях (табл. 3.2).

Таблиця 3.2

Вартість компонентів поживного середовища для культивування продуцентів тирозину

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонент а, грн./кг	Вартість компонента (грн.) на 1 л середовища	Джерело інформації*
<i>E. coli</i> BL21	Середовище №1 (Лурія-Бертані):			
	дріжджовий екстракт, 5	483	2,415	2
	триптон, 10	1520	15,2	2
	хлорид натрію, 10	14,2	0,142	3
	канаміцин - 50 мкг/мл - 0,05 г/л	15050	0,7525	7
	Вартість 1 л середовища – 18,5			
	Середовище №2			
	дріжджовий екстракт, 24	483	11,592	2
	Триптон, 12	1520	18,24	2
	КН ₂ РО ₄ , 2,3	120	0,276	4
	К ₂ НРО ₄ , 12,5	150	1,875	5
	Гліцерин, 4	21,85	0,087	6
	Канаміцин, 50 мкг/мл - 0,05 г/л	15050	0,7525	7
	Вартість 1 л середовища – 32,8			
	Середовище №3			
	піруват натрію, 11	15600	171,6	8
	Фенол, 9,4	450	4,23	9
	амоній хлорид, 16	40	0,64	10
	Тритон-Х 100, 2	2364	4,728	12
	Вартість 1 л середовища – 181,2			
	Підживлювальний розчин			
	піруват натрію, 11	15600	171,6	8
	Фенол, 9,4	450	4,23	9
	амоній хлорид, 16	40	0,64	10
	Вартість 1 л розчину – 176,5			
	Сумарна вартість – 409 грн			

<i>E. coli</i> RpoA14R	Середовище №1 (Лурія-Бертані):			
	NaCl, 10	14,2	0,142	3
	дріжджовий екстракт, 5	483	2,415	2
	триптон, 10	1520	15,2	2
	канаміцин, 50 мкг/мл - 0,05 г/л	15050	0,7525	7
	Вартість 1 л середовища – 18,5			
	Середовище №2 (R середовище):			
	КН ₂ РО ₄ , 13,3;	120	1,596	4
	(NH ₄) ₂ НРО ₄ , 4;	143	0,572	20
	Лимонна кислота, 1,7;	50	0,085	19
	MgSO ₄ *7H ₂ O, 1,2;	10,2	0,012	21
	розчин мікроелементів, 10 мл;	49	0,49	розраховано
	тіаміну хлорид, 4,5 мг = 0,0045 г	1750	0,008	11
	Глюкоза, 27,5;	34	0,935	1
	Фенілаланін, 0,5;	2603	1,302	17
	Хлорамфенікол, 68 мкл/мл. = 0,068 г/л	1390	0,095	14
	Вартість 1 л середовища – 5,1			
	Підживлювальний розчин			
	MgSO ₄ *7H ₂ O, 19,7	10,2	0,201	21
	глюкоза, 770	34	26,18	1
	NH ₃ – 25 % (250 мл)	6	1,5	13
	Вартість 1 л розчину – 27,88			
	Розчин мікроелементів:			
	Fe цитрат, 6	7950	47,7	15
	MnCl ₂ *4H ₂ O, 1,5;	122	0,183	31
	Zn(CH ₃ COO) ₂ *2H ₂ O, 0,8	761	0,609	32
	H ₃ BO ₃ , 0,3	36	0,011	33
	Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O, 0,25	802	0,2	34
	CoCl ₂ *6H ₂ O, 0,25	640	0,16	35
	CuCl ₂ *2H ₂ O, 0,15	116	0,017	36
	етилен-динітрило-тетраоцтової кислоти натрієва сіль *2H ₂ O, 0,84.	150	0,126	37
	Вартість 1 л розчину – 49			
Сумарна вартість – 51,48				
<i>E. coli</i> ВТУ2.13	Середовище №1			
	дріжджовий екстракт, 24	483	11,592	2
	Триптон, 12	1520	18,24	2
	КН ₂ РО ₄ , 2,3	120	0,276	4
	К ₂ НРО ₄ , 12,5	150	1,875	5
	Глюкоза, 10	34	0,34	1
	Вартість 1 л середовища – 32,3			
	Середовище №2			
	КН ₂ РО ₄ , 6,67	120	0,8	4
	(NH ₄) ₂ НРО ₄ , 4	143	0,572	20
	лимонна кислота, 0,8	50	0,04	19
(NH ₄) ₂ SO ₄ , 15	20	0,3	18	
глюкоза, 30	34	1,02	1	

дріжджовий екстракт, 3	483	1,45	2
MgSO ₄ *7H ₂ O, 0,8	10,2	0,008	21
3-(N-морфоліно) пропансульфонова кислота, 5,2	8753	45,516	22
канаміцин – 100 мкг/мл – 0,1 г/л	15050	1,505	7
розчин мікроелементів, 5 мл	3,03	0,015	розраховано
Вартість 1 л середовища – 51,2			
Середовище №3			
KH ₂ PO ₄ , 3	120	0,36	4
K ₂ HPO ₄ , 7,33	150	1,1	5
лимонна кислота, 0,85	50	0,043	19
(NH ₄) ₂ SO ₄ , 15	20	0,3	18
глюкоза, 20	34	0,68	1
дріжджовий екстракт, 5	483	2,415	2
MgSO ₄ *7H ₂ O, 0,8	10,2	0,008	21
канаміцин – 100 мкг/мл – 0,1 г/л	15050	1,505	7
ізопропіл-D-тіоґалактопіранозид, 0,238	101250	24,1	16
розчин мікроелементів, 5 мл	3,03	0,015	розраховано
Вартість 1 л середовища – 30,5			
Підживлювальний розчин			
Глюкоза, 700	34	23,8	1
MgSO ₄ *7H ₂ O,9	10,2	0,092	21
(NH ₄) ₂ SO ₄ ,73	20	1,46	18
дріжджовий екстракт, 5	483	2,415	2
розчин мікроелементів,15	3,03	0,045	розраховано
35% HCl – 1 мл	200	0,2	30
Вартість 1 л розчину – 28			
Розчин мікроелементів			
FeSO ₄ * 7H ₂ O, 10	20	0,2	23
CaCl ₂ , 1,35	35	0,047	24
ZnSO ₄ * 7H ₂ O, 2,2	264	0,58	25
MnSO ₄ * 4H ₂ O, 0,58	40	0,023	26
CuSO ₄ * 5H ₂ O, 1	65	0,065	27
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ * 5H ₂ O, 0,1	1104	0,11	28
Na ₂ B ₄ O ₇ * 10H ₂ O, 0,2	30	0,006	29
35% HCl – 10 мл	200	2	30
Вартість 1 л розчину – 3,03			
Сумарна вартість – 142			

Примітка. * - Ціни наведено станом на листопад 2019. 1 - <https://prom.ua/p431752360-glyukoza-poroshok.html>, 2 - <https://www.dia-m.ru/news.php?newsid=56166>, 3 - <https://prom.ua/p942150766-natrij-hloristyj-farm.html>, 4 - <https://prom.ua/p151620028-kalij-fosfornokislyj-zameschennyj.html>, 5 - <https://prom.ua/p1058099172-kalij-fosfornokislyj-zameschennyj.html>, 6 - <https://prom.ua/p46475447-glitserin-pischevojpromyshlennyj.html>, 7 - <https://bzv.com.ua/ru/kyev/catalog/kanamitsin-poroshok-dlya->

[r-ra-din-po-10-g-vo-flak-1](https://prom.ua/p268710109-sodium-piruvate-sodium.html) 8 - <https://prom.ua/p268710109-sodium-piruvate-sodium.html> 9 - <https://prom.ua/p825776146-fenol-chda.html> , 10 - <https://prom.ua/p1064737444-ammonij-hloristyj-fasovka.html> 11 - <https://prom.ua/p415265819-vitamin.html> , 12 - <https://prom.ua/p987594099-triton-100-triton.html> 13 - <https://prom.ua/p1078248736-ammiak-vodnyj;wholesale.html> 14 - <https://prom.ua/p20416841-levomitsetin-substantsiya;wholesale.html> 15 - <https://lenreactiv-shop.ru/katalog-2/zhelezo-limonnokisloe-1-vodnoe-tsitrat-zheleza-iii-imp-0-1-kg/> , 16 - <https://www.diam.ru/reactive.php?productid=60590> 17 - <https://prom.ua/p734455919-fenilalanin-chda.html> 18 - <https://prom.ua/p740948265-sulfat-ammoniya-ammoniumsulphate.html> 19 - <https://prom.ua/p1033350033-limonnaya-kislota-fasovka.html> 20 - <https://samovarim.org/products/ammonii-fosfornokislyi-dvuzameschennyi-pischevoi-nh4-2hpo4-diammonii-fosfat-1kg> 21 - <https://prom.ua/p509526377-sulfat-magniya-mgso47h2o;wholesale.html> 22 - <http://www.paneco-ltd.ru/ru/0/pitatelnyie-sredyi-i-reagentyi-dlya-kultur-kletok/dobavki-k-sredam-i-reaktivy-kulturalnoy-chistoty/mops-3-n-morfolino-propansulfonovaya-kislota-2.html> 23 - <https://prom.ua/p610003424-zhelezo-sernokisloe-zheleznyj.html> 24 - <https://prom.ua/p654787023-kaltsij-hloristyj-hlorid.html> 25 - <https://prom.ua/p574122044-tsink-sernokislyj-znso47h2o.html> 26 - <https://ua.all.biz/marganec-sulfat-g16702518> 27 - <https://mes-group.prom.ua/p614510142-mednyj-kuporos-sulfat.html> 28 - <https://himik24.ru/product/ammoniy-molibdenovokislyy-nh46mo7o244h2o-ch> 29 - <https://cheboksary.flagma.ru/bura-na2b4o7-10h2o-o3914006.html> 30 - <https://prom.ua/p257852169-solyanaya-kislota-laboratornaya.html> , 31 - <https://himsale.prom.ua/p277934134-marganets-hloristyj-vodnyj.html> , 32 - <https://prom.ua/p734456739-tsink-uksusnokislyj-vodnyj.html> 33 - <https://prom.ua/p327049281-bornaya-kislota-h3bo3.html> , 34 - http://plasmotherm.ru/catalog/chemical/molibdenium/item_192.html , 35 - <https://prom.ua/p505512629-kobalt-hloristyj-vodnyj.html> , 36 - <https://prom.ua/p224065051-med-hloristaya.html> , 37 - <https://prom.ua/p917719676-trilon-etilendiamin-dinatrievaya.html>

Проаналізувавши дані *табл.3.2* можна зробити висновок, що середовище, яке використовується для культивування *E. coli*RpoA14R, вартість якого становить 51,48 грн, є приблизно у 3 рази дешевшим, ніж середовище для культивування *E. coli* ВТУ2.13, вартість якого 142 грн, а також більше ніж у 8 разів дешевше, ніж середовище для культивування *E. coli* BL21, вартість 1 л якого становить 409 грн.

Завершальний етап вибору продуцента тирозину полягає у розрахунку умовної вартості 1 г тирозину і кількості утвореного продукту за годину (*табл.3.3*).

Таблиця 3.3

Умовна вартість L-тироzinу

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища, грн	Концентрація тирозину, г/л	Умовна вартість 1 г тирозину, грн./ г	Тривалість культивування, год	Кількість утвореного тирозину за годину, г /год
<i>E. coli</i> ВТУ2.13 [57]	142	43,14	3,29	96	0,45
<i>E. coli</i> BL21 [1]	409	48,5	8,43	31,5	1,54
<i>E. coli</i> RpoA14R [7]	51,48	13,8	3,73	48	0,29

Отже, умовна вартість 1 г тирозину при культивуванні *E. coli* ВТУ2.13 є нижчою (3,29 грн/г) є меншою у порівнянні з умовною вартістю тирозину, одержаного культивуванням *E. coli* RpoA14R (3,73 грн/г), та більш ніж у 2 рази меншою, порівняно з умовною вартістю тирозину, одержаного за допомогою *E. coli* BL21 (8,43 грн/г). Проте продуктивність біосинтезу за допомогою штаму *E. coli* ВТУ2.13 є нижчою (0,45 г /год), ніж при культивуванні *E. coli* BL21 (1,54 г/год), та вищою, ніж при культивуванні *E. coli* RpoA14R (0,29 г/год).

Таким чином, найкращим біологічним агентом для виробництва L-тирозину є *E. coli* ВТУ2.13, оскільки умовна вартість 1 г тирозину при культивуванні даного продуцента є найменшою, а продуктивність біосинтезу також є відносно високою.

3.2. Обґрунтування вибору способу культивування та типу ферментера

Оптимальна температура для культивування *E. coli* ВТУ2.13 становить 37⁰С, рН, при якому проводиться культивування становить 6,95 [57]. Ці дані свідчать про те, що можливий ризик контамінації сторонніми мезофільними і нейтрофільними мікроорганізмами. Тому необхідно забезпечити асептичні умови біосинтезу шляхом стерилізації обладнання, поживного середовища, аераційного повітря, що подається у ферментер.

Культивування *E. coli* ВТУ2.13 проводиться глибинним способом, так як при поверхневому способі культивування неможливо забезпечити асептичні умови культивування.

Біосинтез тирозину здійснюється напівбезперервним способом з підживленням, [57], оскільки при цьому значно збільшується вихід тирозину.

Підживлення дає кілька переваг у порівнянні з періодичним і безперервним культивуванням. За допомогою підживлення концентрація субстратів, необхідних для отримання цільового продукту, не вичерпується. Утворення побічних продуктів, яке, як правило, пов'язане з присутністю високих концентрацій субстрату, також можна уникнути за допомогою обмеження концентрації субстрату на тому рівні, який необхідний виключно для отримання продукту [71].

Для запобігання піноутворенню під час культивування, додають піногасник ANTIFOAM 204 [57].

З точки зору конструктивних особливостей ферментери розрізняються способами підведення енергії і аерації середовища [72]:

- 1) ферментери з підведенням енергії до газової фази;
- 2) ферментери з підведенням енергії до рідкої фази;
- 3) ферментери з комбінованим підведенням енергії.

У ферментерах з підведенням енергії до газової фази аерація і перемішування субстрату відбувається стисненням повітрям.

До ферментерів з підведенням енергії до рідкої фази відносяться апарати, що складаються з циліндричного дифузора і мішалки з порожніми лопатями і валом. При обертанні мішалки створюється розрідження, яке призводить до підйому рідини в кільцевому зазорі між дифузорею і стінками апарату з подальшим її поверненням в дифузорею.

Ферментер з комбінованим підведенням енергії - циліндричний апарат, усередині якого розташована механічна мішалка і барботер. В апаратах цього типу підведення енергії до газової фази здійснюється для аерації, а до рідкої фази - для перемішування.

Так як для біосинтезу тирозину необхідна досить висока інтенсивність перемішування, то найдоцільніше буде обрати ферментер з комбінованим підведенням енергії, обладнаний механічною мішалкою та барботером.

Біосинтез тирозину посилюється при швидкості перемішування 500-1000 об/хв [57]. Таку швидкість перемішування можна забезпечити, використовуючи швидкісні турбінні мішалки [73].

При виборі типу ферментеру необхідно врахувати те, що *E. coli* є аеробом, тому обов'язковою вимогою для культивування є безперервна аерація поживного середовища. Аерація культуральної рідини забезпечується шляхом подачі стерильного стисненого повітря через барботер. Механічне перемішування і безперервна аерація створюють сприятливі умови для доступу поживних речовин і кисню до клітин продуцента [72].

Отже, біосинтез тирозину здійснюють з підживленням. Для культивування *E. coli* ВТУ2.13 найдоцільніше використовувати ферментер обладнаний барботером і мішалкою.

3.3. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища

Для початкового розмноження культури у колбах використовують середовище наступного складу (г/л) [57]:

Середовище №1:

- дріжджовий екстракт - 24;
- триптон – 12;
- KH_2PO_4 – 17 мМ (2,3 г/л);
- K_2HPO_4 – 72 мМ (12,5 г/л);
- глюкоза – 10.

Для отримання посівного матеріалу використовують середовище наведеного нижче складу (г/л) [57]:

Середовище №2:

- KH_2PO_4 – 6,67;
- $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – 4;
- лимонна кислота – 0,8;
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 15;
- глюкоза – 30;
- дріжджовий екстракт – 3;
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,8;
- розчин мікроелементів – 5 мл;
- 3-(N-морфоліно) пропансульфонова кислота - 25 мМ (5,2 г/л);
- канаміцин – 100 мкг/мл.

Біосинтез L-тироzinу здійснюють на поживному середовищі складу (г/л) [57]:

Середовище №3:

- KH_2PO_4 – 3;
- K_2HPO_4 – 7,33;
- лимонна кислота – 0,85;

- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 15;
- глюкоза – 20;
- дріжджовий екстракт – 5;
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,8;
- розчин мікроелементів – 5 мл
- ізопропіл-D-тіогалактопіранозид - 1 мМ (0,238 г/л);
- канаміцин – 100 мкг/мл.

Біосинтез здійснюють з підживленням. Склад **підживлювального розчину**

(г/л):

- глюкоза – 700;
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 9;
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 73;
- дріжджовий екстракт – 5;
- розчин мікроелементів – 15;
- 35% HCl – 1 мл

Розчин мікроелементів має наступний склад (г/л):

- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 10;
- CaCl_2 – 1,35;
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 2,2;
- $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,58;
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 1;
- $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,1;
- $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ – 0,2;
- 35% HCl – 10 мл.

3.3.1 Підготовка і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту у колбах на качалці

Для отримання посівного матеріалу у колбах на качалках потрібно 2,1 л середовища №2. Перед культивуванням колби засівають клітинами, розмноженими на середовищі №1 з розрахунку 2 мл посівного матеріалу на 50 мл середовища. Отже, для засіву 2,1 л середовища №2 необхідно:

2 мл – 50 мл

x – 2100 мл

$x = 2 \times 2100 / 50 \approx 85$ мл

Отже, потрібно приготувати 85 мл поживного середовища №1. Зважаючи на невеликий об'єм його стерилізація буде відбуватися у автоклаві.

Режим стерилізації компонентів поживних середовищ визначається за температурою їх розкладання.

Проаналізувавши склад поживного середовища, ділимо його на композиції в залежності від режиму стерилізації:

- композиція А: дріжджовий екстракт, триптон, глюкоза - режим стерилізації 112°C, 0,05 МПа, 30 хв.

- композиція Б: KH_2PO_4 , K_2HPO_4 - режим стерилізації 131°C, 0,15 МПа, 40 хв [74].

Далі необхідно приготувати 2,1 л середовища №2. Зважаючи на невеликий об'єм його стерилізація буде відбуватися у автоклаві.

Проаналізувавши склад поживного середовища, ділимо його на композиції в залежності від режиму стерилізації (фосфорні солі стерилізуються окремо, щоб запобігти утворенню осаду з солями магнію):

- композиція А: дріжджовий екстракт, глюкоза - режим стерилізації 112°C, 0,05 МПа, 30 хв.

- композиція Б: KH_2PO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ - режим стерилізації 131°C, 0,15 МПа, 40 хв

- композиція В - лимонна кислота, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3-(N-морфоліно) пропансульфонова кислота, розчин мікроелементів - режим стерилізації 131°C, 0,15 МПа, 40 хв.

Розчин мікроелементів необхідно підготувати попередньо.

Також окремо готується та стерилізується розчин антибіотику канаміцину за допомогою стерилізуючої фільтрації[75].

3.3.2. Підготовка і стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі

На другому етапі необхідно одержати 21,2 л поживного середовища. Для цього використовують інокулятор об'ємом 40 л. Підготовка інокуляту буде здійснюватися у середовищі №2. Стерилізація композиції В (лимонна кислота, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3-(N-морфоліно) пропансульфонова кислота, розчин мікроелементів) буде проходити безпосередньо в інокуляторі - режим стерилізації 131°C, 0,15 МПа, 40 хв.

Перед стерилізацією потрібно передбачити наявність збірника об'ємом 10 л для попереднього розчинення композиції.

- Композицію А - дріжджовий екстракт, глюкоза – стерилізують при 112°C, 0,05 МПа, 30 хв в збірнику об'ємом 10 л.

- Композицію Б - KH_2PO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ -стерилізують при 131°C, 0,15 МПа, 40 хв в збірнику об'ємом 10л.

Розчин мікроелементів необхідно підготувати попередньо.

Також окремо готується та стерилізується розчин антибіотику канаміцину за допомогою стерилізуючої фільтрації.

3.3.3. Підготовка і стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті

На третьому етапі необхідно одержати 213 л поживного середовища. Для цього використовують посівний апарат об'ємом 400 л. Підготовка інокуляту буде здійснюватися у середовищі №2. Стерилізація композиції В (лимонна кислота, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3-(N-морфоліно) пропансульфонова кислота, розчин мікроелементів) буде проходити безпосередньо в посівному апараті - режим стерилізації 131°C, 0,15 МПа, 40 хв.

Перед стерилізацією потрібно передбачити наявність збірника об'ємом 100 л для попереднього розчинення композиції.

- Композицію А - дріжджовий екстракт, глюкоза – стерилізують при 112°C, 0,05 МПа, 30 хв в збірнику об'ємом 100л.

- Композицію Б - KH_2PO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ - стерилізують при 131°C, 0,15 МПа, 40 хв в збірнику об'ємом 100 л.

Розчин мікроелементів необхідно підготувати попередньо.

Також окремо готується та стерилізується розчин антибіотику канаміцину за допомогою стерилізуючої фільтрації.

3.3.4. Приготування та стерилізація середовища для виробничого біосинтезу

На даному етапі необхідно приготувати 1056,5 л поживного середовища №3 (зважаючи на те, що початковий об'єм середовища становить 50% від загального об'єму (2,113 м³) поживного середовища для біосинтезу).

Проаналізувавши склад поживного середовища, ділимо його на композиції в залежності від режиму стерилізації (фосфорні солі стерилізуються окремо, щоб запобігти утворенню осаду з солями магнію):

- композиція А: дріжджовий екстракт, глюкоза - режим стерилізації 112°C, 0,05 МПа, 30 хв. Стерилізують у збірнику об'ємом 630 л.

- композиція Б: KH_2PO_4 , K_2HPO_4 - режим стерилізації 131°C, 0,15 МПа, 40 хв. Стерилізують у збірнику об'ємом 400 л.

- композиція В - лимонна кислота, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, розчин мікроелементів - режим стерилізації 131°C, 0,15 МПа, 40 хв. Стерилізація композиції В буде відбуватися безпосередньо у ферментері об'ємом 4 м³. Тому потрібно передбачити наявність збірника об'ємом 400 л для попереднього розчинення середовища.

Розчин мікроелементів необхідно підготувати попередньо.

Також окремо готується та стерилізується розчин антибіотику канаміцину за допомогою стерилізуючої фільтрації.

А також необхідно приготувати 1 М розчин ізопропіл-D-тіогалактопіранозиду, який стерилізується при 121°C протягом 15хв [76]. Подача ІПТГ здійснюється на 19-ту годину культивування. Концентрація ІПТГ у культуральній рідині повинна становити 0,238 г/л, тому для 2324 л культуральної рідини необхідно $2324 \cdot 0,238 = 533$ г ІПТГ. У 1 М розчині концентрація ІПТГ складає 238 г/л, отже, необхідно приготувати $533/238 = 2,24$ л 1 М розчину ІПТГ. Розчин готується та стерилізується у збірнику об'ємом 3 л.

3.3.5. Особливості підготовки допоміжних розчинів

Для підтримки рН на рівні 6,95 використовують **30% розчин NH_4OH** розрахунку 2 мл на 1 л середовища. Для 2113 л поживного середовища необхідно 4226 мл розчину NH_4OH . Розчин стерилізують в збірнику об'ємом 6 л при температурі 131 °С протягом 40 хв.

Для запобігання активного піноутворення додають **піногасник Antifoam 204** розрахунку 4 краплі на літр культуральної рідини. Тому для 2324 л культуральної рідини необхідно 9296 крапель (465 мл). Емульсія піногаснику Antifoam 204 використовується у готовому вигляді [77].

Також необхідно приготувати **підживлювальний розчин** (глюкоза – 700 г/л; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 9 г/л; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 73 г/л; дріжджовий екстракт – 5 г/л; розчин мікроелементів – 15 мл/л; 35% HCl – 1 мл/л).

Приймаємо, що об'єм підживлювального розчину становить 50% від загального об'єму поживного середовища для виробничого біосинтезу.

Тоді початковий об'єм поживного середовища для виробничого біосинтезу та об'єм підживлювального розчину становлять :

$$V = 2113/2 = 1056,5 \text{ л.}$$

Стерилізація підживлювального розчину буде здійснюватися у збірнику об'ємом 1,25 м³ при 112°С протягом 30 хв.

Для приготування поживних середовищ попередньо повинен бути приготований **розчин мікроелементів** (його концентрація у середовищах 5 мл/л, у підживлювальному розчині – 15 мл/л). Для 2,1 л середовища необхідно 10,5 мл розчину, для 21,2 л середовища – 106 мл, для 213 л – 1065 мл, для 1056,5 л – 5283 мл, для 1056,5 л підживлювального розчину – 15848 мл. Отже, загальний об'єм розчину мікроелементів, який необхідно приготувати складає $10,5 + 106 + 1065 + 5283 + 15848 = 22313 \text{ мл} = 22,3 \text{ л}$.

Розчин готується в окремому збірнику об'ємом 30 л.

Отже, стадії допоміжних робіт при біосинтезу тирозину включають:

- приготування розчину мікроелементів;
- приготування та стерилізацію 1 М розчину ізопропіл-D-тіоґалактопіранозиду;

- стерилізацію 30% розчину NH_4OH для підтримання рН;
- приготування та стерилізацію поживних середовищ;
- приготування та стерилізацію підживлювального розчину.

Додатково необхідно встановити 13 реакторів-змішувачів.

3.4. Обґрунтування стадій виділення і очищення L-тироzinу

При виділенні цільового продукту враховують властивості культуральної рідини, фізико-хімічні властивості продукту (термолабільність, стійкість до хімічних речовин), необхідний ступінь чистоти продукту, характер накопичення цільового продукту (всередині клітин продуцента або в культуральній рідині).

Виділення та очищення L-тироzinу – досить складний процес, оскільки дана амінокислота буде використовуватися у фармацевтичній промисловості, тому необхідний високий ступінь очистки тирозину.

Тирозин, що синтезується штамом *Escherichiacoli*ВТУ2.13, є екзометаболітом [57], тобто виділяється в культуральну рідину, тому не потрібно здійснювати виділення продукту із клітин продуцента.

Тирозин – термостабільна амінокислота, руйнування тирозину відбувається при температурі 314-318° при швидкому нагріванні [78]. Ізoeлектрична точка тирозину становить 5,66. Тирозин має молекулярну масу 181 г/моль. Тирозин розчинний у воді, погано розчиняється у етиловому спирті та ефірі, хімічно стійкий при кімнатній температурі [79].

Враховуючи те, що культуральна рідина після біосинтезу містить біомасу продуцента, продукти його життєдіяльності та інші домішки, першою стадією виділення тирозину є відокремлення біомаси продуцента.

Так як тирозин знаходиться у супернатанті у невеликій концентрації, то наступним етапом є концентрування супернатанту та очищення його від домішок.

Потім отриманий розчин необхідно максимально очистити від баластних речовин, сторонніх амінокислот, щоб забезпечити високий ступінь чистоти цільового продукту.

Оскільки тирозин буде далі використовуватися для виготовлення лікарського препарату у формі твердих желатинових капсул, отже, на далі необхідно висушити тирозин для отримання порошку з 5-8% вмістом вологи.

На останньому етапі необхідно подрібнити та просіяти висушений тирозин для отримання часточок однакового розміру.

Таким чином, технологічний процес виділення та очищення тирозину включає наступні етапи:

- 1) відокремлення біомаси від культуральної рідини
- 2) концентрування супернатанту;
- 3) виділення тирозину;
- 4) очистка виділеного тирозину;
- 5) сушіння;
- 6) подрібнення та просіювання.

3.4.1. Обґрунтування способу відокремлення біомаси

Видалення біомаси є першою стадією виділення і очищення тирозину. Власне, вже на цій стадії починається часткове очищення культуральної рідини від домішок.

Основним завданням на даному етапі є отримання супернатанту з найбільшим ступенем чистоти, з найменшими втратами, що дозволяють забезпечити успішне проведення подальших операцій виділення і очищення амінокислоти [80].

Існує кілька способів відокремлення біомаси продуцента, такі як центрифугування, фільтрування, флотація, осадження.

Фільтрація – заснована на принципі затримки біомаси на пористій фільтруючій перегородці [81]. Фільтрування - гідродинамічний процес, швидкість якого прямо пропорційна різниці тисків, створеного по обидва боки фільтрувальної перегородки і обернено пропорційна опору, який випробують рідиною при її русі через пори перегородки і шар осаду, що утворився [81].

Однак фільтрація має багато недоліків:

- налипання клітин на фільтрі, шар яких знижує швидкість потоку рідини в процесі фільтрування [81];
- енергоємність і довготривалість процесу;

- потрібно регулярна заміна фільтруючих перегородок.

При фільтруванні культуральної рідини утворюються здебільшого драглисті пухки або дрібнозернисті осади, що володіють великим опором. Середня швидкість фільтрації при цьому становить всього 50 л/м² на годину. Оскільки об'єм культуральної рідини досить великий (1,975 м³), то використання фільтрації для відділення біомаси є недоцільним через довготривалість процесу.

Флотація—це виділення клітин мікроорганізмів з культуральної рідини за рахунок адгезії (прилипання) мікроорганізмів до бульбашок повітря, які піднімаються в рідині, з подальшим збором піни і її конденсації. Звичайно чим менше бульбашки, тим повільніше вони піднімаються і тим більше час перебування їх в рідині і ймовірність захоплення клітин мікроорганізмів [82].

Даний метод використовується в тому випадку, якщо клітини продуцента в силу низької змочуваності накопичуються в поверхневих шарах біореактора. Особливі пристрої (флотатори) різної конструкції видаляють піну, яка утворюється при культивуванні, разом з прилиплими до бульбашок газу клітинами. Підвищення ефективності відбору біомаси досягається вспінюванням рідини з подальшим відділенням її верхнього шару механічним шляхом.

Переваги даного методу наступні:

- економічність,
- висока продуктивність;
- можливість використання в безперервних процесах [83].

Але флотацію недоцільно використовувати для виділення тирозину, так як флотація є ефективною при відокремленні великих клітин дріжджів, а відокремлення клітин бактерій *E. coli* буде відбуватися не повністю, отже, основним недоліком даного методу є невисокий ступінь очищення та відокремлення біомаси.

Осадження - це процес розшарування дисперсних систем під дією сили тяжіння і відділення дисперсної фази в вигляді осаду.

Найпростіший випадок седиментації - відстоювання застосовують в наступних випадках:

1. При діаметрі частинок більше 3 мкм, коли броунівський рух не робить істотного впливу на процес відстоювання.

2. При виділенні стабільних продуктів, коли фактор часу не має вирішального значення.

3. При більш низьких, ніж при інших методах, витратах.

4. В особливих випадках, коли необхідно розділити частки на фракції за розміром або щільністю на підставі різних швидкостей їхнього осадження.

5. Якщо необхідно попередньо розділити суспензію на дві фракції - осад і надосадову рідину, які в подальшому можна обробляти на різному устаткуванні.

Проте швидкість осадження біомаси з культуральної рідини невелика і складає близько 10^{-6} - 10^{-7} м/с, тому даний метод недоцільно використовувати для виділення тирозину, оскільки об'єм культуральної рідини досить великий, і тому процес осадження триватиме дуже довго [83].

Центрифугування - це розділення неоднорідних систем під впливом відцентрових сил.

Для центрифугування застосовують центрифуги різних конструкцій.

Центрифуги, що мають високий фактор поділу і оснащені тарілчастим барабаном називають сепараторами. У мікробіологічній промисловості сепаратори є одним з найпоширеніших типів центрифуг. Сепаратори дозволяють сконцентрувати осад до вологості 60-90%.

В останні роки з'явилися спеціальні герметичні сепаратори, що дозволяють вести процес сепарування в автоматизованому режимі, оптимально підібраному для специфічних умов конкретних культуральних рідин [81].

За способом роботи сепаратори діляться на три групи:

1. Сепаратори безперервно-циклічної дії, що забезпечують розділення рідких сумішей з безперервним виведенням з барабана текучих фракцій і періодичним ручним вивантаженням осаду з барабана;

2. Сепаратори безперервно-циклічної дії, що забезпечують розподіл рідких сумішей з безперервним виведенням з барабана текучих фракцій і періодичним вивантаженням осаду з барабана під дією відцентрових сил;

3. Сепаратори безперервної дії, що забезпечують поділ рідких сумішей з безперервним виведенням з барабана всіх відсепарованих фракцій [84].

Основна перевага центрифугування в порівнянні з іншими методами відділення біомаси (відстоюванням, фільтруванням) полягає в збільшенні продуктивності, продуктивність сучасних центрифуг безперервної дії досягає сотень м³/год. За допомогою центрифугування вдається виділити з суспензії частинки розміром до сотих часток мікрометра [82].

Центрифугування вимагає більш дорогого устаткування, ніж фільтрування, проте даний метод найдоцільніше використовувати для відділення біомаси, оскільки він має такі переваги:

- відокремлення біомаси відбувається набагато швидше, ніж з використанням інших методів;
- відбувається максимальне очищення культуральної рідини від частинок, що містяться у ній;
- можливість безперервного процесу;
- висока продуктивність
- висока ступінь концентрування [81].

Недоліки центрифугування:

1. Складність конструкції, висока енергоємність і вартість.
2. Складність експлуатації (ненадійність, вібрація, шум, необхідність періодичної розбирання і миття).
3. Вплив на клітину відцентрової сили, нагрів, складність герметизації і забезпечення асептичних умов ведення процесу.

Проаналізувавши дані методи, найкращим способом відокремлення біомаси від культуральної рідини є центрифугування, оскільки продуктивність процесу найбільша, а також забезпечується максимальне відділення клітин продуцента.

Центрифуги класифікують за принципом поділу на відстійні і фільтруючі.

Відстійні центрифуги застосовують для розділення суспензій з помітною різницею густин рідкої і твердої фаз при виділенні часток розміром менше 100 мкм.

Використовуються переважно для розділення суспензій, що містять малу кількість твердої фази.

Фільтруючі центрифуги використовують при поділі суспензій для відділення твердих частинок розміром до 10 мм, при об'ємній концентрації твердої фази у вихідній суспензії від 1 до 60%, а також при необхідності отримання осаду невисокої кінцевої вологості або високої чистоти [85].

Оскільки у культуральній рідині міститься досить велика концентрація біомаси (14 г/л) [57], то найдоцільніше використовувати фільтруючу центрифугу.

Отже, оберемо фільтруючу центрифугу безперервної дії з верхнім вивантаженням осаду марки RC/SC (рис. 3.1). Фільтруюча центрифуга RC/SC має перфорований барабан, в якому кріпиться фільтруючий мішок. Культуральна рідина безперервно подається в центрифугу через патрубков в кришці, а фільтрат виводиться знизу в лінію скидання або приймач. Твердий осад біомаси осідає в мішку і накопичується. Після заповнення мішка осад вивантажується. Мішок з осадом можна вивантажити за допомогою крана.

Центрифуга кріпиться на платформі з антивібраторами. Двигун, розташований поруч, з'єднаний з барабаном ремінною передачею; швидкість обертання регулюється частотним перетворювачем. Для фармацевтичного виробництва двигун може бути оснащений ковпаком з нержавіючої сталі.

Кришка має оглядове вікно, щоб спостерігати за рівнем осаду в центрифугі. Живильна труба може бути зафіксована або може рухатися вгору/вниз під час роботи центрифуги, що дозволяє оптимально розподілити продукт по всій висоті кошика.

Принцип роботи центрифуги:

Крок 1. Завантаження сировини – культуральна рідина подається в обертовий барабан з фільтром, що уловлює частинки твердої фази, рідина буде просочуватися через шар осаду і виходити через отвори в барабані.

Крок 2. Промивання - промивна рідина подається через окремий патрубок і також проходить через шар осаду, вимиваючи його і видаляючи залишки вихідної рідини.

Крок 3. Віджим осад - за рахунок відцентрових сил відбувається видалення залишкової рідини з осад (віджимання, осушення).

Крок 4. Вивантаження осад - скребок (ніж) знімає осад зі стінокцентрифуги. Осад розвантажують через отвір в нижній частині центрифуги в приймальний контейнер.

Крок 5. Очищення - фільтрувальний мішок з осадом виймають з центрифуги, після чого осад перекладають в приймальну ємність.

Оскільки об'єм культуральної рідини, що йде на центрифугування, становить $1,975 \text{ м}^3$, то доцільно використовувати центрифугу RC 150 KSA з об'ємом барабана 600 л, максимальна загрузка якої 750 л [86].



Рис. 3.1. Центрифуга RC 150 KSA

Після цього здійснюють процес мікрофільтрації для остаточного відділення залишків поживного середовища та біомаси від розчину тирозину.

Для мікрофільтрації доцільно обрати систему мікрофільтрації на полімерних елементах УФ-812 зі спіральними мембранами (рис. 3.2). Дана установка є зручним інструментом для серійного виробництва. Інсталювані в циліндричний корпус, рулонні мембрани за рахунок своєї конструкції мають набагато більш розвинену

питому поверхню на одиницю об'єму. Велика площа фільтрації гарантує високу продуктивність, не вимагає високого тиску і критичних температур.

Продуктивність даної установки – 2400 л/год.

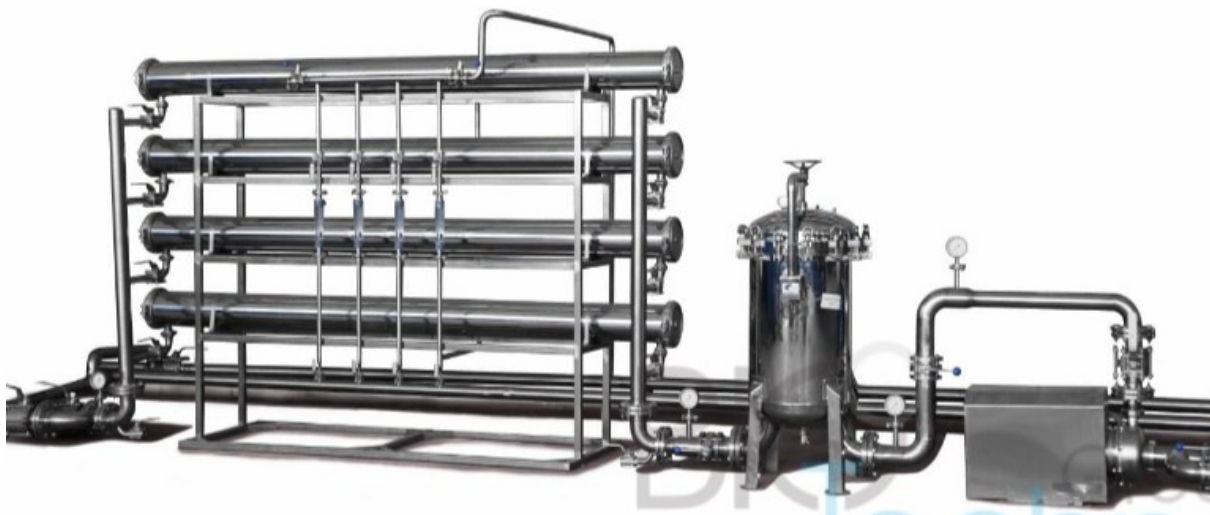


Рис. 3.2. Система мікрофільтрації на полімерних елементах УФ-812

Концентрація біомаси у культуральній рідині складає 14 г/л, отже у 1975 л культуральної рідини міститься 27650 г – 27,65 кг біомаси, отже, після стадій відділення біомаси залишиться приблизно $1975 - 27,65 = 1947,35$ л супернатанту.

3.4.2. Обґрунтування способу концентрування супернатанту

За відділенням продукту слід етап його концентрування за допомогою основних методів – випарювання або мембранних методів – ультрафільтрації, мікрофільтрації, зворотнього осмосу.

При використанні методу **зворотнього осмосу** супернатант поміщається в ємність з напівпроникною мембраною, зовні створюється осмотичний тиск, що перевищує осмотичний тиск розчину-супернатанту, в результаті чого розчинник починає витікати через мембрану проти градієнта концентрації розчиненої речовини, обумовлюючи подальше концентрування розчину [83].

Перевагами зворотнього осмосу є:

- ✓ висока продуктивність;
- ✓ простота конструкції;
- ✓ невелика енергоємність.

Проте є і ряд недоліків:

- необхідність періодичного очищення фільтра хімічними реагентами;
- дороговизна промислових систем
- у сконцентрованому розчині разом з цільовим продуктом залишаються усі низькомолекулярні домішки [87].

Мікрофільтрація, в основному, є гідродинамічним процесом, близьким до звичайної фільтрації. Специфічна особливість мікрофільтрації - використання мембран з діаметром пор від 0,1 до 10 мкм для відділення дрібних частинок твердої фази, в тому числі мікроорганізмів, в цьому випадку її називають стерилізуючою фільтрацією. Тому на відміну від процесу фільтрації при мікрофільтрації явища дифузії (особливо при невеликих розмірах пір від 0,1 до 0,5 мкм) також відіграють певну роль [83].

Ультрафільтрація є способом поділу речовини (вірніше його концентрування) за допомогою мембранних фільтрів.

Технологія ультрафільтрації приваблює своєю простотою, відносною економічністю, відсутністю руйнування продукту, оскільки процес здійснюється за помірно низького зовнішнього тиску. Крім того, в даному методі не потрібна зміна рН, іонної сили розчину або переведення продукту в іншу фазу. Тому метод перспективний при концентруванні малостабільних продуктів (амінокислот, антибіотиків і ферментів).

В основі **ультрафільтрації** лежить використання мембран з діаметром пор від 0,001 до 0,1 мкм. Ультрафільтрація застосовується для поділу клітин і молекул.

Мембранні методи розділення мають ряд переваг.

1. Концентрація і очищення здійснюються без зміни агрегатного стану і фазових перетворень;
2. Цільовий продукт не піддається тепловим і хімічним впливам;
3. Механічний та аеродинамічний вплив на біологічний матеріал незначний;
4. Легко забезпечуються герметичність і асептичні умови;
5. Апаратурне оформлення компактне по конструкції, відсутні рухомі деталі;

6. Процес не володіє високою енергоємністю, в більшості випадків енергія витрачається тільки на перекачування розчинів [83].

Проте за допомогою ультрафільтрації та мікрофільтрації можна сконцентрувати розчини, що містять великі молекули (білки, ферменти), але використання даних методів для концентрування амінокислоти тирозину не є доцільним через малий розмір молекул тирозину, які будуть проходити крізь пори мембран.

Випарювання – це процес концентрування розчинів шляхом часткового видалення розчинника випаровуванням при нагріванні рідини. У ряді випадків упарений розчин піддають подальшій кристалізації.

Концентровані розчини та тверді речовини, одержувані в результаті упарювання, легше і дешевше переробляти, зберігати і транспортувати [83].

Метод випарювання найдавніший і має істотний недолік: для видалення розчинника супернатант слід нагрівати. У виробничих умовах частіше застосовуються вакуумні випарні апарати, що забезпечують більш щадний режим концентрування. Нагріваючим агентом зазвичай служить водяна пара, хоча використовується також обігрів рідким теплоносієм або електричними нагрівачами.

Випарні апарати бувають періодичної і безперервної дії з циркуляцією киплячого розчину. З метою досягнення рівномірного обігріву розробляються різного роду конструктивні удосконалення систем випарювання [81]

Проте головний недолік випарювання полягає у тому, що при цьому не відбувається очищення цільового продукту від домішок та залишків біомаси.

Отже, серед наведених методів найдоцільніше обрати випарювання, оскільки об'єм супернатанту великий, а даний метод є високопродуктивним, забезпечує високий ступінь концентрування, а також даний метод забезпечує найменші втрати цільового продукту.

Процес випарювання у промисловому масштабі переважно здійснюється у роторно-плівкових випарних апаратах (*рис. 3.3*) [88].

У даних апаратах випарювання вихідного продукту (супернатанту, що містить цільовий продукт) відбувається в випарних трубах, всередині яких вбудовані

обертів турбулізуючі механізми роторного типу. Супернатант подається через патрубок у верхній частині кожної з труб. Він розтікається рівномірно по перетину труби роторно-плівкового випарника і стікає по внутрішній поверхні вниз у вигляді плівки під дією сили тяжіння; по поверхні плівки «гліссирують» робочі органи роторного механізму. Труба зовні підігрівається паром до температури випаровування. Обертіві лопаті роторно-плівкового випарника створюють в плівці вихрові структури, що прискорюють в ній тепло-масообмінні процеси, забезпечують ефективне розділення рідкої і парової фаз при випаровуванні.

Основними перевагами роторно-плівкового випарника є:

- не утворюються відкладення на нагрівачі при температурі випаровування до 150 °С;
- використання великої різниці температур між гріючим і випаровуваним середовищами, що дозволяє повністю зберегти цільовий продукт;
- низька металоємність конструкції;
- модульність і технологічність конструкцій;
- високий енергетичний потенціал вторинної пари;
- високий ступінь випарювання [89].



Рис. 3.3. Роторно-плівковий випарний апарат фірми «Гранд»

Прийmemo, що при випарюванні відбувається концентрування супернатанту у 20 разів, отже об'єм розчину тирозину після випарювання складатиме $1947,35/20 = 194,7$ л.

3.4.3. Обґрунтування способу виділення і очищення цільового продукту

Очищення амінокислот переважно найчастіше здійснюють хроматографічними методами та кристалізацією.

Є кілька методів хроматографічної очистки, найпоширенішими з них є гель-фільтрація, афінна хроматографія та іонообмінна хроматографія.

Гель-фільтрація - метод розділення суміші речовин з різними молекулярними масами шляхом фільтрації через різні пористі гелі. Гель-фільтрацію проводять на хроматографічних колонках, заповнених гранульованим гелем, наприклад гелем сефадекс. Ефективність гель-фільтрації визначається розмірами пор міжгранулами гелю і величиною кожної гранули: дрібні молекули дифундують всередині гранул і затримуються при фільтрації через ці своєрідні молекулярні сіта, а більші молекули проходять в пори між гранулами. Перевагами методу є:

- простота виконання;
- проведення у м'яких умовах, що виключають денатурацію біологічно активних речовин.

Проте суттєвим недоліком є низька продуктивність, тобто за допомогою гель-фільтрації неможливо розділити великі об'єми цільового продукту [90].

Афінна хроматографія - це різновид адсорбційної хроматографії. Основною особливістю афінної хроматографії є наявність комплементарності між іммобілізованим на матриці лігандом і цільовим продуктом, що виділяється. Використання високовибіркової взаємодії дозволяє за одну стадію досягти дуже високого ступеня очищення цільового продукту.

Важливими перевагами афінної хроматографії є:

- висока вибірковість,
- концентрування цільового продукту на афінній матриці;
- звільнення продукту від гідролітичних ферментів[91].

Проте даний метод використовувати недоцільно, оскільки він дуже трудомісткий, потребує ретельного підбору лігандів.

Іонообмінна хроматографія є найбільш поширеним хроматографічним методом очистки білків та амінокислот. Іонообмінна хроматографія являє фізико-хімічний метод розділення речовин, заснований на стехіометричному обміні іонів аналізованого розчину і сорбенту (іонообмінника).

Перевагами іонообмінної хроматографії є:

- ✓ можливість поділу близьких за властивостями речовин;
- ✓ висока ефективність поділу,
- ✓ висока продуктивність;
- ✓ експресність, відтворюваність, універсальність методу;
- ✓ можливість автоматизації [92].

Як будь-який метод, іонообмінна хроматографія має деякі недоліки:

- складність процесів синтезу іонітів, високомолекулярних сполук;
- хроматографічна система повинна мати високу стійкість до корозії [93].

Таким чином, для виділення тирозину обираємо іонообмінну хроматографію, зважаючи на те, що даний метод має високу ефективність поділу та високопродуктивний і дозволить виділити досить велику кількість цільової амінокислоти (61 кг).

Іонообмінна хроматографія являє собою метод, що дозволяє розділяти речовини на основі їхнього заряду. Сорбент на поверхні має іонні функціональні групи, які взаємодіють з іонами цільового продукту з протилежним зарядом.

Хроматографія поділяється на аніоно- та катіонообмінну. Вид хроматографії, при якій негативно заряджені іони сорбенту зв'язуються з позитивно зарядженими іонами речовини, яку виділяють, називається кат іонообмінною. А хроматографія, при якій позитивно заряджені іони сорбенту зв'язуються з негативно зарядженими іонами цільового продукту, називається аніонообмінною. При виборі вида іонообмінної хроматографії спираються на ізоелектричну точку цільового продукту pI . При значенні pH вище pI речовина набуває негативного заряду, якщо нижче, то позитивного [94].

Вибір іонообмінника здійснюється на основі ізоелектричної точки [95] тирозину (табл. 3.4).

Таблиця 3.4

Вибір іонообмінників на основі ізоелектричної точки

Ізоелектрична точка	Іонообмінник	pH буфера
8,5	Катіонообмінний	<7,0
7,0	Катіонообмінний	<6,0
6,0	Аніонообмінний	>8,0
5,5	Аніонообмінний	>6,5

Так як ізоелектрична точка тирозину складає 5,66, то обираємо метод аніонообмінної хроматографії. Найчастіше для цього типу іонообмінної хроматографії використовується диетиламіноетилцелюлоза (DEAE) в якості сорбенту.

Оскільки необхідно очистити велику кількість тирозину(61 кг), хроматографію необхідно проводити на колонці великого розміру з високою продуктивністю.

Обираємо для очистки тирозину промисловий хроматограф Biotage™ Flash 400. Дана хроматографічна система здатна працювати при тиску до 7 бар, підтримує швидкість потоку елюенту до 7 л/хв, дозволяючи значно скоротити час, який виділяється на очистку.

Переваги промислового хроматографа Biotage™ Flash 400 наступні:

- Відповідність вимогам GMP для виробництва фармацевтичних субстанцій;
- Можливе наповнення будь-якими сорбентами;
- Швидкість потоку 7 л/хв;
- Мінімізація впливу високоактивних або токсичних сполук [96].

Зображення хроматографічної установки наведено на *рис. 3.4*.



Рис. 3.4. Хроматографічна установка Biotage™ Flash 400

Буферні розчини та розчин тирозину, який очищається, подаються на іонообмінну колонку через спеціальний пристрій для введення зразка за допомогою насоса.

Для вибору буфера також потрібно взяти до уваги значення ізоелектричної точки тирозину. Розчинність амінокислоти в ізоелектричній точці мінімальна, тому,

щоб уникнути її випадання в осад, слід обирати рН буфера, зрушений відносно рІ не менше, ніж на 0,5. При значенні рН вище ізоелектричної точки, амінокислота матиме негативний заряд і буде адсорбуватися на сорбенті.

Отже, попередньо іонообмінна колонка врівноважується 10 мМ калій фосфатним буфером рН 7,0, що містить 1 мМ дитіоеритритолу, і далі тирозин поступає на колонку разом з цим буфером [97].

Розрахуємо концентрацію буферу: 10 мМ фосфату калію = 0,01 М

Молекулярна маса фосфату калію дорівнює 212 г/моль, отже:

В 1 моль – 212 г

В 0,01 моль – X

$X=212 \times 0,01=2,12$ г

1 мМ дитіоеритритолу=0,001 М

Молекулярна маса дитіоеритритолу = 154 г/моль, отже:

В 1 моль – 154 г

В 0,001 моль – Y

$Y=154 \times 0,001=0,15$ г

Отже, для приготування буферу 2,12 г фосфату калію та 0,15 г дитіоеритритолу розчиняють у 1 л дистильованої води.

Приймаємо співвідношення маси амінокислоти до буферного розчину – 1:5, тоді необхідно приготувати $61,15 \times 5=305,8$ л буферного розчину.

Елюцію здійснюють шляхом збільшення іонної сили за допомогою створення сольових градієнтів, що викликає послаблення електростатичної взаємодії між амінокислотою і сорбентом. У міру збільшення концентрації солі NaCl починається процес елюції та тирозин починає рухатися по колонці вниз [95].

Елюцію здійснюють лінійним градієнтом розчину NaCl 0,1-0,5 М [96].

Розрахуємо концентрації розчинів хлориду натрію:

Молекулярна маса NaCl дорівнює 58,5 г/моль, отже:

В 1 моль – 58,5 г

В 0,1 моль – A

$A=58,5 \times 0,1=5,85$ г

B 0,2 M – B

$$B=58,5*0,2=11,7 \text{ г}$$

B 0,3 M – C

$$C=58,5*0,3=17,55 \text{ г}$$

B 0,4 M – D

$$D=58,5*0,4=23,4 \text{ г}$$

B 0,5 M – E

$$E=58,5*0,5=29,25 \text{ г}$$

Отже, готують 5 розчинів, з концентраціями 5,85 г/л, 11,7 г/л, 17,55 г/л, 23,4 г/л, 29,25 г/л.

Приймаємо співвідношення маси амінокислоти до розчину для елюції – 1:5, тоді необхідно приготувати $61,15*5=305,8$ л розчину хлориду натрію, по 61,2 л розчину з кожною концентрацією.

Наступною стадією є очистка тирозину методом кристалізації.

Кристалізація є найпростішим методом розділення і очищення амінокислот. Метод кристалізації складається з п'яти стадій:

- 1) розчинення твердої речовини в мінімальному обсязі розчинника (приготування насиченого розчину);
- 2) фільтрування розчину для видалення нерозчинних домішок (якщо вони присутні);
- 3) охолодження розчину і утворення кристалів;
- 4) відділення кристалів від маточного розчину фільтруванням;
- 5) висушування кристалів.

Для того щоб досягти високого ступеня чистоти, може знадобитися неодноразова перекристалізація.

Для успішної кристалізації надзвичайно важливим є правильний вибір розчинника, в якому продукт легко розчиняється і в якому добре розчинні домішки[98].

Основні переваги кристалізації:

- висока ефективність поділу,

- відносно низькі робочі температури і енергетичні витрати.
- можливість розділяти суміші термолабільних компонентів[99].

Кристалізацію тирозину здійснюють шляхом повільного додавання 40–50% розчину сірчаної кислоти до рН 9,0, при цьому відбувається кристалізація тирозину. Швидкість додавання кислоти - в межах 1–5 мл/хв на літр об'єму [100].

Отже, на 305,8 л розчину тирозину необхідно подавати розчин сірчаної кислоти зі швидкістю 917,4 мл/хв.

Кристали тирозину відновлюють фільтруванням. Для фільтрування кристалів тирозину необхідно обрати фільтр.

Фільтри, що застосовуються в фармацевтичній промисловості, за принципом роботи поділяють на нутч-фільтри - різниця тисків досягається за рахунок створення розрідження за фільтрувальним шаром, і друк-фільтри, де надлишковий тиск, що створюється механічно або за рахунок подачі стисненого повітря (інертного газу) вище мембрани змушує фільтрат просочуватися через неї.

Очевидно, що перевагою друк-фільтрів є можливість роботи при значно більших різницях тиску. Максимальною рушійною силою процесу нутч-фільтрації може бути різниця між атмосферним тиском і глибоким вакуумом (тобто близько 1 бар). Друк-фільтри можуть працювати під надлишковим тиском 3, 6 і більше атмосфер, що дозволяє «продавлювати» через фільтрувальний шар навіть «важкі» і дрібнодисперсні осадки.

З іншого боку, конструкція нутч-фільтрів значно простіше, а відсутність надлишкового тиску дозволяє застосовувати для їх виготовлення більш дешеві і, найчастіше, зручні для роботи конструкційні матеріали, такі як скло і поліпропілен.

Ще однією перевагою нутч-фільтрів є істотно простіша сертифікація, оскільки даний тип обладнання не відноситься до апаратів, що працюють під тиском [101].

Також перевагами нутч-фільтрів є:

- відсутність контакту продукту та людини-оператора, тому можлива стерильна робота;
- досить оперативний поділ речовин на фази: тверду, рідку;
- проста конструкція, немає необхідності застосування дорогого обладнання;

- досить довгий термін служби [102].

Отже, для фільтрування кристалів тирозину обираємо нутч-фільтр компанії Büchi об'ємом 300 л (рис. 3.5). Принцип дії даного фільтра полягає у тому, що суспензія подається в фільтр. Тверда фаза затримується на фільтрувальній перегородці і формує шар осаду, в той час як фільтрат подається на дно фільтра і виводиться через донний злив. Стадія фільтрування завершується, коли шар осаду сформовано і при його віджиманні призводить до утворення незначної кількості фільтрату.

Осад легко виймається з фільтра при розмиканні кришки і корпусу фільтра і опусканні фільтра за допомогою підйомно-поворотного пристрою (ліфта) вниз і вбік. Ліфт використовується також для опускання днища, з тим щоб очистити або замінити фільтрувальне полотно^[103].



Рис. 3.5. Нутч-фільтр компанії Büchi

3.4.4. Обґрунтування способу сушіння тирозину

Існує кілька способів сушіння. Сушіння культуральної рідини здійснюється контактним, конвективним та радіаційним способом.

При контактному сушінні тепло передається висушуваному матеріалу через нагріті поверхні (плити, вальці), а випаровувана волога переходить у повітря. Для сушки продуктів біологічного синтезу застосовуються одно- і двовальцові шафові сушарки.

При конвективному сушінні тепло, необхідне для процесу сушіння, доставляється газоподібним сушильним агентом, який грає роль теплоносія і середовища, в яке переходить волога з матеріалу.

Цей метод широко застосовується в пневматичних, аерофонтанних, барабанних, розпилювальних сушарках і сушарках в киплячому шарі.

Крім перерахованих методів можлива також сушка в електромагнітному полі високої частоти (діелектричний нагрів), проте цей метод для сушки фармацевтичної продукції через високу вартість установки, значної витрати енергії і складності експлуатації не застосовується [84].

Барабанні сушарки – сушіння проводиться у барабані, який знаходиться у постійному русі і перемішує матеріал під дією нагрітого повітря. Неперервний рух барабана розбиває матеріал на частини і перетворює його в однорідну масу. Такі дії дозволяють рівномірно і якісно висушити продукт.

Перевагами барабанної сушарки є:

- автоматизація процесу сушіння;
- відсутність складнощів з монтажем, запуском у роботу.

Проте вона має багато недоліків:

- великі габарити;
- великі капітальні та експлуатаційні затрати;
- великі втрати продукту (до 40%) [104].

Сушарки з киплячим (псевдозрідженим) шаром - дозволяють значно збільшити поверхню контакту між частками матеріалу і сушильним агентом,

інтенсифікувати випаровування вологи з матеріалу і скоротити (до декількох хвилин) тривалість сушіння.

Принцип дії: сушильний агент - гаряче повітря нагріте в калорифері, проходить із заданою швидкістю через отвори решітки в сушильній камері і підтримує на ній матеріал в киплячому (псевдозрідженому) стані. Висушений матеріал зсипається через патрубков вище решітки. Відпрацьовані гази очищаються від пилу в циклоні, після чого викидається в атмосферу.

Переваги сушарки з киплячим шаром

- Сушарки з киплячим шаром гарантують швидку і однорідну сушку - у псевдозрідженому стані частинки фактично знаходиться в прямому контакті з гарячим газом або повітрям, тому сушіння здійснюється протягом 10-40 хвилин;

- підходить для чутливих до нагрівання продуктів;

- процес сушіння легкий і не трудомісткий;

- сушарка з псевдозрідженим шаром має низьку вартість обслуговування, отже, скорочує час простою;

- немає гарячих точок на кінцевому продукті.

Недоліки сушарки з киплячим шаром

- високі втрати продукту;

- шанси електростатичного нарощування можуть бути високими, енергійний рух може генерувати електростатичні заряди;

- сушіння липкого матеріалу досить складне [105].

Розпилювальна сушарка - при розпилювальному сушінні висушуваний розчин або суспензія розпорозуються спеціальними пристроями до дрібнодисперсного стану і змішуються з газоподібним сушильним агентом. З огляду на дуже великі поверхні одержуваних при розпилюванні частинок процес йде дуже швидко.

Переваги розпилювальної сушарки:

1) час сушіння 15-30 секунд;

2) розмір часток і вологість продукту можна регулювати;

3) готовий продукт не вимагає подальшого подрібнення;

4) висока продуктивність.

Недоліки:

1) великі габарити;

2) велика витрата енергії в зв'язку з необхідністю розпилення розчину.

А також зважаючи на те, що тирозин використовуватиметься у фармацевтичній промисловості та повинен мати високий ступінь чистоти, то сушіння у розпилювальній сушарці є недоцільним, так як може відбуватися забруднення продукту.

Сублімаційна сушарка – принцип дії заснований на видаленні вологи із замороженого стану. Причому волога у вигляді льоду переходить в газоподібну фазу, минаючи рідку. Матеріал знаходиться при температурі $-20 \div -30^{\circ}\text{C}$ лише в кінці сушіння температура підвищується до $30 - 40^{\circ}\text{C}$. Тиск $0,1 - 10 \text{ Па}$.

Установка складається з субліматора з плитами, на яких розміщується висушуваний продукт. Циркулюючий всередині плит теплоносій охолоджує плити при заморожуванні продукту або нагріває при сушінні. Конденсація парів вологи відбувається в конденсаторі, куди подається холодоносій від холодильної установки. При зниженні тиску в сушильній камері відбувається швидке самозаморожування вологи і сублімація льоду за рахунок тепла, що віддається самим матеріалом [106].

Переваги сублімаційної сушарки наступні:

- процес сушіння відбувається при низькій температурі, завдяки чому не руйнується продукт;
- відсутнє вспінювання;
- зразки після ліофільної сушки легко розчиняються;
- цей метод дозволяє висушувати нестабільні речовини;
- завдяки низькій температурі відсутня небезпека мікробіологічного забруднення. При цьому ферментативне розщеплення зводиться до мінімуму;
- у висушуваному продукті залишається менше 1% вологи, тому його можна довго зберігати [107].

Найбільшим недоліком сублімаційної сушарки є висока вартість сушарки.

Також до недоліків відносять:

- тривалість і енергоємність процесу;
- складність обладнання;
- висока гігроскопічність висушеного матеріалу [108].

Шафові сушарки або вакуум-сушильні шафи являють собою циліндричну (рідше прямокутну) камеру, в якій розміщені порожнисті плити, що обігріваються зсередини парою або гарячою водою. Висушуваний матеріал знаходиться в лотках (деках), встановлених на плитах. Під час роботи камера герметично закрита і з'єднана з вакуумом. Завантаження і вивантаження виробляються вручну.

Недоліком вакуумних сушарок є низька продуктивність.

Проте так як маса тирозину за цикл невелика (61,15 кг), то використання вакуумної сушарки є доцільним. Вакуумна сушка відноситься до найефективніших і делікатних методів сушіння. Ще одним позитивним ефектом є незначні витрати на електроенергію.

У вакуумній сушильній шафі здійснюють сушку у вакуумі до 0,002 атм і при температурі до 200 °С.

Обираємо вакуумну сушильну шафу СВ-300 об'ємом 220 л (рис. 3.6), перевагами якої є:

- швидка сушка з інтенсивним відведенням парів і газів;
- рівномірна сушка зразків у вакуумі;
- сушка фармацевтичних препаратів і вихідних речовин без нагрівання або при низькій температурі;
- автоматичне регулювання і підтримка температури;
- вбудований програмний таймер до 999 хвилин;
- цифрова настройка температури з точністю в один градус;
- все електричні компоненти ізольовані від внутрішньої камери;
- вбудований аналоговий вакуумметр;
- голчастий вентиль для регульованої подачі інертного газу або стравлювання повітря;
- камера і полки виготовлені з нержавіючої сталі AISI 304;

- герметичне силіконове ущільнення і надійний фіксатор двері;
- пристрій захисту від перегріву[109].



Рис. 3.6.Вакуумна сушильна шафа СВ-300

3.4.5. Обґрунтування способу подрібнення тирозину

Отримані сухі фармацевтичні продукти зазвичай використовуються в подрібненому стані [84]. Тирозин дуже швидко повинен розчинитися або змішуватися до гомогенного стану, для цього після сушіння останнім етапом є подрібнення та просіювання продукту з метою отримання часточок однорідного розміру.

Для подрібнення використовуються різні дробарки – щокові, валкові, конусні, молоткові.

Щокові дробарки - така дробарка подрібнює матеріал шляхом здавлювання його двома пластинами (щоками), одна з яких закріплена нерухомо, а друга - на хиткій основі. Здійснюючи зворотно-поступальні дії, рухома і нерухома щоки здавлюють і тим самим дроблять сировину, що надходить в машину.

До переваг таких дробарок відносяться:

- простота конструкції, що тягне за собою порівняну легкість монтажу,
- можливість шляхом регулювань пропускного каналу підбирати необхідну величину одержуваних на виході часточок продукту.

До недоліків можна віднести:

- швидкозношуваність механізмів через стирання елементів (щок);
- великі витрати електроенергії,
- вібрація при роботі, що викликає підвищений знос багатьох елементів конструкції - підшипників, з'єднань і т.д.,
- видача нерівномірного по крупності продукту [110].

Валкові дробарки - застосовуються в основному для дрібного і середнього дроблення сировини невисокої твердості. Валкові дробарки складаються з двох циліндричних валів, що обертаються назустріч один одному. Дроблення відбувається при проходженні сировини між валами, один з яких може бути закріплений на регульованій рухомій основі для налаштування необхідного діаметра вихідної фракції.

Перевагами валкових дробарок є:

- однорідність форми частинок на виході;
- мінімальні проблеми при експлуатації;
- економічність (незначний рівень споживання енергоресурсів, а також зносостійкість комплектуючих дробарки);
- зручність при ремонтних роботах і технічному обслуговуванні;
- приймальний бункер може бути вивантажений без повної попередньої зупинки обладнання.

Недоліками такої дробарки є:

- налипання частин вологого матеріалу на валки;
- низька продуктивність;
- можливі перекося валу на рухомій валці;
- неможливе дроблення матеріалів при ступені твердості більше 160 МПа [111].

Конусні дробарки – являють собою воронку з твердосплавним конусом, що обертається усередині. Матеріал подрібнюється, проходячи в зазори між конусом і стінками дробарки. Конусна дробарка використовує не тільки принцип стиснення, але і стирання, що в поєднанні з деякими конструктивними особливостями дозволяє отримати на виході фракцію правильної однакової форми, що є основною перевагою такої дробарки.

До недоліків її слід віднести порівняно низьку енергоефективність, складність конструкції, велику масу і габарити, складність в обслуговуванні та ремонті [112].

Дробарка молоткова - це подрібнюючий пристрій, робочим інструментом якого є виступ на роторі (молоток). Матеріал, який треба подрібнити, надходить в бункер через колосник, що відсіває занадто великі фракції, здатні зупинити роботу пристрою. Ступінь подрібнення залежить від часу знаходження матеріалу в бункері і кількості зіткнень з молотками. Тому в молотковідробарки продукт завантажують порціями, а потім подрібнюють до потрібного розміру.

До переваг молоткових дробарок варто віднести:

- ✚ простота і надійність конструкції;
- ✚ відносно невисока вартість;
- ✚ невеликі габарити порівняно з конусними і щоків аналогами;
- ✚ проста взаємозамінність деталей і вузлів конструкції;
- ✚ висока продуктивність;
- ✚ можливість тонкого подрібнення;
- ✚ низька витрату енергоресурсів.

До технічних недоліків можна віднести:

- ❖ не може застосовуватися для дроблення дуже міцних матеріалів;
- ❖ високий рівень шуму при роботі;
- ❖ надмірна кількість пилу;
- ❖ немає можливості для дроблення вологих матеріалів[113].

Отже, зважаючи на переваги молоткової дробарки, обираємо дробарку даного виду для подрібнення тирозину. Дана дробарка підходить для подрібнення даної амінокислоти, оскільки продукт не є міцним та вологим.

Обираємо молоткову дробарку YF8-1 (рис. 3.7), продуктивність якої 50 кг/год[114], оскільки кількість тирозину, що йде на подрібнення становить 61,15 кг.

До того ж дана дробарка містить 5 сит для просіювання подрібненого продукту, розміри яких: 6мм, 250, 177, 149, 105 мікрон. Отже, це виключає необхідність встановлення просіювальної машини після подрібнення з метою забезпечення однорідності розмірів часток тирозину.



Рис. 3.7. Молоткова дробарка YF8-1

Отже, процес виділення та очищення тирозину складається з таких етапів:

- 1) центрифугування;
- 2) мікрофільтрація;
- 3) випарювання;
- 4) іонообмінна хроматографія;
- 5) кристалізація;
- 6) фільтрування;
- 7) сушіння;
- 8) подрібнення та просіювання.

3.5. Обґрунтування вибору технологічної схеми одержання ЛЗ

3.5.1. Вибір форми випуску лікарського засобу

На даний час препарати, що містять тирозин, випускаються тільки у формі твердих желатинових капсул [115, 116, 117].

Однак лікарські препарати, що містять амінокислоти також часто випускаються у формі таблеток або розчину для ін'єкцій в ампулах.

Переваги та недоліки наведених лікарських форм [118] представлені у *табл. 3.5.*

Таблиця 3.5

Переваги та недоліки лікарських форм

Лікарська форма	Переваги	Недоліки
Тверді желатинові капсули	<ul style="list-style-type: none">✓ висока біодоступність;✓ точність дозування;✓ гарний зовнішній вигляд;✓ легко проковтуються, швидко набухають;✓ желатинові капсули легкорозчинні, вони проникні для травних соків✓ лікувальна дія лікарської речовини проявляється швидко (у середньому через 4–5 хв).✓ шляхом введення до складу желатинових стінок допоміжних речовин або покриття спеціальними плівками вдається одержувати капсули з різною швидкістю вивільнення й локалізацією дії лікарської речовини;✓ оболонка з желатину захищає лікарську форму від впливу повітря, світла, вологи, пилу, захищає від механічних зовнішніх впливів, коливань температури.✓ уміщення в оболонку зручне для відпускання речовин, що мають неприємний смак, запах та колір, тому капсули дуже перспективні для застосування в педіатрії і геронтології;✓ виготовлення капсул майже цілком механізоване й автоматизоване.	<ul style="list-style-type: none">○ у желатинових капсулах можуть відпускатися тільки ті речовини, що не вступають у взаємодію із гліцерином і желатином та не розчиняють їх;○ желатинова маса є прекрасним середовищем для розвитку мікроорганізмів;○ висока чутливість до вологи – гігроскопічність.

Лікарська форма	Переваги	Недоліки
Ін'єкційні лікарські форми	<ul style="list-style-type: none"> ✓ швидка дія і повна біологічна доступність лікарської речовини; ✓ точність і зручність дозування; ✓ можливість введення лікарської речовини хворому, що знаходиться в непритомному стані або, коли ліки не можна вводити через рот; ✓ відсутність впливу секретів ШКТ і ферментів печінки, що має місце при внутрішньому вживанні ліків; ✓ можливість створення великих запасів стерильних препаратів, що полегшує і прискорює їх відпускання. 	<ul style="list-style-type: none"> ○ при введенні рідин через ушкоджений покрив шкіри в кров легко можуть потрапити патогенні мікроорганізми; ○ разом з препаратом для ін'єкцій в організм може бути введене повітря, що викликає емболію судин або розлад серцевої діяльності; ○ навіть незначні кількості сторонніх домішок можуть викликати шкідливий вплив на організм хворого; ○ психоемоційний аспект, пов'язаний із хворобливістю ін'єкційного шляху введення; ○ введення стерильних ліків повинні здійснюватися тільки кваліфікованими фахівцями
Таблетки	<ul style="list-style-type: none"> ✓ зручність застосування; ✓ точність дозування; ✓ можливість сполучати несумісні за фізикохімічними властивостями і терапевтичній дії лікарські речовини; ✓ можливість маскуванню неприємного запаху, смаку, кольору й здатності до забарвлення ✓ можливість повної механізації й автоматизації виробництва; гігієнічність і масовість виробництва; ✓ висока компактність; ✓ стійкість до впливу несприятливих механічних і кліматичних факторів; ✓ зручність транспортування, зберігання й відпускання, тривалий строк придатності. 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Дія лікарських речовин може розвиватися відносно повільно. ○ Таблетки неможливо ввести хворому при блювоті, у непритомному стані. ○ При тривалому зберіганні деякі таблетки можуть цементуватися, що призводить до зміни часу розпадання. ○ До складу таблеток часто вводяться баластні речовини, що не мають терапевтичної цінності, які іноді викликають деякі побічні явища (наприклад, тальк подразнює слизові оболонки). ○ Не всі хворі, особливо діти, можуть вільно проковтнути таблетки

Таким чином, проаналізувавши наведені переваги та недоліки, можна зробити висновок, що ін'єкційні лікарські форми мають багато недоліків: при їх виробництві необхідний контроль на стерильність, апірогенність, також вони характеризуються складністю введення. Найголовнішим недоліком є те, що незначні кількості

домішок можуть бути шкідливими для здоров'я. Таблетки, у порівнянні з капсулами, мають повільнішу терапевтичну дію, можуть псуватися при зберіганні, містять більше баластних речовин та менш зручні для ковтання.

Отже, найкращою лікарською формою для виробництва тирозину є тверді желатинові капсули, так як вони є менш небезпечними для організму, ніж ін'єкційні засоби, мають більш швидку терапевтичну дію, порівняно з таблетками, мають тривалий термін зберігання та стабільність при зберіганні.

3.5.2. Обґрунтування вибору первинної упаковки та підготовки первинної упаковки

Капсули найчастіше упаковують у блістерні упаковки, скляні або пластмасові флакони. Порівняння даних типів упаковки [119] наведено у *табл. 3.6*.

Таблиця 3.6

Порівняння типів первинної упаковки для капсул

Характеристика	Блістер	Флакон
Розміщення капсул у упаковці	Кожна капсула знаходиться у окремій комірці і відокремлена від інших	Всі капсули знаходяться разом у одному флаконі, і не відокремлені одна від одної
Компактність	У блістері можна помістити невелику кількість капсул (10-20)	У флаконі можна помістити велику кількість капсул (близько 100)
Зручність використання	Блістер легкий, його зручніше носити з собою	Скляні флакони незручно брати з собою, зважаючи на те, що він може розбитися
Зберігання і транспортування	Може пошкодитися під час зберігання і транспортування.	Найнадійніший варіант фасування, не боїться транспортування і зберігання в практично будь-яких умовах.

Отже, хоч блістер зручніший у використанні, доцільніше фасувати капсули L-тирозину у пластикові флакони, оскільки в них капсули краще захищені від

факторів зовнішнього середовища, а також флакони забезпечують більшу компактність, зважаючи на те, що на курс лікування необхідно 90 капсул.

Накожному фармацевтичному підприємстві повинні бути інструкції з процесу підготовки, використання методів контролю якості застосовуваних видів тари, допоміжних пакувальних засобів і пакувальних матеріалів, виконання вимог яких гарантує необхідний рівень чистоти пакувальних матеріалів за механічним і мікробним забрудненням.

Процес упаковки складається з наступних технологічних стадій: стадії підготовки до процесу упаковки; упаковка лікарських засобів в споживчу тару (фасування капсул у флакони, закупорювання флаконів); упаковка лікарських засобів в картонну тару; упаковка в групову тару; упаковка в транспортну тару.

При отриманні партії тари і пакувальних матеріалів необхідна перевірка на відповідність специфікації, відсутність пошкоджень упаковки і її чистоту і наявність документів, що задовольняють якість тари і пакувальних матеріалів. Отримання кожної партії повинно бути зареєстровано на підприємстві-споживачі.

Тара, допоміжні пакувальні засоби і матеріали надходять у виробництво при їх відповідності вимогам нормативної документації і з дозволу служб контролю якості.

Тара, пакувальні матеріали, допоміжні пакувальні засоби з мікробним забрудненням, що перевищує встановлені норми, або наявністю механічної забрудненості повинні проходити додаткову обробку (мийку, стерилізацію і т.п.) відповідно до технологічної інструкції процесу обробки; методики проведення робіт (мийка, стерилізація і т.п.); інструкції по зберіганню і міжцехового транспортування стерильних або «чистих» таропакувальних засобів.

Для миття тари і укупорочних засобів повинна використовуватися вода питна або очищена.

Для останнього ополіскування тари і закупорювальних засобів для нестерильних лікарських засобів повинна використовуватися вода очищена.

При транспортуванні підготовлених тари, закупорювальних засобів з одного приміщення в інше повинні бути передбачені спеціальні пристрої або контейнери, що виключають можливість їх вторинного забруднення або змішування (наприклад

- виробнича полімерна тара для фармацевтичного виробництва місткістю 18, 22, 24 і 28 л по ТУ 64-7-674).

Кожна одиниця упаковки повинна бути забезпечена етикеткою або текст етикетки повинен бути нанесений безпосередньо на упаковку.

Виготовлення етикеток та інших друківаних матеріалів має бути організовано таким чином, щоб уникнути можливості їх змішування. Етикетки, бандеролі та інші друківані матеріали для кожного найменування лікарського засобу повинні зберігатися окремо в закритих контейнерах в приміщеннях для зберігання. Їх видача може бути дозволена тільки при наявності відповідного письмового розпорядження.

Транспортування етикеток з приміщень для зберігання до ліній маркування та упаковки повинно бути організовано так, щоб гарантувати неможливість їх підробки і змішування з етикетками, призначеними для маркування інших лікарських засобів [120].

3.5.3. Опис лікарського засобу згідно АНД

Препарат тирозину у Анатомарно – терапевтичній системі класифікації (АТС) займає наступне місце [121]:

N Засоби, що діють на нервову систему

N06 Психоаналептики

N06B Психостимулятори, засоби для застосування при синдромі порушення уваги та гіперактивності, та ноотропні засоби

N06BX Різні психостимулювальні та ноотропні засоби

N06B X20** Інші

Характеристика кінцевої продукції виробництва. L-тирозин в капсулах.

Основні фізико-хімічні властивості: Білі непрозорі капсули. Вміст капсул – кристали тирозину білого кольору, мало розчинні у воді, розчинні в спирті і ефірі, без запаху [122].

Склад: на 1 капсулу – 400 мг L-тирозину.

Допоміжні речовини: кальцію стеарат, мікрокристалічна целюлоза, лактоза, крохмаль, сорбіт [123].

Лактоза використовується в якості наповнювача. Кальцію стеарат застосовують для надання необхідної сипучості, як антиадгезійний (змащуючий) засіб. Крохмаль покращує змочуваність, водопроникність, рухомість порошку, є розпушуючим засобом. Використання мікрокристалічної целюлози робить покращує стабільність та однорідність вмісту капсул. Сорбіт використовується як підсолоджувач, вологоутримуючий агент, комплексоутворювач, текстуратор.

Форма випуску: Тверді желатинові капсули, що містять по 400мг тирозину.

Фармакологічні властивості. L-Тирозин — це замінна амінокислота, яка утворюється в організмі з незамінної амінокислоти — фенілаланіну.

Амінокислота тирозин на фізіологічному рівні сприяє підвищенню настрою. Тирозин є попередником нейромедіаторів норадреналіну і дофаміну, які регулюють настроїв. Недостача в організмі тирозину викликає дефіцит норадреналіну, що, у свою чергу, приводить до депресії.

Крім того, достатня забезпеченість організму тирозином важлива і для роботи ендокринної системи: саме ця амінокислота, разом з йодом, бере участь у виробництві гормонів щитовидної залози, тобто нормалізує її роботу, покращує функції надниркових, щитовидної залози і гіпофізу. Тиреоїдні гормони утворюються при приєднанні до тирозину атомів йоду. Низький вміст тирозину в плазмі пов'язаний з гіпотиреозом. Симптомами недостатності тирозину є пригнічення функції щитовидної залози, зниження артеріального тиску і температури тіла (холодні руки, ноги), відчуття важкості в литкових м'язах. Тирозин пригнічує апетит, сприяє зменшенню відкладення жирів, сприяє виробленню мелатоніну.

Тирозин є попередником синтезу ряду важливих біологічно активних речовин, у тому числі катехоламінів (дофамін, адреналін, норадреналін), тиреоїдних гормонів і пігменту меланіну. Прийом ДД “L-Тирозин” допомагає зняти стрес, його використовують при синдромі хронічної втоми і нарколепсії, тривозі, депресії, алергіях, головних болях, а також для відвикання від ліків. Тирозин може бути корисний при хворобі Паркінсона.

Тирозин також необхідний в наступних ситуаціях: психоемоційний стрес, потреба в психостимулюючому ефекті, млявість і втомленість, мігрень, стани гіперактивності з дефіцитом уваги, гіпотонія, алергічні стани, реабілітація при кокаїновій залежності і алкоголізмі та ін.. Тирозин допомагає наркозалежним справитися з їх звичкою, запобігаючи депресії, слабкості і надмірній дратівливості, яка спостерігається при відміні наркостимуляторів. Клінічні дослідження показали, що тирозинові добавки допомагають контролювати депресію і тривогу, невіддатливі лікуванню медикаментами, а також дають можливість пацієнтам, приймаючим амфетаміни (для підйому настрою або зниження ваги), зменшити їх дози до мінімальних.

У спортивній практиці добавки тирозину застосовуються для стимуляції діяльності головного мозку і центральної нервової системи за рахунок позитивної дії на швидкість синтезу нейронами мозку антидепресантів — допаміну і норепінефрину. Тирозин знімає нервову перевтому, підвищує здібність до концентрації, позитивно впливає на швидкісні якості спортсмена.

Біологічна дія тирозину:

- стреспротекторна,
- психостимулююча,
- протиалергічна,
- антидепресантна,
- регулююча функції щитовидної залози і надниркових,
- нормалізуюча — знижений артеріальний тиск,
- пригнічуюча апетит,
- поліпшуюча інтелектуальні функції [122].

Фармакокінетика. Вивчення фармакокінетичних параметрів тирозину не проводилося.

Показання для застосування.

- Зниження концентрації уваги і пам'яті.
- Гіпотонія.
- Синдром хронічної втоми, часті зміни настрою, субдепресивні стану.

- Вегето-судинна дистонія.
- В комплексному лікуванні хвороби Паркінсона.
- Гіперактивність в дитячому віці.
- В комплексному лікуванні алкогольної та наркотичної залежності.
- Вітіліго.
- Хвороби щитовидної залози.
- Порушення обміну речовин.[124].

Спосіб застосування та дози. Дорослим та дітям з 16 років по 1 капсулі 3 рази на день до їжі. Курс прийому 3–4 тижні. Повторний прийом можливий через місяць. [122].

Побічна дія. Не виключено виникнення реакцій гіперчутливості на складові препарату [123].

Протипоказання.

- Сенсibilізація до компонентів препарату.
- Шизофренія.
- Вагітність і лактація.
- Терапія інгібіторами моноаміноксидази.
- Спадкова тирозинемія [123].

Взаємодія з іншими лікарськими засобами. Заборонено приймати препарат тирозину з інгібітори моноаміноксидази [123].

Передозування. Випадків передозування препарату не відзначалося.

Умови відпуску. Без рецепта.

Умови та термін зберігання. Зберігати в сухому, захищеному від світла місці при температурі не вище 20 °С. Зберігати в недоступному для дітей місці [122].

Термін придатності – 2 роки [122].

Упаковка. Капсули, що містять по 400 мг тирозину. 90 капсул у пластиковому флаконі, один флакон в картонній пачці.

СПЕЦИФІКАЦІЯ

на L-тирозин в капсулах

Таблиця 3.7

Найменування показника	Допустимі межі	Методи контролю
Опис	Білі непрозорі капсули, що мають гладку поверхню без ушкоджень і видимих повітряних і механічних включень. Вміст капсул - кристали тирозину білого кольору, мало розчинні у воді, розчинні в спирті і ефірі, без запаху.	За п.1, візуально
Ідентифікація	Через 10 хвилин при додаванні реактиву Міллона розчин тирозину повинен забарвитися в червоний колір.	За п. 2.
Супровідні домішки	Забарвлення розчину тирозину не має бути інтенсивнішим за забарвлення розчину еталонів.	За п. 3, ДФУ 2.4
Важкі метали	Не більше 0,001%	За п. 4, ДФУ 2.4.8
pH	Від 5,5 до 7,0	За п. 5, ДФУ, 2.2.3
Розчинення	Кількість тирозину, що перейшов у розчин з кожної капсули через 45 хв, має бути від 0,3 до 0,460 г.	За п.6, ДФУ 2.9.3
Розпадання	Всі 6 капсул повинні розпастися за 30 хв	За п.7, ДФУ 2.9.1
Втрата в масі при висушуванні	Не більше 3,0 %.	За п. 8, ДФУ, 2.2.32
Мікробіологічна чистота	Загальне число життєздатних аеробних мікроорганізмів: не більше 10^3 бактерій і не більше 10^2 грибів у грамі. Відсутність бактерій родини <i>Enterobacteriaceae</i> в 1 г. Відсутність <i>Pseudomonas aeruginosa</i> в 1 г. Відсутність <i>Staphylococcus aureus</i> в 1 г.	За п. 9, ДФУ, 2.6.12,N, 2.6.13; N; 5.1.4, N (категорія 3 А)

Найменування показника	Допустимі межі	Методи контролю
Однорідність маси	Не більше двох індивідуальних мас можуть відхиляються від середньої маси на величину, яка перевищує 7,5%. При цьому жодна індивідуальна маса не має відхилитися від середньої маси на величину, що перевищує 15%.	За п. 10, ДФУ, 2.9.5
Кількісне визначення	Вміст тирозину в одній капсулі з дозуванням 0,4 г має бути від 0,340 до 0,460 г.	За п. 11, ДФУ, 2.5.33, 2.9.6
Зберігання	У сухому захищеному від світла місці, при температурі не вище 20 °С.	
Термін придатності	2 роки.	

МЕТОДИ КОНТРОЛЮ

1. Опис. Білі непрозорі капсули, що мають гладку поверхню без ушкоджень і видимих повітряних і механічних включень.

Вміст капсул - кристали тирозину білого кольору, мало розчинні у воді, розчинні в спирті і ефірі, без запаху [122].

2. Ідентифікація

Ідентифікацію тирозину здійснюють за допомогою реакції Міллона [125]. Цей метод визначення тирозину заснований на тому, що, по-перше, тирозин на відміну від триптофану і фенілаланіну нітрується навіть розведеною азотною кислотою, а по-друге, нітротирозин, що утворюється, перетворюється на червону, нерозчинну у кислому середовищі, аці-нітросіль з іоном $[\text{Hg}]^{2+}$.

Реакція викликана присутністю фенольної групи тирозину, після взаємодії з реактивом Міллона (суміш нітратів і нітритів ртуті, розчинених в концентрованій азотній кислоті) утворюється ртутна сіль нітропохідного тирозину червоного кольору.

При низькій концентрації тирозину виникає червоне забарвлення, при високій - випадає червоний осад.

Реактив Міллона: в 60 мл концентрованої нітратної кислоти розчиняють 40 г ртуті при кімнатній температурі, поміщають в теплу водяну баню до припинення виділення бурих парів і перемішують. Потім додають 120 мл води і отриманий розчин розбавляють водою 1:1.

0,1 г вмісту капсули розчиняють у 10 мл води. До 1 мл отриманого розчину тирозину додають 0,5 мл реактиву Міллона, ретельно перемішують. Через 10 хвилин розчин повинен забарвитися в червоний колір [126].

3. Визначення супровідних домішок

Визначення домішок проводять згідно ДФУ п. 2.4 [127].

Визначають вміст домішок таких, як солей амонію, арсену, кальцію, магнію, лужноземельних металів, хлоридів, феруму, фосфатів, фторидів, цинку.

Солі амонію

0,1 г вмісту капсули розчиняють у 14 мл води, підлужнюють розчином натрію гідроксиду розведеним і доводять об'єм розчину водою до 15 мл. Додають 0,3 мл розчину калію тетраїодмеркурату лужного.

Як еталон використовують розчин, одержаний додаванням до 10 мл еталонного розчину амонію (1 ppm NH₄) 5 мл води і 0,3 мл розчину калію тетраїодмеркурату лужного. Пробірки закривають. Через 5 хв жовте забарвлення випробовуваного розчину має бути не інтенсивнішим за забарвлення еталона.

Арсен

Прилад для визначення складається з конічної колби місткістю 100 мл, закритої скляною притертою пробкою, крізь яку проходить скляна трубка завдовжки 200 мм із внутрішнім діаметром 5 мм. Нижня частина трубки витягнута до внутрішнього діаметра 1.0 мм, на відстані 15 мм від кінчика трубки розташований бічний отвір діаметром від 2 мм до 3 мм. Трубка поміщена таким чином, щоб бічний отвір знаходився мінімум на 3 мм нижче нижньої поверхні пробки. Верхній кінець трубки повинен мати цілком плоску притерту поверхню, розашовану під прямим кутом до осі трубки. Друга скляна трубка завдовжки 30 мм з таким самим внутрішнім діаметром і такою самою плоскою притертою поверхнею поміщається зверху першої трубки і щільно прикріплюється до неї двома пружинами.

Нижню трубку нещільно заповнюють 50-60 мг свинцево-ацетатної вати або поміщають невеликий ватний тампон і скручену трубочкою смужку свинцево-ацетатного паперу масою 50-60 мг. Між плоскими поверхнями трубок поміщають шматочок ртутно-бромідного паперу такого розміру, щоб закрити отвір трубки (15*15) мм.

0,1 г вмісту капсули поміщають у конічну колбу і розчиняють у 25 мл води. Додають 15 мл кислоти хлористоводневої, 0,1 мл розчину олова (II) хлориду, 5 мл розчину калію йодиду, залишають на 15 хв і потім додають 5 г цинку активованого. негайно сполучають дві частини приладу, колбу поміщають у водяну баню, температура якої підтримується такою, щоб забезпечити рівномірне виділення газу.

Паралельно за цих самих умов проводять дослід з еталоном, що складається з 1 мл еталонного розчину арсену (1 ppm As) і 24 мл води.

Не менш як через 2 год забарвлення ртутно-бромідного паперу, одержане в досліді з випробовуваним розчином, має бути не інтенсивнішим за забарвлення ртутно-бромідного паперу, одержаного в досліді з еталоном.

Кальцій

0,1 г вмісту капсули розчиняють у 15 мл води.

До 0,2 мл еталонного розчину кальцію спиртового (100 ppm Ca) додають 1 мл розчину амонію оксалату. Через 1 хв додають суміш 1 мл кислоти оцтової розведеної і 15 мл розчину тирозину у дистильованій воді, струшують.

Паралельно за цих самих умов готують еталон, використовуючи суміш 1 мл кислоти оцтової розведеної, 10 мл еталонного розчину кальцію водного (100 ppm Ca) і 5 мл води дистильованої.

Через 15 хв опалесценція випробовуваного розчину не має перевищувати опалесценцію еталона.

Хлориди

0,1 г вмісту капсули розчиняють у 15 мл води, додають 1 мл кислоти азотної розведеної і виливають суміш за один раз у пробірку, що містить 1 мл розчину срібла нітрату.

Паралельно за цих самих умов готують еталон, використовуючи замість 15 мл випробовуваного розчину 10 мл еталонного розчину хлориду (5 ppm Cl) і 5 мл води. Пробірки поміщають у захищене від світла місце. Через 5 хв пробірки переглядають на чорному фоні горизонтально. Опалесценція випробовуваного розчину не має перевищувати опалесценцію еталона.

Фториди

0,1 г вмісту капсули, 0,1 г піску, промитого кислотою, і 20 мл суміші рівних об'ємів кислоти сірчаної і води поміщають у внутрішню пробірку приладу. Оболонку, заповнену тетрахлоретаном, нагрівають до температури кипіння 146 °C. Приєднують генератор водяної пари і відганяють вміст пробірки з перегрітою водяною парою, збираючи відгін у мірну колбу місткістю 100 мл, яка містить 0,3 мл 0,1 М розчину натрію гідроксиду і 0,1 мл розчину фенолфталеїну. Об'єм розчину в пробірці під час відгону має бути постійним (20 мл). Підтримують лужну реакцію

вмісту мірної колби, якщо необхідно, додаючи краплями 0,1 М розчин натрію гідроксиду. Доводять об'єм розчину водою до позначки і перемішують (випробовуваний розчин).

Паралельно за цих самих умов готують еталон, використовуючи замість лікарського засобу 5 мл еталонного розчину фториду (10 ppm F).

У циліндр із скляною притертою пробкою поміщають 20 мл випробовуваного розчину, в другий такий самий циліндр – 20 мл еталона, потім у кожний циліндр додають по 5 мл реактиву амінометилалізариндіоцтової кислоти.

Через 20 хв синє забарвлення випробовуваного розчину, що зявилося замість первісного червоного, має бути не інтенсивнішим за забарвлення еталона.

Магній

0,1 г вмісту капсули розчиняють у 10 мл води, додають 0,1 г динатрію тетраборату. Визначають рН розчину і, якщо необхідно, доводять до рН 8,8-9,2, використовуючи кислоту хлористоводневу розведену або розчин натрію гідроксиду розведений. Розчин поміщають у ділильну лійку, струшують протягом 1 хв з двома порціями, по 5 мл кожна, розчину 1 г/л гідроксихіноліну у хлороформі, залишають до розшарування і відкидають органічний шар. До водного шару додають 0,4 мл бутила міну і 0,1 мл триетаноламіну. Визначають рН розчину і, якщо необхідно, доводять до рН 10,5-11,5. Додають 4 мл розчину 1 г/л гідроксихіноліну у хлороформі, струшують протягом 1 хв, залишають до розшарування, нижній шар відбирають і використовують для випробування.

Паралельно за цих самих умов готують еталон, використовуючи замість 10 мл розчину випробовуваної речовини суміш 1 мл еталонного розчину магнію (10 ppm Mg) та 9 мл води.

Забарвлення випробовуваного розчину має бути не інтенсивніше за забарвлення еталона.

Магній і лужноземельні метали

До 200 мл води додають 0,1 г гідроксиламіну гідрохлориду, 10 мл аміачного буферного розчину рН 10,0, 1 мл 0,1 М розчину цинку сульфату і близько 15 мг індикаторного суміші протравного чорного. Нагрівають до температури близько 40

⁰С. Одержаний розчин титрують 0,01 М розчином натрію едетату до переходу забарвлення розчину від фіолетового до синього. До одержаного розчину додають 0,1 г вмісту капсули, розчиненого в 100 мл води. Якщо забарвлення розчину стає фіолетовим, знову титрують до переходу забарвлення розчину до синього.

Об'єм 0,01 М розчину натрію едетату, витрачений на друге титрування, не має перевищувати об'єм титранту, зазначений в окремій статті.

Залізо

0,1 г вмісту капсули розчиняють у 10 мл води і перемішують. Додають 2 мл розчину 200 г/л кислоти лимонної і 0,1 мл кислоти тіогліколевої. Перемішують, підлужують розчином аміаку, доводять об'єм розчину водою до 20 мл.

Паралельно за цих самих умов готують еталон, використовуючи 10 мл еталонного розчину заліза. Через 5 хв рожеве забарвлення випробовуваного розчину має бути не інтенсивнішим за забарвлення еталону.

Сульфати

До 1,5 мл еталонного розчину сульфату (10 ppmSO₄) додають 1 мл розчину 250 г/л барію хлориду. Струшують і залишають на 1 хв, потім додають 15 мл випробовуваного розчину (0,1 г вмісту капсули розчиняють у 15 мл води дистильованої) та 0,5 мл оцтової кислоти.

Паралельно за цих самих умов готують еталон, використовуючи замість випробовуваного розчину 15 мл еталонного розчину сульфату. Через 5 хв опалесценція випробовуваного розчину не має перевищувати опалесценцію еталона.

Фосфати

До 100 мл приготованого і, якщо необхідно, нейтралізованого розчину вмісту капсули додають 4 мл сульфомолібденового реактиву. Струшують і додають 0,1 мл розчину олова хлориду.

Паралельно за цих самих умов готують еталон, використовуючи замість 100 мл розчину випробовуваної речовини суміш 2 мл еталонного розчину фосфату і 98 мл води. Через 10 хв порівнюють забарвлення 20 мл кожного розчину.

Забарвлення випробовуваного розчину має бути не інтенсивнішим за забарвлення еталона.

Калій

До 10 мл розчину лікарського засобу додають 2 мл свіжоприготовленого розчину 10 г/л натрію тетрафенілборату.

Паралельно за цих самих умов готують еталон, використовуючи замість 10 мл розчину випробовуваної речовини суміш 5 мл еталонного розчину калію і 5 мл води.

Забарвлення випробовуваного розчину має бути не інтенсивнішим за забарвлення еталона.

Алюміній

Розчин випробовуваної речовини поміщають у ділильну лійку, струшують з двома порціями, по 20 мл кожна, розчину 5 г/л гідроксихіноліну у хлороформі, потім з 10 мл цього самого розчину. Хлороформні шари відділяють і збирають у мірну колбу місткістю 50,0 мл. Доводять об'єм розчину хлороформом до позначки і перемішують.

Еталон готують аналогічно.

Холостий розчин готують аналогічно.

Вимірюють інтенсивність флуоресценції випробовуваного розчину етанолу і холостого розчину, використовуючи збуджуваче випромінювання за довжини хвилі 392 нм і вторинним за довжини хвилі 518 нм, або монохроматор, установлений на пропускання цієї довжини хвилі.

Флуоресценція випробовуваного розчину не має перевищувати флуоресценцію еталона.

Цинк

До 10 мл розчину випробовуваної речовини додають 2 мл розчину кислоти хлористоводневої і 0,2 мл розчину калію фероціаніду.

Паралельно готують еталон з використанням замість випробовуваного розчину 10 мл еталонного розчину цинк-іона (5 ppm Zn), який готують шляхом розведення водою у 1000 разів еталонного розчину цинку (5 мг/мл Zn).

Через 10 хв опалесценція випробовуваного розчину не має перевищувати опалесценцію еталона.

4. Важкі метали

Визначення проводять згідно ДФУ п. 2.4.8. [127]

Випробовуваний розчин. 0,1 г вмісту капсул розчиняють у 12 мл води.

Розчин порівняння (еталон). Змішують 10 мл еталонного розчину свинцю (1 ppm) Р, і 2 мл водного розчину випробовуваного лікарського засобу.

Холостий розчин. Змішують 10 мл води Р і 2 мл зазначеного водного розчину випробовуваного лікарського засобу.

До кожного розчину додають 2 мл буферного розчину (рН 3.5) Р. Перемішують і додають 1.2 мл тіоацетамідного реактиву Р, негайно перемішують. Через 2 хв розчини тестують. Придатність системи: розчин порівняння повинен мати світло-коричневе забарвлення при порівнянні з холостим розчином.

Результат: коричневе забарвлення випробовуваного розчину має бути не більш інтенсивним за забарвлення розчину порівняння, що свідчить про наявність важких металів у кількості не більше 0,001%. Якщо результат випробування складно оцінити, розчини фільтрують крізь мембранний фільтр (номінальний розмір пір 0.45 мкм). Тиск на поршень шприца має бути помірним і постійним для забезпечення повільного і рівномірного фільтрування. Порівнюють плями на фільтрах, одержані для різних розчинів.

5. рН. (ДФУ 2.2.3) [127]

Випробовуваний розчин: 1 г вмісту капсул розчиняють у 9 мл води дистильованої. Потенціометричне визначення рН випробовуваного розчину проводять шляхом вимірювання різниці потенціалів між двома відповідними електродами, зануреними у випробовуваний розчин: один з електродів чутливий до іонів водню (звичайно скляний електрод), другий – електрод порівняння (наприклад, насичений каломельний електрод).

Усі виміри проводять при тій самій температурі в інтервалі від 20 °С до 25 °С. рН має становити від 5,5 до 7,0 [122].

6. Розчинення (ДФУ 2.9.3) [127]

900 мл води Р (± 1 %) поміщають у посудину. Збирають прилад з кошиком, нагрівають воду до температури (37 ± 0.5) °С і видаляють термометр.

1 капсулу поміщають у прилад, уникаючи утворення бульбашок повітря на поверхні капсули. Починають обертання перемішуючого елемента із швидкістю 100 об/хв.

Відбір проб проводять через 45 хв з області посередині між поверхнею середовища розчинення і верхньою частиною кошика, що обертається. У ході випробування посудину закривають і контролюють температуру води. Аналіз проби проводять, використовуючи метод кількісного визначення (п. 8). Повторюють випробування із 5 іншими капсулами.

Кількість тирозину, що перейшов у розчин з кожної капсули через 45 хв, має бути не менше 75% і не більше 115%, від зазначеного у розділі «Склад», тобто кількість тирозину у розчині має складати від 0,3 до 0,460 г.

7. Розпадання (ДФУ 2.9.1) [127]

Випробування на розпадання дозволяє визначити, чи розпадаються капсули в межах визначеного часу, якщо вони поміщені в рідке середовище в експериментальних умовах.

Головна частина обладнання складається з жорсткого кошика із сітчастим дном-підставкою (кошик), яка підтримує шість циліндричних скляних трубочок, які підтримуються у вертикальному положенні двома пластмасовими дисками з 6 рівномірно розміщеними отворами. До нижньої частини диску прикріплена проволочна сітка із нержавіючої сталі з розміром отворів 2 мм.

У кожному з шести трубок поміщають одну капсулу, і якщо зазначено, поміщають диск. Опускають кошик у посудину з водою. Температура води має становити від 35 °С до 39 °С.

Вмикають прилад, по закінченні 30 хв кошик виймають і досліджують стан капсул.

Вважають, що зразки розпалися, якщо на сітці:

- а) немає залишку;
- в) є залишок, який складається з м'якої маси, що не має відчутно твердого ядра, котре не змочується;

с) є лише фрагменти оболонки на сітці, або, якщо були використані диски, фрагменти оболонки, які прилипли до нижньої поверхні диска.

Препарат витримав випробування, якщо всі капсули розпалися.

8. *Втрата в масі при висушуванні* (2.2.32) [127].

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

9. *Мікробіологічна чистота.*

Визначення проводять згідно ДФУ п. 2.6.12, 2.6.13; N;5.1.4, N (категорія 3 А) [127].

Визначення мікробіологічної чистоти здійснюють методом висіву на чашки Петрі. Висів можна здійснювати глибинним або поверхневим способом.

Відбирають середню пробу лікарського засобу, яка складається з рівних разових проб (по 0,1 г), взятих з 10 різних капсул.

Готують розведення лікарського засобу 1:10. 1 г лікарського засобу розчиняють у 10 мл буферного розчину із натрію хлоридом і пептоном рН 7,0. Далі готують ще 5 десятикратних серійних розведень, використовуючи той самий розчинник.

Метод глибинного висівання (ДФУ п. 2.6.12): у кожену чашку Петрі вносять 1 мл останнього розведення і 15-20 мл розплавленого густого поживного середовища для вирощування бактерій (МПА) або для грибів (середовище Сабуро). Температура середовища має становити не більше 45°С. Роблять посів на дві чашки Петрі з кожним середовищем. Посіви інкубують при температурі від 30°С до 35°С для бактерій та від 20°С до 25°С для грибів протягом п'яти діб.

Обчислюють середнє арифметичне значення числа колоній, які вирости, і визначають число колонієутворюючих одиниць у 1 грамі.

Метод поверхневого висівання: 0,1 мл останнього розведення розподіляють по поверхні поживного середовища для вирощування бактерій (МПА) або для грибів (середовище Сабуро). Роблять посів на дві чашки Петрі з кожним середовищем. Посіви інкубують при температурі від 30°С до 35°С для бактерій та від 20°С до 25°С для грибів протягом п'яти діб.

Обчислюють середнє арифметичне значення числа колоній, які вирости, і визначають число колонієутворюючих одиниць у 1 грамі.

Лікарський препарат має відповідати таким вимогам щодо мікробіологічної чистоти:

- Загальне число життєздатних аеробних мікроорганізмів - не більше 10^3 бактерій і не більше 10^2 грибів у грамі або мілілітрі;

- Відсутність бактерій родини *Enterobacteriaceae* в 1 г або 1 мл;

- Відсутність *Pseudomonas aeruginosa* в 1 г або 1 мл;

- Відсутність *Staphylococcus aureus* в 1 г або 1 мл.

Також проводять випробування на окремі види мікроорганізмів.

Родина *Enterobacteriaceae*

Спочатку готують розведення лікарського засобу 1:10. 1 г лікарського засобу розчиняють у 10 мл буферного розчину із натрію хлоридом і пептоном рН 7,0, далі переносять у 100 мл поживного середовища № 3 (середовище збагачене для бактерій род. *Enterobacteriaceae*), гомогенізують і інкубують при температурі 35-37°C впродовж 18-48 год. Якщо спостерігаються ознаки помутніння, бродіння, то роблять пересів на чашки Петрі з густими поживними середовищами №4(агар Ендо) і №5(вісмутсульфітний агар). Посіви інкубують при температурі 35-37°C протягом 24-48 год.

Наявність на середовищах характерного росту грамнегативних паличок, вказує на забруднення лікарського засобу бактеріями родини *Enterobacteriaceae* та деякими іншими грамнегативними бактеріями:

- середовище № 4: круглі малинові з металевим блиском або без нього колонії; рожеві, безбарвні, блискучі опуклі колонії діаметром від 2 мм до 4 мм;

- середовище № 5: чорні з металевим блиском колонії, ділянки середовища під якими забарвлені в чорний колір; зеленувато-бурі, ясно-зелені, бурі колонії.

Для ідентифікації бактерій род. *Enterobacteriaceae* підозрілі колонії, кожену окремо, пересівають на середовище № 1 (МПА), скошене в пробірках, і інкубують при температурі від 35 до 37 °C протягом 18-24 год. Після закінчення періоду

інкубації підтверджують чистоту кожної культури і проводять тест на наявність цитохромоксидази. Культури, що дали негативну реакцію на цитохромоксидазу, пересівають, кожен окремо, у дві пробірки з рідким живильним середовищем № 6 (для визначення ферментації глюкози) і одну пробірку з рідким середовищем №7 (для визначення відновлення нітратів у нітрити). Після висівання в одну із двох пробірок із середовищем № 6 вносять близько 0.5 мл стерильного вазелінового масла. Усі посіви інкубують при температурі від 35 ° до 37 °С протягом 18-24 год. У випадку зміни кольору середовища № 6 із червоного на жовтий і, як правило, наявності газоутворення в пробірках з вазеліновим маслом і без нього роблять висновок про ферментацію глюкози. Про наявність нітриту на середовищі № 7 судять із появи червоного забарвлення при внесенні у середовище реактива Грісса. Лікарський засіб витримує випробування, якщо на середовищах не виявлений ріст грамнегативних неспороутворюючих паличок, що дають негативну оксидазну реакцію, ферментують глюкозу з утворенням кислоти (або кислоти і газу) і відновлюють нітрати у нітрити.

Тест на наявність цитохромоксидази. Смужку фільтрувального паперу змочують реактивом на цитохромоксидазу і наносять скляною паличкою чисту добову культуру випробовуваних бактерій, що виростили на середовищі № 1. Синє забарвлення, що з'являється через 2-5 хв, свідчить про позитивну реакцію на цитохромоксидазу.

Staphylococcus aureus

Спочатку готують розведення лікарського засобу 1:10. 1 г лікарського засобу розчиняють у 10 мл буферного розчину із натрію хлоридом і пептоном рН 7,0, переносять у 100 мл рідкого середовища №8 (для вирощування *Pseudomonas aeruginosa* і *Staphylococcus aureus*), гомогенізують і інкубують при температурі 35-37°С впродовж 18-48 год.

Якщо спостерігаються ознаки помутніння, бродіння, то роблять пересів на чашку з густим поживним середовищем №10 (для ідентифікації *Staphylococcus aureus*) і інкубують при температурі 35-37°С протягом 24-48 год.

Ріст золотаво-жовтих колоній (рис. 9.4), оточених жовтими зонами (що свідчить про ферментацію маніту), указує на можливість забруднення лікарського засобу *S. aureus*.

У цьому випадку роблять пересівання підозрілих колоній, кожної окремо, у пробірки з скошеним густим середовищем № 1 і інкубують при температурі від 35 °С до 37 °С протягом 18-24 год. Колонії, що виростили на середовищі № 1, мікроскопують і при виявленні у мазках тільки грампозитивних коків, розташованих гронами, проводять тест на плазмокоагулазу. Лікарський засіб витримує випробування, якщо на середовищах не виявлений ріст грампозитивних коків, що ферментують маніт і дають позитивну реакцію плазмокоагуляції.

Тест на плазмокоагулазу (реакція плазмокоагуляції). Кров, узятую стерильним шприцом із серця кролика, поміщають у 5 % стерильний розчин натрію цитрату, відбирають плазму, розводять у співвідношенні 1:5 стерильним розчином 9 г/л натрію хлориду і розливають по 0.5 мл у стерильні пробірки. У кожну пробірку поміщають 1 петлю чистої добової культури стафілокока, що виростила на середовищі № 1, і інкубують при температур від 30 ° до 35 °С 4-6 год. Якщо протягом цього часу не спостерігається згортання плазми, реакція плазмокоагуляції вважаються негативною.

Pseudomonas aeruginosa

Спочатку готують розведення лікарського засобу 1:10. 1 г лікарського засобу розчиняють у 10 мл буферного розчину із натрію хлоридом і пептоном рН 7,0. 10 мл розведення лікарського засобу вносять у 100 мл поживного середовища №8, гомогенізують і інкубують при температурі 35-37°С впродовж 18-48 год.

Якщо спостерігаються ознаки помутніння, бродіння, то роблять пересів на чашку з густим поживним середовищем №9 (для виявлення пігменту піоціаніну) і інкубують при температурі 35-37°С протягом 24-48 год.

Ріст зеленуватих, як правило, флуоресціюючих колоній, блакитних в ультрафіолетовому світлі (що свідчить про наявність пігменту піоціаніну), указує на можливість забруднення лікарського засобу *P. aeruginosa*. У цьому випадку роблять пересівання підозрілих колоній, кожної окремо, в пробірки із скошеним густим

середовищем № 1 й інкубують при температурі від 35 ° до 37 °С протягом 18-24 год. Колонії, що виростили на середовищі № 1, мікроскопують, при виявленні у мазках тільки грамнегативних паличок, проводять тест на цитохромоксидазу. Лікарський засіб витримує випробування, якщо на середовищах не виявлений ріст грамнегативних паличок, що утворюють синьо-зелений пігмент піоціанін і дають позитивну реакцію на цитохромоксидазу.

7. Однорідність маси (ДФУ 2.9.5) [127].

Відбирають 20 капсул за статистично обгрунтованою схемою. Зважують нерозпаковану капсулу. Потім розпаковують капсулу в такий спосіб, щоб не було втрачено будь-якої частини оболонки, і видаляють якомога повніше її вміст. Потім зважують оболонку. За різницею зважувань розраховують масу вмісту капсули. Повторюють процедуру з іншими 19 капсулами. Далі розраховують середню масу. Препарат витримує випробування, якщо не більше двох індивідуальних мас відхиляються від середньої маси на величину, яка перевищує 7,5%. При цьому жодна індивідуальна маса не має відхилитися від середньої маси на величину, що перевищує 15%.

8. Кількісне визначення [127].

Визначають вміст тирозину у капсулах відповідно до вимог, зазначеними в ДФУ 1.1. Відбирають 10 капсул за статистично обгрунтованою схемою.

Кількісне визначення тирозину у капсулах проводять за допомогою високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ).

Розпаковують капсулу в такий спосіб, щоб не було втрачено її вмісту, і видаляють якомога повніше її вміст. 0,1 г (точне зважування) вмісту капсули розчиняють у 10 мл води, розбавляють 1,0 н НСІ у співвідношенні 1:1 і витримують при температурі 37 °С і 200 об/хв протягом години для забезпечення повного розчинення L-тирозину. Далі суміш розбавляють в межах норм калібрування 0,1 н НСІ, перемішують і центрифугують при 13200 об/хв протягом 10 хв.

Концентрацію тирозину у розчині визначають методом ВЕРХ на колонці Agilent серії 1100. Елюювання здійснюють лінійним градієнтом 0,1% трифтороцтової кислоти (ТФО) та ацетонітрилу. Здійснюють елюцію сумішшю 95%

водного розчину ТФО і 5% ацетонітрилу протягом перших 3 хв, далі концентрацію ацеонітрилу лінійно збільшують до 70% з 3 до 10 хвилини. Детектування здійснюється УФ-детектором (Agilent Eclipse +C18) при довжині хвилі 220 нм [57].

Повторюють аналіз для 9 інших капсул.

Лікарський засіб витримує випробування (ДФУ 2.9.6.), якщо вміст не більше ніж в одній капсулі виходить за межі 85-115 % і в жодній капсулі не виходить за межі 75—125 % від середнього вмісту лікарського засобу. Лікарський засіб не витримує випробування, якщо вміст більше ніж у трьох одиницях виходить за межі 85—115 % від середнього вмісту або якщо хоча б в одній одиниці виходить за межі 75—125 % від середнього вмісту. Якщо вміст у двох або трьох одиницях лікарського засобу виходить за межі 85—115 %, але знаходиться у межах 75—125 %, визначають вміст у кожній з 20 додаткових капсул. Лікарський засіб витримує випробування, якщо середній вміст не більш ніж у трьох з проаналізованих капсул виходить за межі 85—115 % і в жодній одиниці не виходить за межі 75—125 % від середнього вмісту.

Отже, вміст тирозину у капсулі повинен не більше ніж в одній капсулі виходити за межі 85-115 % і в жодній капсулі не виходити за межі 75—125 % від кількості, зазначеної в розділі "Склад". Кожна капсула з дозуванням 0,4 г повинна містити від 0,340 до 0,460 г тирозину.

3.5.4. Розрахунок річної потужності та кількості серій на рік

Річна потужність біосинтезу тирозину складає 4145,9 кг (4145900 г).

Вміст тирозину в 1 капсулі дорівнює 400 мг (0,4 г). Отже, на рік необхідно виготовити $4145900/0,4=10364750$ капсул.

Продуктивність капсулонаповнювальної машини складає 25000 капсул на годину. Прийmemo час роботи машини 8 годин. Отже, за один цикл наповнюється $25000*8=200000$ капсул. У 1 флакон фасується 90 капсул, тоді кількість флаконів на 1 серію складає 2222.

Тоді кількість серій на рік складає $10364750/200000=52$ серії.

3.5.5. Обґрунтування вибору класів чистоти виробничих приміщень

Однією з найважливіших вимог виробництва якісної продукції є забезпечення якості препаратів за рахунок виконання принципів і правил GMP.

Для виробництва капсул необхідне створення приміщень класу чистоти D, що є необхідною умовою для забезпечення стабільності препарату та його тривалого терміну придатності, для захисту продукту від мікроорганізмів.

Приміщення для виробництва і контролю якості лікарських засобів:

- повинні використовуватися тільки за призначенням;

- повинні бути досить просторими і обладнані таким чином, щоб звести до мінімуму ризик змішування різних лікарських засобів і їх компонентів, перехресне забруднення, пропуск однієї стадії в процесі виготовлення лікарських засобів і контролю їх якості;

- повинні мати гладкі внутрішні поверхні (стіни, підлоги, стелі, двері) з мінімальною кількістю виступаючих частин і ніш, повинні бути непроникні для рідин та легко доступними для миття та обробки дезінфікуючими засобами. Матеріали, що застосовуються при обробці виробничих приміщень, повинні легко митися, бути негорючими і стійкими до дії дезінфікуючих засобів;

- трубопроводи, освітлювальні елементи, вентиляційні отвори і т.д. повинні бути спроектовані і розташовані таким чином, щоб їх можна було легко мити і обробляти дезінфікуючими засобами. Для проведення технічного обслуговування доступ до них повинен здійснюватися, по можливості, поза виробничими приміщеннями;

- повинні міститися в бездоганній чистоті, піддаючись обов'язковому щоденному, а також генеральному прибиранню і періодичному ремонту згідно з відповідними письмовими інструкціями. У цих приміщеннях повинен регулярно проводитися контроль за санітарно-гігієнічним станом під час роботи і в стані спокою, щоб гарантувати відповідність контрольованих параметрів нормам, встановленим у відповідних інструкціях підприємства;

- можуть піддаватися УФ-опроміненню для знезараження повітря за допомогою стаціонарних або переносних облучателей (в присутності і у відсутності людей);

- повинні містити мінімально необхідну для ведення виробничого процесу кількість обладнання і меблів;

- повинні мати освітлення, температурний режим, вологість повітря і вентиляцію, що не роблять прямого або непрямого негативного впливу на якість готових продуктів під час їх виробництва, а також на функціонування обладнання та здоров'я персоналу;

- повинні мати локальне устаткування, що видаляє пил в місцях її утворення (під час відбору проб, зважування, змішування і т.п.).

Приміщення для пакування лікарських засобів повинні:

- бути достатньо просторими, щоб можна було правильно організувати технологічні операції і не захаращувати проходи для переміщення матеріалів;

- мати обладнання, розташоване таким чином, щоб усунути небезпеку змішування продуктів, особливо на різних етапах упаковки лікарських засобів, а також пакувальних матеріалів;

- мати освітлення, температурний режим, вологість повітря і вентиляцію, які не мають шкідливого впливу на якість продукту під час упаковки, а також на функціонування обладнання.

Приміщення для зберігання (склади) повинні:

- бути достатньо просторими для проведення розтарування і забезпечення упорядкованого і роздільного зберігання вихідної сировини, допоміжних, пакувальних і маркувальних матеріалів, напівпродуктів, готових лікарських засобів, що знаходяться на карантині, дозволених до реалізації та / або забракованих;

- забезпечувати надійний захист від розкрадань і випадкового або зловмисного забруднення або зараження;

- відповідати чинним правилам зберігання та поводження з легкозаймистими та вибуховими продуктами виробництва, токсичними і наркотичними речовинами;

- бути чистими, сухими і мати необхідні освітлення, вентиляцію, температуру і вологість повітря.

3.5.5.1. Підготовка персоналу та одягу

На підприємстві має бути необхідна кількість персоналу, що має відповідну освіту і здатна виконувати виробничі операції або операції з контролю якості, що є однією з умов створення і підтримування на належному рівні системи забезпечення якості. Весь персонал повинен бути зацікавлений в отриманні готового продукту високої якості.

У посадових інструкціях підприємства повинні бути відображені виробничі завдання (права і обов'язки) всіх співробітників, в тому числі керівного персоналу, і області їх відповідальності.

Кожен співробітник повинен бути ознайомлений з основними положеннями GMP, що безпосередньо відносяться до його виробничої діяльності. На початку і протягом подальшої роботи кожен співробітник повинен пройти курс навчання основам GMP, що включає в себе також необхідні знання з гігієни.

Навчання на фармацевтичному підприємстві повинно проводитися згідно з письмовою програмою навчання всіх співробітників, що працюють безпосередньо на виробництві або в контрольних лабораторіях, включаючи осіб, що займаються технічними питаннями, обслуговуванням устаткування, прибиранням приміщень.

При прийнятті на роботу персонал повинен пройти підготовку за фахом, включаючи ознайомлення з правилами GMP. Періодично персонал повинен проходити перепідготовку. На підприємстві повинна зберігатися документація, яка містить відомості про проходження навчання кожним співробітником протягом усього часу його роботи на підприємстві.

Персонал, що працює в особливо небезпечних для здоров'я приміщеннях з високоактивними, токсичними, летючими речовинами, а також з ін'єкційними препаратами, повинен проходити додаткову підготовку за спеціальною програмою.

Людей, які не пройшли спеціальну підготовку, не слід допускати до виробничих приміщень. В окремих випадках, якщо це необхідно, вони повинні бути проінструктовані заздалегідь про правила поведінки на виробництві.

Особлива увага повинна приділятися підготовці персоналу, що працює в "чистих" приміщеннях. Персонал повинен володіти знаннями і досвідом,

необхідними для виробництва стерильних лікарських засобів, в тому числі знаннями з гігієни та основ мікробіології.

На кожному фармацевтичному підприємстві повинна бути складена докладна програма з гігієни, що включає правила дотримання персоналом особистої гігієни, правила гігієни праці та правила використання та носіння технологічного одягу. Ці правила повинні бути зрозумілі кожному співробітнику і точно дотримуватися.

При надходженні на роботу персонал повинен пройти медичне обстеження. Весь персонал, зайнятий безпосередньо на виробництві, включаючи тимчасово працюючих, повинен проходити регулярні медичні огляди. Персонал, який здійснює візуальний контроль, повинен проходити регулярні огляди лікарями-окулістами.

До роботи, пов'язаної з виготовленням, контролем або зберіганням лікарських засобів, не повинні допускатися носії патогенної мікрофлори і люди, які страждають на алергічні та шкірні захворювання. Тимчасово, до нормалізації стану здоров'я, до роботи не повинні допускатися хворі на інфекційні захворювання або співробітники, які мають ушкодження шкіри різного ступеня.

Персонал, зайнятий в процесі виробництва лікарських засобів, повинен строго дотримуватися інструкції, які регламентують стан здоров'я і вимоги особистої гігієни.

Персонал повинен доводити до відома свого керівника про будь-які захворювання (шкірні, гострі респіраторні та інші захворювання), здатні негативно впливати на якість лікарських засобів.

Персонал не повинен торкатися руками до вихідної сировини, допоміжних матеріалів, матеріалів первинної упаковки, напівпродуктів і, крім того, до деяких частин обладнання, якщо це не передбачено чинною технологічною документацією.

Забороняється приймати їжу, пити, палити, а також зберігати їжу, курильні матеріали і особисті ліки в виробничих приміщеннях і на складах.

Всі люди, що входять у виробничі приміщення, незалежно від того, тимчасово або постійно вони працюють, а також відвідувачі і інспектори повинні суворо дотримуватися правил особистої гігієни, включаючи носіння захисного одягу.

Кожна людина, що входить в виробничі приміщення, повинен бути одягнений в спеціальний одяг. У приміщеннях класу чистоти D слід використовувати комбінезон, куртку і штани або халат; шапочку або косинку з бавовняних або лляних тканин; відповідне взуття або бахіли, що одягаються зверху на взуття (перехідний одяг).

Робота повинна проводитися в стерильних рукавичках з гуми або еластичних полімерів, а також в простерилізованій або продезінфікованій взуття. Зверху на взуття повинні бути надіті бахіли, що повністю закривають ступню. Нижня частина штанів повинна бути заправлена в бахіли, а рукави комбінезона - в рукавички.

Жодна частина тіла або нижньої білизни не повинна бути відкрита. Одяг повинен бути зручним для роботи і приганяє по фігурі.

Технологічний одяг для роботи в приміщеннях класів чистоти A, B, C і D при виробництві стерильних лікарських засобів повинна бути виготовлена з матеріалу, що відповідає гігієнічним вимогам і володіє мінімальним ворсовідділенням.

В окремих випадках при виробництві нестерильних лікарських засобів в приміщеннях класу чистоти C кожному працівнику, що знову входить або повертається в ці приміщення, слід видавати стерильний комплект технологічного одягу одноразового або багаторазового використання. При вході або повернення в приміщення класу чистоти D допускається використання свіжовипраного комплекту технологічного одягу.

Технологічний одяг необхідно прати або чистити таким чином, щоб він не піддався додатковому забрудненню.

Чистий або стерильний одяг повинен зберігатися в умовах, що запобігають його забрудненню.

Передача технологічного одягу в приміщення підготовки персоналу повинна здійснюватися, як правило, через повітряний шлюз.

Рукавички і руки під час роботи слід регулярно обробляти дезінфікуючими засобами [128].

3.5.5.2. Підготовка дезінфікуючих засобів

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

Необхідно чергування дезінфікуючих засобів для запобігання стійких форм мікроорганізмів. Бажано використання спороцидних дезінфікуючих засобів. Дезінфікуючі розчини повинні бути стерильні. Щоб уникнути зростання мікроорганізмів розбавлені розчини слід зберігати обмежений час в заздалегідь вимитих ємкостях. Частково заповнені ємності можна доливати свіжоприготовленими розчинами.

Для дезінфекції обладнання застосовують 3 та 6% розчин перекису водню, який у концентрації 3% має бактерицидну та фунгіцидну дію, а в концентрації 6% - спороцидну. А також використовують 76% розчин спирту етилового.

Також необхідно обрати дезінфікуючі засоби для обробки поверхонь. Порівняння дезінфікуючих засобів для обробки поверхонь приміщень наведено у *табл. 3.8*.

Таблиця 3.8

Порівняння дезінфікуючих засобів для поверхонь [129]

Дез. засіб	Діюча речовина	Властивості	Спектр дії	Вартість за 1 л
Бланідас Актив	третинні аміни, ЧАС	Відсутність запаху, миючі властивості (85%) Термін зберігання невикористаного робочого розчину засобу становить 16 діб.	Має бактерицидну, туберкулоцидну, віруліцидну, фунгіцидну, спороцидну дію	375 грн
Гуасепт	полігексаметиленгу анідину гідрохлорид	Відсутність запаху. Має миючі властивості. Термін зберігання невикористаного робочого розчину засобу становить 60 діб.	Має бактерицидну, туберкулоцидну, віруліцидну, фунгіцидну, спороцидну дію.	371 грн
Хлор Ліквід	гіпохлорит натрію	Має миючі властивості, Термін придатності невикористаних робочих розчинів засобу – 3 доби	Має бактерицидні, віруліцидні, фунгіцидні та спороцидні властивості	62 грн

Дез. засіб	Діюча речовина	Властивості	Спектр дії	Вартість за 1 л
Амісепт	третинні аміни, ЧАС	Відсутність запаху. Має миючі властивості (85%). Термін зберігання невикористаного робочого розчину засобу становить 16 діб.	Має бактерицидну, туберкулоцидну, віруліцидну, фунгіцидну, спороцидну дію	450 грн

Отже, обираємо Гуасепт та Бланідас Актив, оскільки дані засоби мають широкий спектр дії, хороші миючі властивості, а також мають не високу вартість.

Дезінфікуючі засоби необхідно чергувати кожні 3 місяці, щоб не розвивалася резистентність мікроорганізмів.

Для обробки рук персоналу можливе використання засобів, порівняння яких наведено у табл. 3.9.

Таблиця 3.9.

Порівняння дезінфікуючих засобів для рук персоналу

Дез. засіб	Діюча речовина	Властивості	Спектр дії	Вартість за 1 л
АХД 2000 експрес	пропанол-1, пропанол-2, ЧАС	Містить комплекс догляду за шкірою, захищає шкіру рук від сухості і подразнень, зберігає еластичність і природний водно-жировий баланс шкіри	Має віруліцидну (включаючи гепатит В,С, ВІЛ), бактерицидну, туберкулоцидну, фунгіцидну активність.	195 грн

Дез. засіб	Діюча речовина	Властивості	Спектр дії	Вартість за 1 л
Віпасепт	етанол 80%, молочна кислота	Має пролонговану дію протягом 3-х годин (у тому числі під медичними рукавичками). Не викликає подразнень та алергічних реакцій шкіри. Містить систему захисту та пом'якшення шкіри. Забезпечує знежирююче очищення шкіри, сприяє ефективному прилипанню хірургічної плівки	Має бактерицидну, туберкулоцидну, віруліцидну, фунгіцидну дію	170 грн
Мікрасепт	пропанол -1, пропанол -2, ЧАС	Містить комплекс догляду за шкірою, захищає шкіру рук від сухості і подразнень, зберігає еластичність і природний водно-жировий баланс шкіри	Має віруліцидну (включаючи гепатит В,С, ВІЛ), бактерицидну, туберкулоцидну, фунгіцидну активність	258 грн
АХД 2000 ультра	етанол 75%	Не викликає подразнень та алергічних реакцій шкіри. Комплекс догляду за шкірою захищає шкіру рук від сухості і подразнень, зберігає еластичність і природний водно-жировий баланс шкіри. .Засіб володіє пролонгованою дією протягом 3-х годин	Має віруліцидну (включаючи гепатит В,С, ВІЛ), бактерицидну, туберкулоцидну, фунгіцидну активність	246 грн

Отже, найдоцільніше використовувати засіб Віпасепт, оскільки його перевагами є пролонгована дія (протягом 3 годин) та невисока вартість.

3.5.5.3. Підготовка вентиляційного повітря

Потенційним джерелом забруднення лікарських засобів є повітря виробничих приміщень, тому підготовка вентиляційного повітря є дуже важливою стадією.

Атмосферне повітря містить в собі різні частинки органічного і неорганічного походження, вологу та мікроорганізми.

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

Виробничі приміщення повинні мати ефективну систему припливної та витяжної вентиляції з контролюючим повітряний потік обладнанням і приладами для вимірювання температури, вологості, ефективності фільтрації і перепаду тиску на фільтрах.

Продуктивність припливних систем вентиляції та кондиціонування повітря слід визначати, виходячи з умов забезпечення необхідних параметрів повітря в робочій зоні з урахуванням прийнятої схеми організації повітрообміну і класу чистоти приміщення.

Повітрязбірники припливної вентиляції слід розташовувати в місцях з максимальною чистотою повітря з урахуванням напрямків панівних вітрів.

Системи підготовки вентиляційного повітря повинні забезпечувати його чистоту в "чистих" приміщеннях відповідно до таблиці і підтримувати позитивний перепад тиску по відношенню до оточуючих приміщень більш низького класу чистоти. Сусідні приміщення різних класів чистоти повинні мати перепад тиску, як правило, 10-15 Па.

Внутрішні і зовнішні поверхні фільтрокамер і повітропроводів вентиляційних установок "чистих" приміщень повинні мати покриття, що допускає їх обробку дезінфікуючим розчином.

Очищення витяжного повітря повинне здійснюватися через фільтри тонкої очистки для захисту навколишнього середовища від можливих шкідливих викидів з виробничих приміщень.

При необхідності виробничі приміщення повинні бути обладнані системою кондиціонування повітря приточування, яка повинна:

- забезпечувати відповідний ступінь очищення повітря від механічних частинок і мікроорганізмів;

- автоматично регулювати кліматичні параметри (температуру і відносну вологість повітря) для створення найбільш сприятливих умов для технологічного процесу та обслуговуючого персоналу;

- мати високу аеродинамічну стійкість для підтримки оптимального розподілу тиску та інших параметрів повітря в приміщенні і його окремих приміщеннях;

- виключити виникнення статичної електрики і пов'язаного з ним накопичення пилу;

- характеризуватися низьким рівнем шуму під час роботи;

- конструювати з використанням матеріалів і антикорозійного покриття, стійких до дезінфікуючих засобів, і непилящих.

Обов'язковим елементом схеми підготовки повітря є наявність центрального кондиціонера, який є загальним елементом, як для схем індивідуальної підготовки повітря для приміщень одного класу, так і для схем сумісної підготовки повітря для приміщень різного класу чистоти. В кондиціонер поступає повітря після попередньої очистки на фільтрі грубої очистки.

Для продовження терміну експлуатації фільтрів HEPA/ULPA використовують багатоступеневу очистку на фільтрах грубої очистки типу EU 4 в якості яких застосовують мішечні, сухі коміркові фільтри або інші.

Необхідною є наявність системи рециркуляції повітря, яка дозволяє суттєво знизити витрати на багатоступеневу очистку атмосферного повітря.

Кожне чисте приміщення має свою автономну систему термінальної очистки вентиляційного повітря.

Схема очистки повітря наступна. Атмосферне повітря проходить очистку на фільтрах першої ступені, в якості фільтра можливе використання мішечних (виготовлених з хімічного волокна) або коміркових фільтрів типу ФЯПБ, ФЯУБ, ФАРБ, ФЯВБ, які відрізняються природою наповнювача (пінополіуретан, металеві сітки, волокна). Основна функція фільтрів першої ступеню – видалення великих часток пилу для попередження абразивного пошкодження вентилятора. Ефективність очистки повинна складати 70% по часткам Корунда 4 мкм та 35% по

атмосферному пилю для приміщень класу D. Фільтри працюють від початкового опору 50 Па до забивання 100 – 250 Па, після чого можуть регенеруватися але не більше 5 разів.

Для регенерації сухих фільтрів використовують продування або чистку пилососом. Коміркові фільтри миють, а потім сушать. В якості робіт по попередній підготовці проводиться дезінфекція систем повітроводів розчином формаліну [130].

Повітря надходить у фільтр грубого очищення, потім в центральний кондиціонер, де послідовно піддається нагріванню, охолодженню і знову нагріванню, потім надходить в парозволожувач і через вентилятор в фільтр тонкого очищення, потім – в вискоефективний фільтр. Далі повітря надходить в чисті приміщення різних зон А, В, С, D, в свою чергу забезпечені вискоефективними фільтрами фінішного очищення [131].

3.5.6. Обґрунтування вибору підготовки води

Для миття матеріалів первинної упаковки і обладнання повинна використовуватися вода очищена.

Для приготування нестерильних лікарських засобів, останнього ополіскування матеріалів первинної упаковки, обладнання та поверхонь, що контактують з нестерильними лікарськими засобами та напівпродуктами, повинна використовуватися вода очищена.

Устаткування, що застосовується для отримання води очищеної та води для ін'єкцій, має монтуватися і експлуатуватися таким чином, щоб забезпечити отримання необхідної кількості води необхідної якості. Умови отримання, зберігання і розподілу води повинні перешкоджати зростанню мікроорганізмів (переважно за допомогою постійної циркуляції при температурі не нижче 80 ° C).

На стадіях основного виробництва та для проведення ряду допоміжних робіт використовується вода очищена. Джерелом одержання води очищеної є вода питна (водопровідна).

Підготовка очищеної води здійснюється при застосуванні установки для пом'якшення води і установки зворотного осмосу.

На першій стадії вода проходить через пісочний фільтр, де відбувається очищення від механічних домішок, після цього вона потрапляє через вугільний фільтр, що дозволяє знизити концентрацію органічних речовин і хлору, потім вода направляється до установки пом'якшення води.

Пом'якшення – це процес видалення катіонів кальцію й магнію, що спричиняють жорсткість води. Залежно від складу вихідної води й вимог, пропонованих до технологічної води, пом'якшення роблять декількома способами: термічним, хімічним (реагентним), зворотньоосмотичним (мембранним).

Термічний метод пом'якшення води заснований на зниженні розчинності діоксиду вуглецю при підвищенні температури, що приводить до зрушення вуглекислотної рівноваги й утворенню карбонату кальцію, що випадає в осад. Внаслідок високої енергоємності даний спосіб не одержав широкого поширення на території СНД.

Серед реагентних способів пом'якшення води найбільш відомий вапняно-содовий. Пом'якшення води цим способом засновано на переведенні розчинних у ній кальцієвих солей карбонатної (тимчасовий) жорсткості $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ в присутності розрахункової кількості гашеного вапна (гідроксиду кальцію – $\text{Ca}(\text{OH})_2$) у нерозчинну сіль CaCO_3 . Незважаючи на високу результативність знесолення, спосіб не позбавлений недоліків: тривалість процесу формування й осадження осаду, велика витрата реагентів, більші габарити технологічного устаткування.

При використанні іонообмінного способу зниження жорсткості води відбувається за рахунок здатності деяких природних або синтетичних з'єднань, практично нерозчинних у воді, обмінювати іони, що перебувають у їхньому складі, Na^+ або H^+ на іони Mg^{2+} і Ca^{2+} , що спричиняють жорсткість води. Спосіб простий, компактний технічно, дешевий, у зв'язку із чим найпоширеніший [132].

Для остаточної очистки води використовується кілька методів – зворотній осмос, іонний обмін та електродеіонізація.

Іонний обмін є одним з ефективних методів видалення з води аніонів та катіонів. Це одна з найважливіших стадій очищення, яка використовується як етап попереднього очищення, так і для отримання води очищеної. Іонний обмін

заснований на використанні іонітів - сітчастих полімерів різного ступеня зшивання, гелевою мікро- або макропористою структури, ковалентно пов'язаних з іоногенними групами.

Перевагами іонного обміну є малі капітальні витрати, простота, відсутність принципів обмежень для досягнення більшої продуктивності.

Проте цей метод має ряд суттєвих недоліків, що ускладнює його використання:

- Наявність хімічно агресивних реагентів і, відповідно, високі експлуатаційні витрати на їх придбання і зберігання;

- Іонообмінні смоли вимагають частішої регенерації для відновлення обмінної здатності і підвищеної уваги з боку обслуговуючого персоналу;

- Велика кількість хімічно агресивних стічних вод після проведення регенерації фільтрів і ін.

Електродеіонізація є різновидом іонного обміну. Системи електродеіонізації використовують комбінацію смол, вибірково проникних мембран і електричного заряду для забезпечення безперервного потоку (продукту і концентрованих відходів) і безперервної регенерації.

Технологія електродеіонізації має ряд переваг:

- Є неенергоємним процесом;

- Здійснюється безперервна регенерація;

- Не потрібна заміна смоли, оскільки смола не забракне;

- Не зупиняється виробництво води через виснаження смоли;

- Досить низькі витрати на обслуговування;

- Не потрібно хімічних реагентів для регенерації.

Зворотний осмос забезпечує найтонший рівень фільтрації. Зворотньоосмотична мембрана діє, як бар'єр для розчинних солей, неорганічних і органічних молекул, а також для мікроорганізмів і пірогенних речовин. В середньому вміст розчинених речовин після стадії зворотного осмосу знижується до 1-9%, органічних речовин - до 5%, колоїдні частинки, мікроорганізми, пірогени відсутні. Вода, що отримується зворотним осмосом, містить мінімальну кількість загального органічного вуглецю.

Перевагами зворотного осмосу є:

- простота і незалежність від вмісту солі вихідної води,
- низькі енергетичні витрати і значно невисокі витрати на сервіс і технічний догляд,

- Система досить легко піддається мийці, дезінфекції та очищенню, не вимагає використання сильних хімічних реагентів і необхідності їх нейтралізації [133],

- виключна надійність методу, що обумовлює стабільно високу якість демінералізованої води незалежно від сезонних коливань якості вихідної води, технологічних параметрів і «людського фактору»;

- висока економічна ефективність – заміна першого ступеня іонообмінної демінералізації на зворотноосмотичну дозволяє на 90-95% знизити потребу в кислоті і каустику, що по вартості в багато разів перекриває збільшення затрат, зв'язаних з ростом енергоспоживання;

- як і для ультрафільтраційних установок, скорочення виробничих площ, простота експлуатації і автоматизація технологічного процесу [134].

Отже, обираємо для остаточної очистки води зворотній осмос, оскільки він дозволяє максимально очистити воду, є досить простим та надійним методом, а також економічно вигідним.

Воду очищену зберігають в закритих ємкостях, виготовлених з матеріалів, які відповідають нормативним документам і захищають її від чужорідних частинок і мікробіологічних забруднень. Ємкість для зберігання води повинна бути оснащена мішалкою, сорочкою для подачі пару і холодної води, системою зрошування для забезпечення безперервного змочування всієї внутрішньої поверхні ємкості, системою термостатування, гідрофобним повітряним фільтром, підливною мембраною, манометром, системою регулювання рівня.

3.5.7. Вибір технологічних стадій та операцій, обладнання

На *першому етапі технологічного процесу виробництва капсул* готують порошок, що містить діючу та допоміжні речовини, для подальшого наповнення капсул.

Для цього субстанцію тирозину та допоміжні речовини попередньо зважені та просіяні необхідно змішати у реакторі-змішувачі.

На *другому етапі* здійснюють наповнення капсул. Порожні тверді капсули наповнюють на спеціальних наповнювальних автоматах. Наповнення твердих желатинових капсул здійснюється в п'ять операцій: спочатку здійснюється орієнтування порожніх капсул, потім розкриття порожніх капсул, наповнення корпусу капсули здійснюється шляхом подання наповнювача з бункера у дозувальний канал, з якого порошок надходить у корпус капсули. Після цього відбувається з'єднання і закриття тіла і кришечки капсули та викидання наповнених капсул накопичувальний контейнер. Після цього здійснюється глясування капсул та їх запаювання.

Оскільки потужність виробництва капсул не дуже велика, обираємо капсулонаповнювальну машину середньої продуктивності ZANASI 25 (25000 капсул за годину) фірми IMA (Італія) [135] (рис. 3.8).



Рис. 3.8. Капсулонаповнювальна машина ZANASI 25 фірми IMA (Італія)

На *третьому етапі* здійснюється фасування капсул у пластикові флакони на спеціальній автоматичній лінії для фасування капсул фірми КоролевФармТех (Росія) [136].

Дана лінія включає автомат для орієнтації флаконів, автомат для фасування капсул у флакони CVC 1220 (рис. 3.9), який забезпечує 100% гарантовану точність підрахунку капсул в кожний флакон. Установка виготовлена з нержавіючої сталі з поліруванням зварних швів, що виключають можливість забруднення продукту. Машина оснащена системою 3-D зчитування параметрів, яка має захист від запилення. Також машина оснащена системою автоматичного відбраковування неправильно заповнених флаконів. Продуктивність даної машини – до 60 флаконів за хвилину.

Далі лінія включає конвеєрні ваги, автомат для вкладання вати у флакон, автомат для закупорювання флаконів, автомат для запайки мембрани та автомат для нанесення етикетки на флакон.



Рис. 3.9. Автомат для фасування капсул у флакони CVC 1220

На *четвертому етапі* здійснюється пакування флаконів у вторинну упаковку – картонні пачки.

Пакування здійснюється за допомогою картонажної машини CVC 1600, яка формує пачку, поміщає в картонну пачку інструкцію і флакон, наносить на клапан картонної пачки маркування (дату, фармкод), закриває заповнену картонну пачку.

Дана машина компактна, має високу точність упаковки флакона в картонну пачку. Продуктивність даної машини 20-60 упаковок за хвилину.

На *п'ятому етапі* здійснюється пакування пачок у групову тару.

Обираємо машину для упаковки пачок в картонні коробки Romaco Promatic PAK 100 (Італія) [137]. Для кожного робочого процесу (групування коробок, транспортування згрупованих коробок і подальша упаковка в короб) відведена окрема робоча зона, що дозволяє відстежувати критичні операції і, відповідно, знижувати час простоїв машини до мінімуму. Оператор вручну формує і встановлює короб в машину. Групування і укладання коробок виконується в автоматичному режимі. Продуктивність – 5 коробок на хвилину. Також перевагами даної машини є:

- Компактність;
- Невисока вартість;
- Проста конструкція і управління;
- Відповідність європейським директивам з безпеки.

РОЗДІЛ 4. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ ТА ОТРИМАННЯ СУБСТАНЦІЇ ТИРОЗИНУ

4.1. Специфікація обладнання ділянки виробничого біосинтезу

Специфікація обладнання, зображеного на апаратурній схемі, наведена у *табл.*

4.1.

Таблиця 4.1

Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу L-тирозину

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
ПЗ-1	Повітрязабірник	1	Повітрязабірник серії OBR 200 M-2K, виробник Bahçivan (Туреччина), продуктивність 1800 м ³ /год. Обладнаний металевою сіткою для видалення механічних забруднень [2].
Ф-2	Фільтр грубої очистки	1	Фільтр серії QF 0050, виробник OMI (Італія), ступінь очистки E=95%, продуктивність 5000 л/хв., фільтруючий матеріал - кераміка. [3].
К-3	Компресор	1	Компресор TURBOAIR-2020 фірми CAMERON (США), потужність 30-55 м ³ /хв [4].
Т-4	Теплообмінник охолоджувач	1	Теплообмінник-охолоджувач для стисненого повітря серії RA 50RA, виробник OMI (Італія), продуктивність 5000 л/хв. [5].
Р-5	Ресивер	1	Ресивер серії Р 500.600 фірми «Компресормаш-Сервис» (Україна), об'єм 500 л, робочий тиск 10 бар [6].
Т-6	Теплообмінник нагрівач	1	Теплообмінник нагрівач серії WALCOM TD 1 (Італія), максимальний робочий тиск 12 атм [7].

НУХТ БТЕК 02.02.12 КР ПЗ					
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	
Розроб.		Світлична В.О.		РОЗДІЛ 4. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ ТА ОТРИМАННЯ СУБСТАНЦІЇ ТИРОЗИНУ	
Перевір.		Красінько В.О.			
Консультант					
Н. Контр.					
Затверд.		Пирог Т.П.			
			Літ.	Арк.	Аркушів
			133	41	
Кафедра БТМ 133					

1	2	3	4
Ф-7	Фільтр головний	1	Фільтр серії PF 0050 1, виробник ОМІ (Італія), ступінь очистки E=99%, продуктивність 5000 л/хв., фільтруючий матеріал – акрилове волокно[8].
Д-8, Д-11, Д-14, Д-17, Д-20, Д-23, Д-26, Д-29, Д-32, Д-35, Д-38, Д-41, Д-43, Д-52, Д-55, Д-58, Д-61, Д-64, Д-67, Д-86	Об'ємно-ваговий дозатор	20	Дозатор виробництва НВП "Техноваги". Точність зважування становить 0,1% [1].
Н-9, Н-13, Н-16, Н-19, Н-22, Н-25, Н-28, Н-31, Н-34, Н-37, Н-40, Н-54, Н-57, Н-60, Н-63, Н-66, Н-69, Н-71, Н-73, Н-80, Н-83, Н-87	Насос відцентровий	22	Відцентровий насос фірми EBARA (Японія) серії Ebara 2CDX 200-30, продуктивністю 12,6 м ³ /год [9].
Р-10	Реактор змішувач для приготування розчину мікроелементів	1	Реактор з нержавіючої сталі об'ємом 30 л, оснащений перемішуючим пристроєм, виробник «Стройторгсервис» (Україна)[10].
Р-12	Реактор змішувач для композиції А	1	Реактор з нержавіючої сталі об'ємом 10 л, оснащений перемішуючим пристроєм, виробник «Стройторгсервис» (Україна). [10].

1	2	3	4
P-15	Реактор змішувач для композиції Б	1	Реактор з нержавіючої сталі об'ємом 10 л, оснащений перемішувачем пристроєм, виробник «Стройторгсервис» (Україна). [10].
P-18	Реактор змішувач для композиції В	1	Реактор з нержавіючої сталі об'ємом 10 л, оснащений перемішувачем пристроєм, виробник «Стройторгсервис» (Україна). [10].
P-21	Реактор змішувач для композиції А	1	Реактор з нержавіючої сталі об'ємом 100 л, оснащений перемішувачем пристроєм, виробник «Стройторгсервис» (Україна). [10].
P-24	Реактор змішувач для композиції Б	1	Реактор з нержавіючої сталі об'ємом 100 л, оснащений перемішувачем пристроєм, виробник «Стройторгсервис» (Україна). [10].
P-27	Реактор змішувач для композиції В	1	Реактор з нержавіючої сталі об'ємом 100 л, оснащений перемішувачем пристроєм, виробник «Стройторгсервис» (Україна). [10].
P-30	Реактор змішувач для композиції А	1	Реактор з нержавіючої сталі об'ємом 630 л, оснащений перемішувачем пристроєм, виробник «Стройторгсервис» (Україна). [10].
P-33	Реактор змішувач для композиції Б	1	Реактор з нержавіючої сталі об'ємом 400 л, оснащений перемішувачем пристроєм, виробник «Стройторгсервис» (Україна). [10].
P-36	Реактор змішувач для композиції В	1	Реактор з нержавіючої сталі об'ємом 400 л, оснащений перемішувачем пристроєм, виробник «Стройторгсервис» (Україна). [10].
P-39	Реактор змішувач для підживлювального розчину	1	Реактор з нержавіючої сталі об'ємом 1,25 м ³ , оснащений перемішувачем пристроєм, виробник «Стройторгсервис» (Україна). [10].
P-42	Реактор змішувач для приготування 30% розчину NH ₄ OH	1	Реактор з нержавіючої сталі об'ємом 6 л, оснащений перемішувачем пристроєм, виробник «Стройторгсервис» (Україна) [10].

1	2	3	4
P-44	Реактор змішувач для приготування 1 М розчину ізопропіл-D-тіогалактопіранозиду	1	Реактор з нержавіючої сталі об'ємом 3 л, оснащений перемішувачем пристроєм, виробник «Стройторгсервис» (Україна)[10].
Ф-45, Ф-47, Ф-49	Індивідуальний фільтр	3	Фільтр тонкої очистки серії HF 0050 1, виробник ОМІ (Італія), ступінь очистки E=99,99%, продуктивність 5000 л/хв., фільтруючий матеріал – боросилікатне волокно [11].
I-46	Інокулятор	1	Ферментер фірми АгроМаш (Росія), об'ємом 40 л, виготовлений із нержавіючої сталі, обладнаний мішалкою, сорочкою, пробовідбірником, датчиками рН та температури [12].
Па-48	Посівний апарат	1	Ферментер фірми АгроМаш (Росія), об'ємом 400 л, виготовлений із нержавіючої сталі, обладнаний мішалкою, сорочкою, пробовідбірником, датчиками рН та температури [12].
Фр-50	Ферментер	1	Ферментер фірми АгроМаш (Росія), об'ємом 4 м ³ , виготовлений із нержавіючої сталі, обладнаний мішалкою, сорочкою, пробовідбірником, датчиками рН та температури [12].
P-53	Реактор для приготування буферного розчину	1	Реактор з нержавіючої сталі об'ємом 400 л, оснащений перемішувачем пристроєм, виробник «Стройторгсервис» (Україна). [10].
P-56	Реактор для приготування 0,1 М розчину хлориду натрію для елюції	1	Реактор з нержавіючої сталі об'ємом 80 л, оснащений перемішувачем пристроєм, виробник «Стройторгсервис» (Україна). [10].
P-59	Реактор для приготування 0,2 М розчину хлориду натрію для елюції	1	Реактор з нержавіючої сталі об'ємом 80 л, оснащений перемішувачем пристроєм, виробник «Стройторгсервис» (Україна). [10].

1	2	3	4
P-62	Реактор для приготування 0,3 М розчину хлориду натрію для елюції	1	Реактор з нержавіючої сталі об'ємом 80 л, оснащений перемішувачем, виробник «Стройторгсервис» (Україна). [10].
P-65	Реактор для приготування 0,4 М розчину хлориду натрію для елюції	1	Реактор з нержавіючої сталі об'ємом 80 л, оснащений перемішувачем, виробник «Стройторгсервис» (Україна). [10].
P-68	Реактор для приготування 0,5 М розчину хлориду натрію для елюції	1	Реактор з нержавіючої сталі об'ємом 80 л, оснащений перемішувачем, виробник «Стройторгсервис» (Україна). [10].
P-70	Збірник культуральної рідини	1	Реактор з нержавіючої сталі об'ємом 2,5 м ³ , оснащений перемішувачем, виробник «Стройторгсервис» (Україна). [10].
Ц-72	Центрифуга	1	Фільтруюча центрифуга безперервної дії з верхнім вивантаженням осаду марки RC 150 KSA (Росія) з об'ємом барабана 600 л, максимальна загрузка 750 л, центрифугування при 5630 об/хв [13].
МФ-75 (З-74, Н-76,Ф-77, ММ-78)	Система мікрофільтрації	1	Система мікрофільтрації на полімерних елементах УФ-812 зі спіральними мембранами, продуктивність – 2400 л/год, виробник «ВіоТехно» (Росія), складається зі збірника супернатанту (З-74) об'ємом 2,5 м ³ , відцентрового насоса (Н-76), фільтра (Ф-77) та мікрофільтраційного модуля (ММ-78) [14]
З-79	Збірник пермеату	1	Збірник з нержавіючої сталі об'ємом 2,5 м ³ , виробник «Стройторгсервис» (Україна). [10].
ВА-81	Випарний апарат	1	Роторно-плівковий випарний апарат фірми «Гранд» (Росія) [15].
З-82	Збірник концентрату	1	Збірник з нержавіючої сталі об'ємом 250 л, виробник «Стройторгсервис» (Україна). [10].

1	2	3	4
Хр-84	Хроматографічна установка	1	Хроматограф Biotage™ Flash 400 - тиск до 7 бар, швидкість потоку елюенту до 7 л/хв [16]
Р-85	Реактор для кристалізації	1	Реактор з нержавіючої сталі об'ємом 400 л, оснащений перемішуючим пристроєм, виробник «Стройторгсервис» (Україна). [10].
Ф-88	Нутч-фільтр	1	Нутч-фільтр компанії Büchi (Швейцарія) об'ємом 300 л, тиск від -1.0 до +1.0 бар, температура від -60 °С до +200 °С, фільтрувальна перегородка з розміром пор 8 - 115 мікрон, матеріал: боросилікатне скло 3.3 [17]
П-89	Піддон	1	Піддони для сушіння об'ємом 55 л.
ВС-90	Вакуумна сушильна шафа	1	Вакуумна сушильна шафа СВ-300 об'ємом 220 л, вакуум до 0,002 атм, температура до 200 °С, виробник «SpectroLab» (Україна) [18].
Др-91	Дробарка	1	Молоткова дробарка YF8-1 (Китай), продуктивність 50 кг/год, оснащена 5 ситами, розміри яких: 6мм, 250, 177, 149, 105 мікрон [19].
З-92	Збірник готової субстанції	1	Збірник з нержавіючої сталі об'ємом 80 л, виробник «Стройторгсервис» (Україна). [10].

*Примітка: підбір обладнання здійснювався за допомогою наступних інтернет-ресурсів:

1. Дозатори Техноваги. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <http://www.technowagy.com.ua/uk/products/31>

2. Вентилятор центробежний [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://prom.ua/p874366446-ventilyator-tsentrobezhnyj-obr.html>

3. Фільтр очистки воздуха [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://equinet.com.ua/ru/bloki-podgotovki-vozdukha-filtry/3270-ms104-s-25-blok-podgotovki-vozdukha-samozzi-italiya.html>

4. Центробежний компресор TURBO AIR-2020 [Електронний ресурс] – Режим доступу: <http://www.promtula.ru/catalog/item/6710.htm>

5. Охладители сжатого воздуха ОМІ [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://prom.ua/p35460814-ohladiteli-szhatogo-vozduha.html>

6. Восдухосборник (ресивер) Р 500.600 (500 л) [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://kompessormash.com/p/142221790-vosduhosbornik-resiver-r-500-600-500-l/>

7. Walcom 60152 Нагреватель сжатого воздуха TD1 PRO [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://artcompas.ru/podgotovka-vozdukha/sistema-podgotovki-vozdukha-walcom-filtr-gruppa-td-1-pro/>
8. Фильтр сжатого воздуха второй ступени [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://prom.ua/p998238498-0050-filtr-szhatogo.html>
9. Центробежный насос [Электронный ресурс] – Режим доступа: <http://filter-ua.com.ua/centrobezhnie-promishlennye-nasosi/centrobezhnyj-nasos-ebara-2sdh-200-30/>
10. Реактор фармацевтический, химический, пищевой. GMP [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://stprom.com.ua/p16779567-reaktor-farmatsevticheskij-himicheskij.html>
11. Фильтр тонкой очистки сжатого воздуха [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://prom.ua/p997502990-0050-filtr-tonkoj.html>
12. Ферментеры [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://www.agromash.ru/fermenter.html>
13. Центрифуги фильтрующие [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://tirit.org/catalogs/pdf/rousselet.pdf>
14. Система микро- ультрафильтрации на полимерных элементах УФ-812 [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://biotechno.ru/catalog/sistemy-tangentsialnoy-filtratsii/sistema-mikro-ultrafiltratsii-na-polimernykh-elementakh-uf-812/>
15. Роторно-пленочный испаритель [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://www.imixing.ru/pischevoe-i-pr-oborudovanie/rotorno-plenochnyj-isparitel/>
16. Промышленные хроматограф Biotage™ Flash 400 [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://www.bcmst.ru/catalog/chromatography/flash400/>
17. Нутч-фильтр [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://dlu.com.ua/Нутч-фільтр-3>
18. Вакуумный сушильный шкаф СВ-300 [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://spectrolab.com.ua/p27584540-vakuumnyj-sushilnyj-shkaf.html>
19. Измельчитель YF8-1 Мельница Молотковая Дробилка [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://prom.ua/p606012619-izmelchitel-yf8-melnitsa.html>

4.2. Опис технологічної схеми ділянки виробничого біосинтезу

ДР 1. Підготовка аераційного повітря

ДР 1.1. Забір атмосферного повітря

Забір повітря здійснюють на висоті 2-3 м від найвищого приміщення за допомогою повітрозабірника (ПЗ-1).

ДР 1.2. Грубе очищення повітря

Повітря очищується від грубого аерозолю на фільтрі грубої очистки (Ф-2). Ступінь очищення – 95 %.

ДР 1.3. Стиснення повітря

Повітря необхідно стиснути для забезпечення умов нормальної аерації.

Повітря стискають у компресорі до 0,4 МПа. Стиснення повітря в компресорі (К-3) призводить до підвищення його температури до 120–150 °С.

ДР 1.4. Охолодження повітря та видалення вологи

Стиснене повітря «переохолоджують» в теплообміннику-охолоджувачі повітря (Т-4) до температури 20 °С. Далі повітря подають на ресивер (Р-5) для згладжування пульсацій і відділення зайвої вологи. Після цього ступінь вологості складає 60 %.

ДР 1.5. Нагрівання повітря

Охоложене повітря підігривають до 35 °С для унеможливлення конденсації пари на волокнах головного та індивідуальних фільтрів. Нагрів здійснюють у теплообміннику-нагрівачі (Т-6).

ДР 1.6. Очищення повітря в головному фільтрі

Попереднє очищення повітря від мікроорганізмів здійснюють в головному фільтрі (Ф-7). Ступінь очищення – 99 %.

ДР 1.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

Всі інокулятори і ферментер оснащують індивідуальним фільтром (Ф-45, Ф-47, Ф-49) для заключної очистки повітря. Ступінь очищення досягає 99,99 %.

ДР 2 Приготування та стерилізація допоміжних розчинів

ДР 2.1. Приготування розчину мікроелементів

Необхідно приготувати 22,3 л розчину мікроелементів.

Вміст компонентів для приготування розчину мікроелементів наведено в *табл. 4.2.*

Таблиця 4.2

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 22,3 л розчину мікроелементів

Компонент	Концентрація, г/л	Вміст компоненту на 22,3 л, кг	Об'єм води, л
FeSO ₄ * 7H ₂ O	10	223	21,7
CaCl ₂	1,35	30,1	
ZnSO ₄ * 7H ₂ O	2,2	49	
MnSO ₄ * 4H ₂ O	0,58	13	
CuSO ₄ * 5H ₂ O	1	22,3	
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ * 5H ₂ O	0,1	2,2	
Na ₂ B ₄ O ₇ * 10H ₂ O	0,2	4,5	
35% розчинHCl	10	223 мл	

Для цього на технічних вагах зважують 223 г FeSO₄ * 7H₂O, 30,1 г CaCl₂, 49 г ZnSO₄ * 7H₂O, 13 г MnSO₄ * 4H₂O, 22,3 г CuSO₄ * 5H₂O, 2,2 г (NH₄)₆Mo₇O₂₄ * 5H₂O, 4,5 г Na₂B₄O₇ * 10H₂O, за допомогою мірного циліндру відміряють 223 мл 35%-го розчину HCl. Наважки переносять у реактор-змішувач (Р-10) об'ємом 30 л, подають через об'ємно-ваговий дозатор (Д-8) 21,7 л питної води, вмикають мішалку.

Отриманий розчин насосом (Н-9) подається на стадії ДР 2.4, ДР 3.2.3, ДР 3.3.3, ДР 3.4.3, ДР 3.5.3.

ДР 2.2. Приготування та стерилізація 1 М розчину ізопропіл-D-тіогалактопіранозиду

Необхідно приготувати 2,24 л 1 М розчину ізопропіл-D-тіогалактопіранозиду (ІПТГ). Для цього у реактор-змішувач (Р-44) об'ємом 3 л, подають через об'ємно-ваговий дозатор (Д-43) 533 г ІПТГ та 1,5 л питної води (зважаючи на 10% конденсату, що утворюється при стерилізації гострою парою), вмикають мішалку. Після розчинення подають гостру пару та стерилізують при 121°C протягом 15 хв.

Готовий розчин самоплином подається у ферментер для виробничого біосинтезу (Фр-50) (до ТП 5.1).

ДР 2.3. Стерилізація 30% розчину NH_4OH

Для підтримки рН на рівні 6,95 використовують 30% розчин NH_4OH . Необхідно 4,226 л розчину NH_4OH . Для цього у реактор-змішувач (Р-42) об'ємом 6 л, подають через об'ємно-ваговий дозатор (Д-41) 4,226 л 30% розчину NH_4OH , подають гостру пару та стерилізують при температурі 131 °С, тиску 0,15 МПа, протягом 40 хв.

Готовий розчин самоплином подається у ферментер для виробничого біосинтезу (Фр-50) (до ТП 5.1).

ДР 2.4. Приготування та стерилізація підживлювального розчину

Необхідно приготувати 1056,5 л підживлювального розчину. Вміст компонентів для приготування підживлювального розчину наведено в табл. 4.3.

Таблиця 4.3

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 1056,5 л підживлювального розчину

Компонент	Концентрація, г/л	Вміст компонента на 1056,5 л, кг	Об'єм конденсату, л	Об'єм води, л
Глюкоза	700	739,55	105,65	102,5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	9	9,5		
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	73	77,12		
Дріжджовий екстракт	5	5,28		
Розчин мікроелементів	15	15,85 л		
35% розчин HCl	1	1,06 л		

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д-38) 739,55 кг глюкози, 9,5 кг $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 77,12 кг $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5,28 кг дріжджового екстракту, 15,85 л розчину мікроелементів (від ДР 2.1) та 1,06 л 35% розчину HCl подають у реактор-змішувач (Р-39) об'ємом 1,25 м³, додають через об'ємно-ваговий дозатор 102,5 л питної води (зважаючи на 10% конденсату, що утворюється при стерилізації гострою парою), вмикають мішалку та подають гостру пару. Стерилізують при температурі 112°С, тиску 0,05 МПа, протягом 30 хв.

Готовий розчин насосом (Н-40) перекачується у ферментер для виробничого біосинтезу (Фр-50) (до ТП 5.1).

ДР 2.5. Приготування буферного розчину

Для того, щоб приготувати 305,8 л 10 мМ калій фосфатний буфер рН 7,0, що містить 1 мМ дитіоеритритолу, необхідно 648 г фосфату калію, 46 г дитіоеритритолу.

У реактор-змішувач (Р-53) об'ємом 400 л через об'ємно-ваговий дозатор (Д-52) подають 648 г фосфату калію, 46 г дитіоеритритолу, додають 305,1 л води питної та вмикають перемішувач. Після розчинення буферний розчин за допомогою насоса (Н-54) подається на хроматографічну установку (Хр-84).

ДР 2.6. Приготування 0,1 М розчину хлориду натрію для елюції

У реактор-змішувач (Р-56) об'ємом 80 л через об'ємно-ваговий дозатор (Д-55) подають 358 г хлориду натрію, додають 60,9 л води питної та вмикають перемішувач. Після розчинення розчин за допомогою насоса (Н-57) подається на хроматографічну установку (Хр-84).

ДР 2.7. Приготування 0,2 М розчину хлориду натрію для елюції

У реактор-змішувач (Р-59) об'ємом 80 л через об'ємно-ваговий дозатор (Д-58) подають 716 г хлориду натрію, додають 60,5 л води питної та вмикають перемішувач. Після розчинення розчин за допомогою насоса (Н-60) подається на хроматографічну установку (Хр-84).

ДР 2.8. Приготування 0,3 М розчину хлориду натрію для елюції

У реактор-змішувач (Р-62) об'ємом 80 л через об'ємно-ваговий дозатор (Д-61) подають 1074 г хлориду натрію, додають 60,1 л води питної та вмикають перемішувач. Після розчинення розчин за допомогою насоса (Н-63) подається на хроматографічну установку (Хр-84).

ДР 2.9. Приготування 0,4 М розчину хлориду натрію для елюції

У реактор-змішувач (Р-65) об'ємом 80 л через об'ємно-ваговий дозатор (Д-64) подають 1432 г хлориду натрію, додають 59,8 л води питної та вмикають перемішувач. Після розчинення розчин за допомогою насоса (Н-66) подається на хроматографічну установку (Хр-84).

ДР 2.10. Приготування 0,5 М розчину хлориду натрію для елюції

У реактор-змішувач (Р-68) об'ємом 80 л через об'ємно-ваговий дозатор (Д-67) подають 1790 г хлориду натрію, додають 59,4 л води питної та вмикають перемішуючий пристрій. Після розчинення розчин за допомогою насосу (Н-69) подається на хроматографічну установку (Хр-84).

ДР 3. Приготування та стерилізація поживного середовища

ДР 3.1. Приготування та стерилізація поживного середовища для розмноження клітин у колбі

Для початкового розмноження клітин необхідно приготувати 85 мл поживного середовища №1.

Вміст компонентів для приготування 85мл поживного середовища наведено в табл. 4.4.

Таблиця 4.4

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 85 мл поживного середовища №1

Компонент	Концентрація, г/л	Вміст компоненту на 85 мл, г	Композиція	Об'єм композиції, мл
Дріжджовий екстракт	24	2	А	44
Триптон	12	1		
Глюкоза	10	0,85		
K ₂ HPO ₄	12,5	1,06	Б	41
KH ₂ PO ₄	2,3	0,2		

ДР 3.1.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 2 г дріжджового екстракту, 1 г триптону, 0,85 г глюкози. Наважки переносять у колбу об'ємом 100 мл, додають 40 мл питної води, перемішують. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112 °С, тиску 0,05 МПа, упродовж 30 хв.

Готова композиція направляється до ТП 4.4.

ДР 3.1.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 1,06 г K₂HPO₄, 0,2 г KH₂PO₄. Наважки переносять у колбу об'ємом 100 мл, додають 40 мл питної води, перемішують. Колбу

закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°C, тиску 0,15 МПа, упродовж 40 хв.

Готова композиція направляється до ТП 4.4.

ДР 3.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту у колбах на качалці

Для вирощування інокуляту у колбах на качалці необхідно приготувати 2,1 л поживного середовища №2, складу:

- KH_2PO_4 – 6,67;
- $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – 4;
- лимонна кислота – 0,8;
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 15;
- глюкоза – 30;
- дріжджовий екстракт – 3;
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,8;
- розчин мікроелементів – 5 мл;
- 3-(N-морфоліно) пропансульфонова кислота - 25 мМ (5,2 г/л);
- канаміцин – 100 мкг/мл (0,1 г/л).

Вміст компонентів для приготування 2,1 л поживного середовища №2 наведено в табл. 4.5.

Таблиця 4.5

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 2,1 л поживного середовища №2

Компонент	Концентрація, г/л	Вміст компоненту на 2,1 л, г	Композиція	Об'єм композиції, мл
Дріжджовий екстракт	3	6,3	А	720
Глюкоза	30	63		
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	4	8,4	Б	670
KH_2PO_4	6,67	14		
Лимонна кислота	0,8	1,7	В	700
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	15	31,5		
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,8	1,7		
Розчин мікроелементів	5	10,5 мл		

Компонент	Концентрація, г/л	Вміст компоненту на 2,1 л, г	Композиці я	Об'єм композиції. мл
3-(N-морфоліно) пропансульфонова кислота	5,2	10,9		
Канаміцин	0,1	0,21		10

ДР 3.2.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 6,3 г дріжджового екстракту, 63 г глюкози. Наважки переносять у колбу об'ємом 1 л, додають 650 мл питної води, перемішують. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112 °С, тиску 0,05 МПа, упродовж 30 хв.

Готова композиція направляється до ТП 4.5.

ДР 3.2.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 8,4 г $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 14 г KH_2PO_4 . Наважки переносять у колбу об'ємом 1 л, додають 650 мл питної води, перемішують. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°С, тиску 0,15 МПа, упродовж 40 хв.

Готова композиція направляється до ТП 4.5.

ДР 3.2.3. Приготування і стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 1,7 г лимонної кислоти, 31,5 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,7 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10,9 г 3-(N-морфоліно) пропансульфонової кислоти. За допомогою мірного циліндру відміряють 10,5 мл розчину мікроелементів (від ДР 2.1). Наважки переносять у колбу об'ємом 1 л, додають 640 мл питної води, перемішують. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°С, тиску 0,15 МПа, упродовж 40 хв.

Готова композиція направляється до ТП 4.5.

ДР 3.2.4. Приготування та стерилізація розчину канаміцину

На технічних вагах зважують 0,21 г антибіотику канаміцину. Наважку переносять у колбу об'ємом 100 мл, додають 10 мл питної води, перемішують.

Стерилізують в асептичних умовах через мембранний фільтр з діаметром пор 0,22 мкм.

Готовий розчин направляється до ТП 4.5.

ДР 3.3. Приготування поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 40 л.

Для одержання інокуляту на другому етапі необхідно приготувати 21,2 л поживного середовища №2. Вміст компонентів для приготування 21,2 л поживного середовища №2 наведено в табл. 4.6.

Таблиця 4.6

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 21,2 л поживного середовища №2

Компонент	Концентрація, г/л	Вміст компоненту на 21,2 л, г	Композиція	Об'єм композиції, л	Об'єм води, л	Об'єм конденсату, л
Дріжджовий екстракт	3	63,6	А	7,03	5,6	0,7
Глюкоза	30	636				
(NH ₄) ₂ HPO ₄	4	84,8	Б	7,03	6,1	0,7
KH ₂ PO ₄	6,67	141,4				
Лимонна кислота	0,8	17	В	7,03	5,7	0,7
(NH ₄) ₂ SO ₄	15	318				
MgSO ₄ *7H ₂ O	0,8	17				
Розчин мікроелементів	5	106 мл				
3-(N-морфоліно) пропансульфонова кислота	5,2	110,2				
Канаміцин	0,1	2,12		0,1	0,1	-

ДР 3.3.1. Приготування і стерилізація композиції А

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д-11) у реактор-змішувач (Р-12) об'ємом 10 л подають 63,6 г дріжджового екстракту, 636 г глюкози, додають 5,6 л питної води води (зважаючи на 10% конденсату, що утворюється при стерилізації гострою парою), та вмикають мішалку. Після розчинення середовище стерилізується гострою парою при температурі 112 °С, тиску 0,05 МПа, упродовж 30 хв. Після

стерилізації композиція А насосом (Н-13) подається в інокулятор (І-46) об'ємом 40 л (до ТП 4.6).

ДР 3.3.2. Приготування і стерилізація композиції Б

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д-14) у реактор-змішувач (Р-15) об'ємом 10 л подають 84,8 г $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 141,4 г KH_2PO_4 , додають 6,1 л питної води (зважаючи на 10% конденсату, що утворюється при стерилізації гострою парою), та вмикають мішалку. Після розчинення середовище стерилізується гострою парою при температурі 131°C, тиску 0,15 МПа, упродовж 40 хв.

. Після стерилізації композиція Б за допомогою насосу (Н-16) подається в інокулятор (І-46) об'ємом 40 л (до ТП 4.6).

ДР 3.3.3. Приготування і стерилізація композиції В

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д-17) у реактор-змішувач (Р-18) об'ємом 10 л подають 17 г лимонної кислоти, 318 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 17 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 110,2 г 3-(N-морфоліно) пропансульфонової кислоти, 106 мл розчину мікроелементів (від ДР 2.1), додають 5,7 л питної води (зважаючи на 10% конденсату, що утворюється при стерилізації гострою парою), та вмикають мішалку. Після розчинення композиція В за допомогою насосу (Н-19) подається в інокулятор (І-46) об'ємом 40 л, у якому композиція В стерилізується гострою парою при температурі 131°C, тиску 0,15 МПа, упродовж 40 хв.

ДР 3.3.4. Приготування та стерилізація розчину канаміцину

На технічних вагах зважують 2,12 г антибіотику канаміцину. Наважку переносять у колбу об'ємом 100 мл, додають 100 мл питної води, перемішують. Стерилізують в асептичних умовах через мембранний фільтр з діаметром пор 0,22 мкм.

Готовий розчин направляється до ТП 4.6.

ДР 3.4. Приготування поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 400 л.

Для одержання інокуляту на третьому етапі необхідно приготувати 213 л поживного середовища №2. Вміст компонентів для приготування 213 л поживного середовища №2 наведено в табл. 4.7.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 213 л поживного середовища №2

Компонент	Концентрація, г/л	Вміст компоненту на 213 л, г	Композиція	Об'єм композиції, л	Об'єм води, л	Об'єм конденсату, л
Дріжджовий екстракт	3	639	А	71	56,9	7,1
Глюкоза	30	6390				
(NH ₄) ₂ HPO ₄	4	852	Б	71	61,6	7,1
KH ₂ PO ₄	6,67	1421				
Лимонна кислота	0,8	170	В	71	58,2	7,1
(NH ₄) ₂ SO ₄	15	3195				
MgSO ₄ *7H ₂ O	0,8	170				
Розчин мікроелементів	5	1065 мл				
3-(N-морфоліно) пропансульфонова кислота	5,2	1108				
Канаміцин	0,1	21,3		0,1	0,1	-

ДР 3.4.1. Приготування і стерилізація композиції А

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д-20) у реактор-змішувач (Р-21) об'ємом 100 л подають 639 г дріжджового екстракту, 6390 г глюкози, додають 56,9 л питної води (зважаючи на 10% конденсату, що утворюється при стерилізації гострою парою), та вмикають мішалку. Після розчинення середовище стерилізується гострою парою при температурі 112 °С, тиску 0,05 МПа, упродовж 30 хв. Після стерилізації композиція А насосом (Н-22) подається в посівний апарат (Па-48) об'ємом 400 л (до ТП 4.7).

ДР 3.4.2. Приготування і стерилізація композиції Б

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д-23) у реактор-змішувач (Р-24) об'ємом 100 л подають 852 г (NH₄)₂HPO₄, 1421 г KH₂PO₄, додають 61,6 л питної води (зважаючи на 10% конденсату, що утворюється при стерилізації гострою парою), та вмикають мішалку. Після розчинення середовище стерилізується гострою парою при температурі 131°С, тиску 0,15 МПа, упродовж 40 хв.

. Після стерилізації композиція Б за допомогою насосу (Н-25) подається в посівний апарат (Па-48) об'ємом 400 л (до ТП 4.7).

ДР 3.4.3. Приготування і стерилізація композиції В

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д-26) у реактор-змішувач (Р-27) об'ємом 100 л подають 170 г лимонної кислоти, 3195 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 170 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1108 г 3-(N-морфоліно) пропансульфонової кислоти, 1065 мл розчину мікроелементів (від ДР 2.1), додають 58,2 л питної води (зважаючи на 10% конденсату, що утворюється при стерилізації гострою парою), та вмикають мішалку. Після розчинення композиція В за допомогою насосу (Н-28) подається в посівний апарат (Па-48) об'ємом 400 л, у якому композиція В стерилізується гострою парою при температурі 131°C, тиску 0,15 МПа, упродовж 40 хв.

ДР 3.4.4. Приготування та стерилізація розчину канаміцину

На технічних вагах зважують 21,3 г антибіотику канаміцину. Наважку переносять у колбу об'ємом 100 мл, додають 100 мл питної води, перемішують. Стерилізують в асептичних умовах через мембранний фільтр з діаметром пор 0,22 мкм.

Готовий розчин направляється до ТП 4.7.

ДР 3.5. Приготування поживного середовища для виробничого біосинтезу в ферментері об'ємом 4 м³.

Для виробничого біосинтезу необхідно приготувати 1056,5 л поживного середовища №3, склад якого (г/л):

- KH_2PO_4 – 3;
- K_2HPO_4 – 7,33;
- лимонна кислота – 0,85;
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 15;
- глюкоза – 20;
- дріжджовий екстракт – 5;
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,8;
- розчин мікроелементів – 5 мл;
- канаміцин – 100 мкг/мл.

Вміст компонентів для приготування поживного середовища №3 наведено в табл. 4.8.

Таблиця 4.8

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 1056,5 л поживного середовища №3

Компонент	Концентрація, г/л	Вміст компоненту на 1056,5 л, кг	Композиція	Об'єм композиції, л	Об'єм води, л	Об'єм конденсату, л
Дріжджовий екстракт	5	5,28	А	455,5	383,5	45,6
Глюкоза	20	21,13				
K ₂ HPO ₄	7,33	7,74	Б	300	259,1	30
KH ₂ PO ₄	3	3,17				
Лимонна кислота	0,85	0,9	В	300	247,1	30
(NH ₄) ₂ SO ₄	15	15,85				
MgSO ₄ *7H ₂ O	0,8	0,85				
Розчин мікроелементів	5	5,28 л				
Канаміцин	0,1	0,106		1	0,9	-

ДР 3.5.1. Приготування і стерилізація композиції А

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д-29) у реактор-змішувач (Р-30) об'ємом 630 л подають 5,28 кг дріжджового екстракту, 21,13 кг глюкози, додають 383,5 л питної води (зважаючи на 10% конденсату, що утворюється при стерилізації гострою парою), та вмикають мішалку. Після розчинення середовище стерилізується гострою парою при температурі 112 °С, тиску 0,05 МПа, упродовж 30 хв. Після стерилізації композиція А насосом (Н-31) подається в ферментер (Фр-50) об'ємом 4 м³ (до ТП 5.1).

ДР 3.5.2. Приготування і стерилізація композиції Б

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д-32) у реактор-змішувач (Р-33) об'ємом 400 л подають 7,74 кг K₂HPO₄, 3,17 кг KH₂PO₄, додають 259,1 л питної води (зважаючи на 10% конденсату, що утворюється при стерилізації гострою парою), та вмикають мішалку. Після розчинення середовище стерилізується гострою парою при температурі 131°С, тиску 0,15 МПа, упродовж 40 хв.

. Після стерилізації композиція Б за допомогою насосу (Н-34) подається в ферментер (Фр-50) об'ємом 4 м³ (до ТП 5.1).

ДР 3.5.3. Приготування і стерилізація композиції В

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д-35) у реактор-змішувач (Р-36) об'ємом 400 л подають 0,9 кг лимонної кислоти, 15,85 кг (NH₄)₂SO₄, 0,85 кг MgSO₄*7H₂O, 5,28 л розчину мікроелементів (від ДР 2.1), додають 247,1 л питної води (зважаючи на 10% конденсату, що утворюється при стерилізації гострою парою), та вмикають мішалку. Після розчинення композиція В за допомогою насосу (Н-37) подається в ферментер (Фр-50) об'ємом 4 м³, у якому композиція В стерилізується гострою парою при температурі 131°C, тиску 0,15 МПа, упродовж 40 хв.

ДР 3.5.4. Приготування та стерилізація розчину канаміцину

На технічних вагах зважують 106 г антибіотику канаміцину. Наважку переносять у колбу об'ємом 1 л, додають 900 мл питної води, перемішують. Стерилізують в асептичних умовах через мембранний фільтр з діаметром пор 0,22 мкм.

Готовий розчин направляється до ТП 5.1.

ТП 4. Підготовка посівного матеріалу

ТП 4.1. Підтримання колекційної культури E. coli ВТУ2.13

Колекційна культура *E. coli* ВТУ2.13 зберігається у пробірках з середовищем Лурія-Бертані (ЛБ) за температури 4°C. Пересіви здійснюють кожні 3-4 місяці. Всі роботи з колекційною культурою проводять строго в асептичних умовах.

ТП 4.2. Одержання робочої культури E. coli ВТУ2.13 на агаризованому середовищі

Колекційну культуру *E. coli* ВТУ2.13, що зберігалася в пробірках з середовищем ЛБ (від ТП 4.1), розсівають петлею до ізольованих колоній на чашки Петрі з середовищем МПА і вирощують при температурі 37 °С протягом 24 год.

ТП 4.3. Вирощування робочої культури E. coli ВТУ2.13 на агаризованому середовищі

Отримані ізольовані колонії (від ТП 4.2) пересівають петлею в пробірки зі скошеним МПА та вирощують при температурі 37 °С протягом 24 год.

ТП 4.4. Розмноження клітин E. coli ВТУ2.13 в колбі

У колбу об'ємом 750 мл в асептичних умовах переносять 44 мл композиції А (від ДР 3.1.1), додають 41 мл композиції Б (від ДР 3.1.2), перемішують.

У пробірку з робочою культурою *E. coli* ВТУ2.13 (від ТП 4.3), вносять 5 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини, піпеткою відбирають одержану суспензію і вносять у колбу з розлитим поживним середовищем.

Культивування *E. coli* ВТУ2.13 здійснюють в колбі на качалці впродовж 2-6 годин при температурі 37⁰С, швидкість перемішування 200 об/хв.

Після вирощування інокуляту відбирають пробу для здійснення мікробіологічного контролю.

ТП 4.5. Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці

У колбу об'ємом 3 л в асептичних умовах вносять композицію А (від ДР 3.2.1), додають композицію Б (від ДР 3.2.2), композицію В (від ДР 3.2.3) та розчин канаміцину (від ДР 3.2.4), перемішують та розливають по 150 мл у 14 качалочних колб об'ємом 750 мл.

У кожну колбу в асептичних умовах вносять по 6 мл інокуляту (від ТП 4.4).

Культивування *E. coli* ВТУ2.13 здійснюють в колбах на качалці впродовж 12 годин при температурі 37⁰С, швидкості обертів 200 об/хв.

Після вирощування інокуляту, посівний матеріал зливають в одну колбу об'ємом 3 л і відбирають пробу для здійснення мікробіологічного контролю.

ТП 4.6. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 40 л

В асептичних умовах в інокулятор (І-46) об'ємом 40 л зі стерильною композицією В (від ДР 3.3.3) за допомогою насосу (Н-13) подають композицію А (від ДР 3.3.1) з реактора об'ємом 10 л (Р-12), подають за допомогою насосу (Н-16) композицію Б з реактора об'ємом 10 л (Р-15) (від ДР 3.3.2), через засівну колбу вносять стерильний розчин канаміцину (від ДР 3.3.4), та подають через засівну колбу посівний матеріал (від ТП 4.5).

Вмикають мішалку, у інокулятор подають аераційне повітря через індивідуальний фільтр (Ф-45) (від ДР 1.7), температура 37⁰С, швидкість

перемішування 200 об/хв., тривалість культивування 12 год. Температуру підтримують поданням у сорочку пари та холодної води.

Кожні 6 годин відбирають проби для проведення мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси.

ТП 4.7. Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 400 л

В асептичних умовах в посівний апарат (Па-48) об'ємом 400 л зі стерильною композицією В (від ДР 3.4.3) за допомогою насосу (Н-22) подають композицію А (від ДР 3.4.1) з реактора об'ємом 100 л (Р-21), подають за допомогою насосу (Н-25) композицію Б з реактора об'ємом 100 л (Р-24) (від ДР 3.4.2), через засівну колбу вносять стерильний розчин канаміцину (від ДР 3.4.4), та перекачують стерильним стисненим повітрям по трубі перетискування посівний матеріал з інокулятора (І-46) об'ємом 40 л (від ТП 4.6).

Вмикають мішалку, у посівний апарат подають аераційне повітря через індивідуальний фільтр (Ф-47) (від ДР 1.7), температура 37⁰С, швидкість перемішування 200 об/хв., тривалість культивування 12 год. Температуру підтримують поданням у сорочку пари та холодної води.

Кожні 6 годин відбирають проби для проведення мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси.

ТП 5. Біосинтез

ТП 5.1. Виробниче культивування

У ферментер (Фр-50) об'ємом 4 м³ зі стерильною композицією В (від ДР 3.5.3) за допомогою насосу (Н-31) подають композицію А (від ДР 3.5.1) з реактора об'ємом 630 л (Р-30), подають за допомогою насосу (Н-34) композицію Б з реактора об'ємом 400 л (Р-33) (від ДР 3.5.2), через засівну колбу вносять стерильний розчин канаміцину (від ДР 3.5.4) та 465 мл піногаснику Antifoam 204, після цього перекачують посівний матеріал з посівного апарату (Па-48) об'ємом 400 л (від ТП 4.7) по трубі перетискування стерильним стисненим повітрям у ферментер (Фр-50).

Вмикають мішалку, у ферментер подають аераційне повітря через індивідуальний фільтр (Ф-49) (від ДР 1.7), культивують при температурі 37⁰С. Температуру підтримують поданням у сорочку пари та холодної води.

pH підтримують на 6,95 шляхом подачі стерильного 30% розчину NH_4OH (від ДР 2.3), який подається самоплином з реактора об'ємом 6 л (P-42). У процесі культивування швидкість перемішування підтримують на рівні 500-1000 об/хв. Швидкість подачі аераційного повітря - 2 л/хв. Рівень розчинного кисню підтримується на рівні 40%.

Через 8 годин культивування кожні 4 години подають по 58,7 л підживлювального розчину за допомогою насосу (Н-40) з реактора (P-39) об'ємом 1,25 м³ (від ДР 2.4).

Після 19 годин культивування подають стерильний розчин індуктору ІПТГ (від ДР 2.2), який подається самоплином з реактора об'ємом 3 л (P-44).

Культивування здійснюють протягом 80 год.

Кожні 6 години відбирають проби для проведення мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси та тирозину. Максимальна концентрація біомаси спостерігається на 32 годину культивування та складає 25,4 г/л. В кінці процесу культивування концентрація біомаси складає 14 г/л, концентрація L-тирозину – 43,14 г/л.

ТП 6. Відділення біомаси

ТП 6.1. Центрифугування культуральної рідини

Культуральна рідина від ферментеру (ФР-50) насосом (Н-51) подається у збірник культуральної рідини об'ємом 2,5м³ (P-70), а від збірника (P-70) за допомогою насосу (Н-71) безперервно подається через патрубок в кришці на фільтруючу центрифугу безперервної дії з верхнім вивантаженням осаду (Ц-72), де відбувається центрифугування при 5630 об/хв. протягом 30 хв.

Після цього фільтрат виводиться знизу центрифуги та подається у збірник об'ємом 2,5м³ (З-74) за допомогою насосу (Н-73), а твердий осад біомаси осідає в мішку і накопичується. Після заповнення мішка осад вивантажується та направляється на знешкодження відходів (до ЗВ 11.3).

ТП 6.2. Мікрофільтрація

Мікрофільтрація супернатанту (від ТП 6.1) здійснюється на системі мікрофільтрації (МФ-75) з метою очищення супернатанту від залишків біомаси.

Супернатант зі збірника (З-74) за допомогою відцентрового насоса (Н-76) через фільтр попередньої очистки (Ф-77) подається на мікрофільтраційний модуль (ММ-78), на якому при температурі 20⁰С впродовж 1 год здійснюється мікрофільтрація на полімерних елементах зі спіральними мембранами. Промивання мембрани здійснюється водою питною.

Після завершення мікрофільтрації пермеат подається за допомогою відцентрового насосу у збірник об'ємом 2,5 м³(З-79), а концентрат направляється на знешкодження відходів (до ЗВ 11.1).

ТП 7. Концентрування тирозину

ТП 7.1. Випарювання супернатанту

Зі збірника (З-79) за допомогою насоса (Н-80) пермеат після мікрофільтрації (від ТП 6.2) подається у роторно-плівковий випарний апарат (ВА-81), де за температури 80⁰С відбувається випарювання води з розчину тирозину.

Супернатант подається через патрубок у верхній частині кожної з труб випарного апарату. Супернатант розтікається рівномірно по перетину труби роторно-плівкового випарника і стікає по внутрішній поверхні вниз у вигляді плівки під дією сили тяжіння; по поверхні плівки «гліссирують» робочі органи роторного механізму. Труба апарату зовні підігривається паром до температури 80⁰С. Обертіві лопаті роторно-плівкового випарника створюють в плівці вихрові структури, що прискорюють в ній тепло-масообмінні процеси, забезпечують ефективне розділення рідкої і парової фаз при випаровуванні.

Концентрований розчин тирозину подається у збірник (З-82) об'ємом 250 л, з якого насосом (Н-83) подається на стадію очистки.

ТП 8. Виділення та очистка тирозину

ТП 8.1. Хроматографічна очистка тирозину

Хроматографічна колонка (Хр-84) попередньо урівноважується 10 мМ буферним розчином фосфату калію рН 7,0, який подається за допомогою насосу (Н-54) з реактора (Р-53) (від ДР 2.5). Потім на колонку (Хр-84) за допомогою насосу (Н-83) подається концентрований розчин тирозину (від ТП 7.1) зі збірника (З-82) та буферний розчин (від ДР 2.5). Після сорбції тирозину на колонці здійснюється

елюція даної амінокислоти шляхом почергової подачі розчинів хлориду натрію у градієнті 0,1 – 0,5 М з реакторів (P-56, P-59, P-62, P-65, P-68) за допомогою насосів (H-57, H-60, H-63, H-66, H-69) (від ДР 2.6, від ДР 2.7, від ДР 2.8, від ДР 2.9, від ДР 2.10). Чисті фракції тирозину подаються у реактор для кристалізації (P-85). Фракції, що не містять тирозину, подаються на знешкодження відходів (до ЗВ 11.1). Тривалість процесу хроматографічної очистки складає 2 години.

ТП 8.2. Кристалізація тирозину

Після хроматографічної очистки (від ТП 8.1) розчин тирозину надходить у реактор для кристалізації (P-85) об'ємом 400 л. Кристалізацію тирозину здійснюють шляхом повільного додавання через об'ємно-ваговий дозатор (Д-86) 40% розчину сірчаної кислоти зі швидкістю 917 мл/хв до рН 9,0, при цьому відбувається кристалізація тирозину.

ТП 8.3. Фільтрування кристалів тирозину

Кристали тирозину відновлюють фільтруванням. Суспензія, що містить кристали тирозину з реактора (P-85) подається насосом (H-87) на нутч-фільтр об'ємом 300 л (Ф-88). Фільтрування проводять при тиску 1 бар та температурі 80 °С. При фільтруванні тверда фаза затримується на фільтрувальній перегородці і формує шар осаду, а фільтрат подається на дно фільтра і виводиться через донний злив. Стадія фільтрування завершується, коли шар осаду сформовано і його віджимання призводить до утворення незначної кількості фільтрату.

Осад кристалів тирозину виймається з фільтру при розмиканні кришки і корпусу фільтра і опусканні фільтра за допомогою підйомно-поворотного пристрою (ліфта) вниз і вбік та вивантажується на чотири піддони (П-89) для подальшого сушіння. Фільтрат направляється на знешкодження відходів (до ЗВ 11.1).

ТП 9. Сушіння тирозину

ТП 9.1. Вакуумна сушка тирозину

Сушіння здійснюється у вакуумній сушарці. Піддони (П-89) з осадом кристалів тирозину завантажуються до вакуумної сушильної шафи (ВС-90), потім відкривають вакуумний клапан, включають вакуумний насос, створюючи в сушильній камері необхідний тиск. Сушіння здійснюється під вакуумом 5 мбар при температурі 40 °С.

Вологість висушеного тирозину становить 5%.

ТП 10. Подрібнення та просіювання тирозину

Після сушіння (від ТП 9.1) кристали тирозину вивантажують з піддонів сушарки (П-89) та завантажують порціями через колосник у бункер молоткової дробарки (Др-91), де кристали подрібнюються протягом 1,25 годин та просіюються через 5 сит з розміром отворів 6 мм, 250, 177, 149, 105 мкм. Частинки, які пройшли через сито, подаються далі у збірник готового продукту (З-92). Частинки, які не пройшли через сито подаються на повторне подрібнення.

ЗВ 11. Знешкодження відходів

ЗВ 11.1 Знешкодження рідких відходів

Стічні води можуть містити живу мікрофлору та інші шкідливі речовини. На виході з цеху стічні води спочатку стерилізують і нейтралізують. Потім їх спрямовують на очисні споруди, де здійснюють механічне очищення. Ступінь очищення стічних вод становить 50-70%.

ЗВ 11.2 Знешкодження газоподібних відходів

Очищення газоподібних відходів здійснюють у фільтрах з попереднім охолодження відпрацьованого повітря та зниженням вологості у вологовідбійниках з подальшим нагріванням, щоб уникнути попадання крапельної вологи і змочування фільтрів.

Під час очищення відпрацьованого повітря використовують фільтри з волокнистих матеріалів.

ЗВ 11.3. Знешкодження твердих відходів

Щоб знешкодити та утилізувати тверді відходи (біомасу) використовують термічний метод – спалювання. Суттєвою перевагою цього методу є ефективне знешкодження відходів, зниження обсягу відходів до 10 разів.

Спалювання здійснюють в печах різної конструкції, основним елементом яких є решітка, на якій протікає процес горіння. Простір усередині печі розділене на кілька зон, де послідовно протікають процеси, в результаті яких відбувається спалювання відходів.

4.3. Контроль ділянки виробничого біосинтезу

Упродовж процесу культивування періодично (кожні 6 год) відбирають проби культуральної рідини для мікробіологічного контролю, визначення концентрації біомаси і тирозину, а також вмісту джерела вуглецю (глюкоза) та азоту (амінний та амонійний азот).

Мікробіологічний контроль

Мікробіологічний контроль здійснюється мікроскопіюванням і розсівом на чашки Петрі з агаризованими середовищами.

Проби культуральної рідини відбирають у стерильних умовах з колб за допомогою стерильної піпетки, а з інокуляторів і ферментера за допомогою пробовідбірників.

Мікроскопіювання

Для мікроскопіювання готують препарат «роздавлена крапля» на знежиреному предметному склі, на яке наносять краплю культуральної рідини, накривають покривним скельцем і розглядають його з імерсією (збільшення 90×).

Під мікроскопом повинні спостерігатися грам негативні малорухливі паличкоподібні клітини *E. coliz* закругленими кінцями 1,5-2,0 мкм в довжину (рис 4.1) [138]. Під мікроскопом не повинно спостерігатися сторонньої мікробіоти.

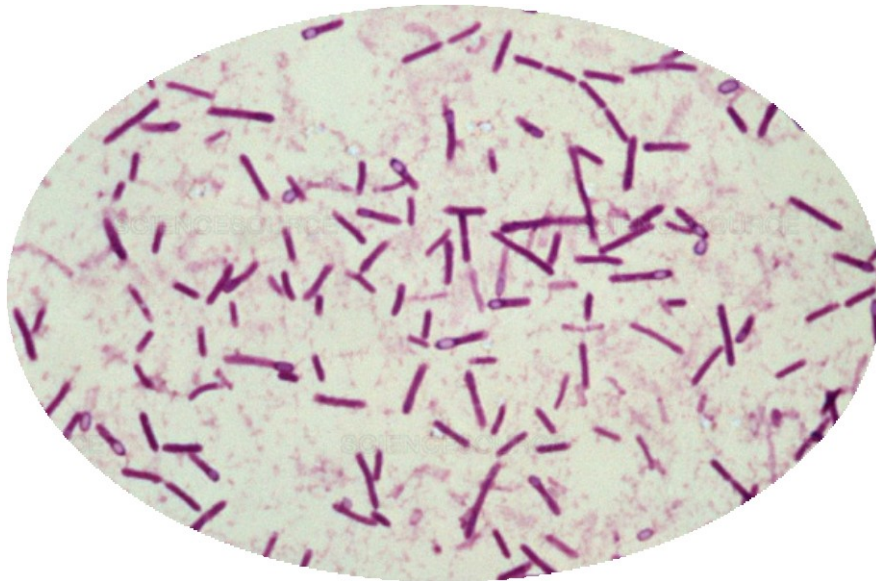


Рис 4.1. Клітини *E. coliz* під мікроскопом

Висів на агаризовані середовища

Культуральну рідину розсівають петлею до ізольованих колоній на чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром (МПА) для виявлення бактерій та сусло-агаром (СА) для виявлення грибів та дріжджів і інкубують при температурі 37 та 30 °С відповідно.

Через 24 години росту на МПА при 37 °С *E. coli* утворює білуваті напівпрозорі колонії діаметром 1,5-2,5 мм; поверхня колоній гладка, краї рівні, структура однорідна, консистенція пастоподібна [138] (рис 4.2). Відсутність колоній сторонніх бактерій свідчить про чистоту культури.



Рис. 4.2. Колонії E. coli

Також проводять мікробіологічний контроль чистоти поживного середовища. Для цього в асептичних умовах відбирають пробу. Далі наливають по кілька крапель у чашки Петрі з СА та МПА і ставлять у термостати на 30°C та 37°C відповідно.

Відсутність колоній сторонніх мікроорганізмів свідчить про чистоту культури.

Показники росту і синтезу цільового продукту

Визначення концентрації біомаси

Концентрацію біомаси визначають за оптичною густиною клітинної суспензії з наступним перерахунком на суху біомасу за допомогою калібрувального графіка. У пробірки із 9 мл стерильної водопровідної води вносять по 1 мл культуральної рідини. Суміш збовтують, потім вимірюють оптичну густину за допомогою

спектрофотометра УФ-1700(Shimadzu, Кіото, Японія) при довжині хвилі 600 нм. Одиниця оптичної густини OD600 відповідає 0,31 г/л біомаси [58, 74].

Визначення концентрації тирозину

Визначення концентрації тирозину у культуральній рідині проводять за допомогою високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ).

Культуральну рідину розбавляють 1,0 н НСІ у співвідношенні 1:1 і витримують при температурі 37 °С і 200 об/хв протягом години для забезпечення повного розчинення L-тирозину. Далі суміш розбавляють в межах норм калібрування 0,1 н НСІ, перемішують і центрифугують при 13200 об/хв протягом 10 хв.

Концентрацію тирозину у супернатанті визначають методом ВЕРХ на колонці Agilent серії 1100. Елюювання здійснюють лінійним градієнтом 0,1% трифтороцтової кислоти (ТФО) та ацетонітрилу. Здійснюють елюцію сумішшю 95% водного розчину ТФО і 5% ацетонітрилу протягом перших 3 хв, далі концентрацію ацетонітрилу лінійно збільшують до 70% з 3 до 10 хвилини. Детектування здійснюється УФ-детектором (Agilent Eclipse +C18) при довжині хвилі 220 нм [57].

Визначення концентрації джерела вуглецю

Визначення концентрації джерела вуглецю – глюкози – проводять за допомогою глюкозо аналізатора YSI 2700 [57].

Принцип дії аналізатора при визначенні концентрації глюкози заснований на вимірюванні сили струму, що протікає через біосенсор, що контактує з пробною культуральною рідиною через багатошарову мембрану з іммобілізованою глюкозооксидазою, що каталізує розкладання глюкози до перекису водню. Виміряні параметри перераховуються в концентрацію глюкози за калібрувальним графіком.

Культуральну рідину центрифугують при 13200 об/хв. протягом 10 хв. Відбирають 10 мкл супернатанту. Вмикають аналізатор, при цьому з його корпусу автоматично витягається голка з ручним впорскуванням. Після того як голка для аспірації нерухома і повністю витягнута, обережно тримають пробірку, що містить пробу супернатанту так, щоб наконечник голки був занурений у зразок. Утримуючи зразок у цьому положенні, натискають «Аспіраційний зразок». Тримають зразок, доки голка для відсмоктування не повернеться назад до корпусу

пристрою. Після цього починається аналіз зразку. Час аналізу становить 60 секунд [139, 140].

Визначення концентрації джерела азоту

У середовищі міститься два джерела азоту: дріжджовий екстракт – джерело амінного азоту та сульфат амонію – джерело амонійного азоту.

Дріжджовий екстракт є джерелом амінного азоту у середовищі. Вміст амінного азоту можна визначити мідним способом[141].

Культуральну рідину центрифугують при 13200 об/хв. протягом 10 хв. У мірну колбу місткістю 50 мл вносять 5 мл супернатанту. Додають 2-3 краплі тимолфталейну і 2-3 краплі 1 М розчину NaOH до появи блідо-блакитного забарвлення. У кілька прийомів, при перемішуванні, додають 15 мл суспензії фосфату міді (що складається з хлориду міді, тризаміщеного фосфату натрію і боратного буферного розчину у співвідношенні 1:2:2), потім вміст колби доводять до мітки дистильованою водою. Суміш перемішують і фільтрують через паперовий фільтр, повертаючи на фільтр перші порції фільтрату.

10 мл прозорого фільтрату поміщають в конічну колбу місткістю 150 мл і додають 0,5 мл 80% оцтової кислоти, 1 г або 10 мл 10% розчину KI. Вміст колби перемішують і вільний йод, який виділився, відтитровують 0,01 М розчином тіосульфату натрію, додаючи в кінці титрування 1-2 краплі 1% розчину крохмалю. Кінець титрування визначають по зникненню синього забарвлення розчину.

Вміст амінного азоту в 100 мл культуральної рідини визначають за формулою:

$$x = \frac{a \cdot 0,28 \cdot 20}{100}$$

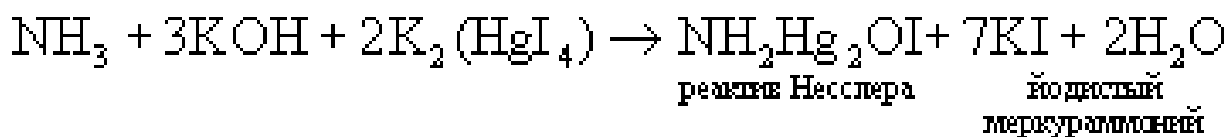
де а– об'єм 0,01 М розчину тіосульфату натрію, який пішов на титрування, мл;

0,28- кількість мг амінного азоту, еквівалентний 1 мл розчину тіосульфату натрію концентрацією 0,01 М;

20 – переведення в 100 мл культуральної рідини.

Джерелом амонійного азоту є сульфат амонію. Вміст амонійного азоту можна визначити за допомогою колориметричного методу з реактивом Несслера[142].

Реактив Несслера - безбарвний лужний розчин комплексної солі $K_2(HgI_4)$, який, реагуючи з іонами амонію, дає йодистий меркурамоній жовтуватого кольору. Інтенсивність забарвлення пропорційна концентрації аміаку.



У мірні колби на 100 мл, наполовину наповнені водою, додають 1, 2, 3, 4, 5 ... 50 мл робочого розчину хлористого амонію, 0,5 мл сегнетової солі і 1 мл реактиву Несслера. Заповнюють решту обсягу колби до мітки водою. Через 15 хв вимірюють оптичну густину на фотоколориметрі з синім світлофільтром і будують калібрувальну криву за загальноприйнятими методиками.

Для визначення амонію до 1 мл супернатантукультуральної рідини додають 0,5 мл сегнетової солі та 1 мл реактиву Несслера. Через 15 хв визначають оптичну густину забарвленого жовтого розчину на фотоколориметрі з синім світлофільтром. Концентрацію амонію визначають за калібрувальним графіком[143].

Показники та методи контролю субстанції тирозину

Субстанцію, одержану в результаті виділення та очищення L-тирозину, 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.** L-тирозин - кристали білого кольору з температурою плавлення 290-295 ° (з розкладанням при повільному нагріванні), 340 ° (з розкладанням при швидкому нагріванні); мало розчинний у воді, розчиняється в спирті і ефірі [122].

2. **Ідентифікація.**Методику наведено у пункті 3.5.3.

3. **pH.** (ДФУ 2.2.3).Методику наведено у пункті 3.5.3.

4. **Втрата в масі при висушуванні** (ДФУ 2.2.32) [127].

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 3.5.3.

6. **Важкі метали** (ДФУ п. 2.4.8). Методику наведено у пункті 3.5.3.

7. **Мікробіологічна чистота.** (ДФУ п. 2.6.12, 2.6.13; N; 5.1.4, N (категорія 3 А)). Методику наведено у пункті 3.5.3.

8. **Кількісне визначення тирозину**

Кількісне визначення проводять за допомогою вискоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ), описаний вище [57].

0,1 г субстанції повинен містити від 0,085 до 0,115 г тирозину.

9. **Визначення вологості**

Визначення вологості субстанції тирозину здійснюють за допомогою аналізатора вологості SF-01 (рис. 4.3).

5 г субстанції тирозину поміщають у сушильну камеру, сушіння здійснюється при температурі 50-105 °С, після сушіння проводять визначення різниці маси зразка субстанції до і після його висушування. Точність вимірювання вологості становить $\pm 0,5\%$ [144].

Вологість субстанції має становити 5%.



Рис. 4.3. Аналізатор вологості SF-01

10. Термін придатності – 2 роки.

Карта контролю

Таблиця 4.9

Карта постадійного контролю виробництва L-тирозину *E. coli* ВТУ2.13

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 повітря, 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, 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, температура	Термометр технічний	Після нагрівання повітря	t = 35°C
Кт 1.6. Очищення повітря в головному фільтрі	Повітря на виході з головного фільтра, ступінь очищення, 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 на виході з індивідуального фільтра, ступінь очищення, 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. 4.9

1	2	3	4	5
Кт, Км, Кх 2.2. Приготування та стерилізація 1 М розчину ізопропіл-D-тіогалактопіранозиду	Температура, час стерилізації, стерильність, концентрація розчину ПТГГ	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль, хімічний метод	Температура визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний і хімічний контроль після стерилізації	$t=121^{\circ}\text{C}$ $\tau = 15 \text{ хв}$, відсутність мікробіоти, $C = 1 \text{ М}$
Кт, Км 2.3. Стерилізація 30% розчину NH_4OH	Температура, тиск, час стерилізації, стерильність	Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск та температура визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P = 0,15 \text{ МПа}$, $t=131^{\circ}\text{C}$ $\tau = 40 \text{ хв}$, відсутність мікробіоти
Кт, Км 2.4. Приготування та стерилізація підживлювального розчину	Температура, тиск, час стерилізації, стерильність	Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск та температура визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P = 0,05 \text{ МПа}$, $t=112^{\circ}\text{C}$ $\tau = 30 \text{ хв}$, відсутність мікробіоти
Кх 2.5 Приготування буферного розчину	Концентрація розчину, рН	Хімічний метод	Після приготування розчину	$C=10 \text{ мМ}$, $\text{pH}=7,0$
Кх 2.6. Приготування 0,1 М розчину хлориду натрію для елюції	Концентрація розчину	Хімічний метод	Після приготування розчину	$C=0,1 \text{ М}$
Кх 2.7. Приготування 0,2 М розчину хлориду натрію для елюції	Концентрація розчину	Хімічний метод	Після приготування розчину	$C=0,2 \text{ М}$
Кх 2.8. Приготування 0,3 М розчину хлориду натрію для елюції	Концентрація розчину	Хімічний метод	Після приготування розчину	$C=0,3 \text{ М}$

1	2	3	4	5
Кх 2.9. Приготування 0,4 М розчину хлориду натрію для елюції	Концентрація розчину	Хімічний метод	Після приготування розчину	C=0,4 М
Кх 2.10. Приготування 0,5 М розчину хлориду натрію для елюції	Концентрація розчину	Хімічний метод	Після приготування розчину	C=0,5 М
Кт, Км 3.1.1. Приготування і стерилізація композиції А для розмноження клітин у колбі	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 τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.1.2. Приготування та стерилізація композиції Б для розмноження клітин у колбі	Композиція Б, 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 τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.2.1. 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 МПа, t=112 °С τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.2.2. Приготування та стерилізація композиції Б для вирощування інокуляту в колбах на качалці	Композиція Б, 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 τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.2.3. 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 МПа, t=131 °С τ = 40 хв, відсутність мікробіоти

Продовження табл. 4.9

1	2	3	4	5
Кт, Км 3.2.4. Приготування та стерилізація розчину канаміцину для вирощування інокуляту в колбах на качалці	Розчин канаміцину, діаметр пор фільтру, стерильність	Мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль після стерилізації	d=0.22 мкм, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.3.1. Приготування і стерилізація композиції А для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 40 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 °C τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.3.2. Приготування та стерилізація композиції Б для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 40 л	Композиція Б, 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
Кт, Км 3.3.3. Приготування та стерилізація композиції В для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 40 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 °C τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.3.4. Приготування та стерилізація розчину канаміцину для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 40 л	Розчин канаміцину, діаметр пор фільтру, стерильність	Мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль після стерилізації	d=0.22 мкм, відсутність мікробіоти

Продовження табл. 4.9

1	2	3	4	5
Кт, Км 3.4.1. Приготування і стерилізація композиції А для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 400 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 3.4.2. Приготування та стерилізація композиції Б для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 400 л	Композиція Б, 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 3.4.3. Приготування та стерилізація композиції В для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 400 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 3.4.4. Приготування та стерилізація розчину канаміцину для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 400 л	Розчин канаміцину, діаметр пор фільтру, стерильність	Мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль після стерилізації	$d=0.22$ мкм, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.5.1. Приготування і стерилізація композиції А для біосинтезу в ферментері об'ємом 4 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	$P = 0,05$ МПа, $t=112$ °С $\tau = 30$ хв, відсутність мікробіоти

Продовження табл. 4.9

1	2	3	4	5
Кт, Км 3.5.2. Приготування та стерилізація композиції Б для біосинтезу в ферментері об'ємом 4 м ³	Композиція Б, 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
Кт, Км 3.5.3. Приготування та стерилізація композиції В для біосинтезу в ферментері об'ємом 4 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
Кт, Км 3.5.4. Приготування та стерилізація розчину канаміцину для біосинтезу в ферментері об'ємом 4 м ³	Розчин канаміцину, діаметр пор фільтру, стерильність	Мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль після стерилізації	d=0.22 мкм, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1. Підтримання колекційної культури <i>E. coli</i> ВТУ2.13	Культура <i>E. coli</i> ВТУ2.13, тривалість, температура, мікробіологічна чистота	Мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль у процесі збереження	t = 4 °C, τ = 3-4 міс, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 4.2. Одержання робочої культури на агаризованому середовищі	Культура <i>E. coli</i> ВТУ2.13, температура, час, мікробіологічна чистота	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час культивування, мікробіологічний контроль після культивування	t = 37°C, τ = 24 год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 4.3. Вирощування робочої культури на агаризованому середовищі	Культура <i>E. coli</i> ВТУ2.13, температура, тривалість культивування, мікробіологічна чистота	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час культивування, мікробіологічний контроль після культивування	t = 37°C, τ = 24 год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 4.4. <i>Розмноження клітин E. coli</i> ВТУ2.13 в колбі	Культура <i>E. coli</i> ВТУ2.13, температура, тривалість культивування, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота	Термометр технічний, годинник, тахометр, мікробіологічний контроль	Частота обертів перемішуючого пристрою та температура визначається безперервно під час культивування, мікробіологічний контроль після культивування	t = 37°C, n = 200 об/хв, τ = 2-6 год, відсутність сторонньої мікробіоти

Продовження табл. 4.9

1	2	3	4	5
Кт, Км 4.5. Вирощування інокуляту в колбах на качалках	Посівний матеріал, тривалість культивування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота.	Термометр технічний, тахометр, годинник, мікробіологічний контроль	Частота обертів перемішуючого пристрою, температура – безперервно під час культивування, мікробіологічний контроль проводиться після вирощування.	$t = 37^{\circ}\text{C}$, $n = 200$ об/хв, $\tau = 12$ год, відсутність сторонньої мікробіоти.
Кт, Км 4.6. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 40 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.	$t = 37^{\circ}\text{C}$, $n = 200$ об/хв, $\tau = 12$ год, відсутність сторонньої мікробіоти.
Кт, Км 4.7. Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 400 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.	$t = 37^{\circ}\text{C}$, $n = 200$ об/хв, $\tau = 12$ год, відсутність сторонньої мікробіоти.
Кх, Кт, Км 5.1. Виробниче культивування в ферментері об'ємом 4 м ³	Культуральна рідина, рН, температура, швидкість перемішування, швидкість подачі аераційного повітря, рівень розчинного кисню, тривалість культивування, мікробіологічна чистота, концентрація біомаси, концентрація тирозину	Датчики рН, температури, розчинного кисню, тахометр, годинник, мікробіологічний контроль, визначення біомаси за допомогою оптичної густини, визначення тирозину за допомогою ВЕРХ	рН, температура, швидкість подачі повітря, рівень розчинного кисню та частота обертів перемішуючого пристрою визначаються безперервно під час культивування. Проби культуральної рідини для мікробіологічного контролю, визначення концентрації біомаси та концентрації тирозину відбираються кожні 6 годин	$\text{pH} = 6,95$, $t = 37^{\circ}\text{C}$, $n = 500-1000$ об/хв, $v=2$ л/хв, $\text{DO}=40\%$, $\tau = 80$ год, $X = 14$ г/л, $C = 43,14$ г/л, відсутність сторонньої мікробіоти

Закінчення табл. 4.9

1	2	3	4	5
Кт 6.1 Центрифугування культуральної рідини	Культуральна рідина, частота обертання, час	Годинник, датчик обертів	Під час процесу центрифугування	$n=5630$ об/хв $\tau=30$ хв
Кт 6.2. Мікрофільтрація	Супернатант, температура, час	Термометр технічний, годинник	Під час процесу мікрофільтрації	$t=20^{\circ}\text{C}$, $\tau=1$ год
Кт 7.1. Випарювання супернатанту	Супернатант, температура	Термометр технічний	Під час процесу випарювання	$t=80^{\circ}\text{C}$
Кт 8.1 Хроматографічна очистка тирозину	Концентрат тирозину, час	Годинник	Під час процесу хроматографічної очистки	$\tau=2$ год
Кх, Кт 8.2. Кристалізація	Розчин тирозину, рН розчину, швидкість подачі кислоти	Хімічний метод	Під час процесу кристалізації	$\text{pH}=9$, $v=917$ мл/хв
Кт 8.3. Фільтрування	Кристали тирозину, температура, тиск	Термометр технічний, манометр технічний	Під час процесу фільтрування	$t=80^{\circ}\text{C}$, $P=1$ бар
Кт 9.1. Вакуумна сушка тирозину	Сухі кристали тирозину, температура, тиск, вологість	Термометр технічний, манометр технічний, датчик вологості	Тиск та температура визначається під час процесу сушіння, вологість після сушіння	$t=40^{\circ}\text{C}$, $P=5$ мбар, $W=5\%$
Кт 10 Подрібнення та просіювання тирозину	Подрібнений тирозин, час подрібнення, розмір отворів сита	Годинник	Розмір отворів перевіряється перед просіюванням	$\tau=1,25$ год, $d=6$ мм, 250, 177, 149, 105 мкм

РОЗДІЛ 5. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ ВИРОБНИЦТВА ЛЗ

5.1. Матеріальний баланс на серію

Таблиця 5.1

Матеріальний баланс на серію капсул L-тироzinу

Прийнято	Кількість, кг	Отримано	Кількість, кг
ДР 1. Підготовка сировини			
L-тирозин	80	L-тирозин	79,6
Лактоза	69,6	Лактоза	69,25
Крохмаль	17,4	Крохмаль	17,3
Сорбіт	1,8	Сорбіт	1,79
Кальцію стеарат	1,8	Кальцію стеарат	1,79
Мікрокристалічна целюлоза	3,4	Мікрокристалічна целюлоза	3,38
		Втрати 0.5%	0,87
Всього	174	Всього	174
ТП 2. Одержання маси для наповнення капсул			
L-тирозин	79,6	Суміш для наповнення капсул	172,26
Лактоза	69,25		
Крохмаль	17,3		
Сорбіт	1,79		
Кальцію стеарат	1,79		
Мікрокристалічна целюлоза	3,38		
		Втрати 0.5%	0,87
Всього	173,13	Всього	173,13

					НУХТ БТЕК 02.02.12 КР ПЗ					
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата						
		Світлична В.О.			РОЗДІЛ 5. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ ВИРОБНИЦТВА ЛЗ					
		Красінько В.О.						Літ.	Арк.	Аркушів
									174	33
								Кафедра БТМ		
		Пирог Т.П.						174		

Прийнято	Кількість, кг	Отримано	Кількість, кг
ТІ 3. Наповнення капсул			
Суміш для наповнення капсул	172,26 кг або 200000 капсул	Капсули	169,68 кг або 197000 капсул
		Втрати 1.5%	2,58 кг або 3000 капсул
Всього	172,26	Всього	172,26
Матеріали			
Прийнято	Кількість, шт.	Отримано	Кількість, шт.
Флакони	2222	Флакони наповнені Відходи	2189 33
Всього	2222	Всього	2222
Інструкції	2222	Інструкції використані Відходи	2189 33
Всього	2222	Всього	2222
Картонні пачки	2222	Картонні пачки наповнені Відходи	2189 33
Всього	2222	Всього	2222
Коробки	64	Коробки наповнені Відходи	63 1
Всього	64	Всього	64

5.2. Специфікація обладнання ділянки виробництва ЛЗ

Специфікація обладнання, зображеного на апаратурній схемі, наведена у *табл.*

5.2.

Таблиця 5.2

Специфікація обладнання ділянки виготовлення лікарського препарату **L-тирозину в капсулах**

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
ПМ-1	Пральна машина	1	Машина марки ЛО-30 (Росія), завантажувальна маса сухої білизни 30 кг. Геометричний об'єм внутрішнього барабана 300 куб.дм.
СШ-2	Сушильна шафа	1	Завантажувальна маса сухої білизни 25 кг. Геометричний об'єм внутрішнього барабана 514 куб.дм. Продуктивність 75 кг/год.
С-3	Стіл для пакування одягу	1	Габаритні розміри, мм: 400×1000×700.
СТ-4	Стерилізатор паровий для стерилізації інвентарю та одягу	1	Виробник: Тюменський завод медобладнання та інструментів (Росія), об'єм стерилізаційної камери 560 куб.дм. Робочий тиск не більше 0,2 Мпа. Температура 132°C. Спосіб управління автоматичний.
Ст-5	Стелаж для зберігання і транспортування білизни	1	Встановлений на 4 поворотних колеса стелаж фірми "Blicke"(Німеччина), три просторі полиці, завантажувальна маса сухої білизни 3х35кг.
Д-6, Д-9, Д-12	Об'ємно-ваговий дозатор	3	Дозатор виробництва НВП "Техноваги". Точність зважування становить 0,1%
Р-7	Реактор змішувач для приготування 3% розчину перекису водню	1	Реактор з нержавіючої сталі об'ємом 160 л, оснащений перемішуючим пристроєм, виробник «Стройторгсервис» (Україна)

1	2	3	4
Н-8, Н-11, Н-14, Н- 15, Н-24, Н-28	Насос Відцентровий	6	Відцентровий насос фірми EBARA (Японія) серії Ebara 2CDX 200-30, продуктивністю 12,6 м ³ /год
Р-10	Реактор змішувач для приготування 6% розчину перекису водню	1	Реактор з нержавіючої сталі об'ємом 160 л, оснащений перемішуючим пристроєм, виробник «Стройторгсервис» (Україна).
Р-13	Реактор змішувач для приготування 76% розчину етанолу	1	Реактор з нержавіючої сталі об'ємом 160 л, оснащений перемішуючим пристроєм, виробник «Стройторгсервис» (Україна)
Ф-16	Патронний фільтр	1	Фільтр фірми „Укрфільтр”, розмір пор 0,45 мкм
З-17	Збірник води	1	Збірник водопровідної води, об'ємом 8 м ³
Н-18	Нагнітаючий насос	1	Автоматична установка водопостачання Гідроджет JP5/24, продуктивність 3м ³ /год., максимальний тиск 6 бар, максимальна температура 40 °С
Ф-19	Патронний фільтр	1	Фільтр фірми „Укрфільтр”, розмір пор 0,40 мкм
Ф-20	Пісочний фільтр	1	Фільтруючий матеріал – кварцевий пісок розміром 2,0-3,0 мм
Ф-21	Вугільний фільтр.	1	Фільтр BWТАKF 25/13 (Німеччина), фільтруючий матеріал – гранульоване активоване вугілля, робоча температура: 4-30 ° С, робочий тиск: 3-7 атм, продуктивність: 2,3 м ³ /год
П-22	Установка для пом'якшення води	1	Пом'якшувач води іонообмінний катіонітний, продуктивність 1,8-2,0 м ³ /год.
Ф-23	Патронний фільтр	1	Фільтр фірми „Укрфільтр”, розмір пор 10 мкм
Н-25	Високонапірний насос	1	Плунжерний насос, тип 1057Al-Bz, тиск 55-60 бар

1	2	3	4
30-26	Установка зворотного осмосу	1	Установка CU:RO фірми Eurowater, продуктивність 2 м ³ /год очищеної води
3-27	Збірник очищеної води	1	Збірник очищеної води об'ємом 4 м ³
Ф-29	Фільтр патронний.	1	Фільтр фірми „Укрфільтр”, розмір пор 0,22 мкм
О-30	Опромінювач води ультрафіолетовий.	1	Опромінювач ECOSOFT UV E-720 фірми Alterair (Україна), потужність 40 Вт, напруга 220 В, максимальний робочий тиск до 8 бар, продуктивність 2,721 л / год, максимальна температура води 40 ° С
ПЗ-31	Повітрозабірник	1	Повітрозабірник серії OBR 200 M-2K, виробник Bahçivan (Туреччина), продуктивність 1800 м ³ /год. Обладнаний металевою сіткою для видалення механічних забруднень
Ф-32, Ф-38	Фільтр грубої очистки	2	Фільтр фірми Alterair (Україна), фільтруючий матеріал - пінополіуретан, ефективність очищення 65-90% частинок розміром 5 мкм, перепад тиску 250 Па
В-33, В-37	Вентилятор	2	Вентилятор Soler&Palau(Іспанія) СМТ/2-180/075, потужність 0,75 кВт, продуктивність 1800 м ³ /год, частота обертання 2800 об/хв.
К-34	Кондиціонер	1	Кондиціонер DAIKINFDXS35F/RXS35L3 (Чехія), потужність 1,15 Вт, напруга 220-240 В, холодоагент R410A, теплопродуктивність 4 кВт

1	2	3	4
Ф-35	Фільтр тонкої очистки	1	Фільтр фірми Alterair (Україна), перепад тиску 450 Па, ефективність очищення 70% частинок розміром 1 мкм, фільтруючий матеріал скловолокно
Ф-36	Фільтр НЕРА	1	Фільтр фірми New Filter (Україна), ефективність очищення 99.95%, фільтруючий матеріал склопапір
З-39, З-45	Збірник для тирозину	2	Реактор з нержавіючої сталі об'ємом 100 л, виробник «Стройторгсервис» (Україна)
З-40, З-46	Збірник для допоміжних речовин	2	Реактор з нержавіючої сталі об'ємом 100 л, виробник «Стройторгсервис» (Україна)
В-41, В-42	Ваги	2	Вантажопідйомність 150 кг. Межі зважування 10-150 кг. Ціна ділення 50 г. Погрішність $\pm 0,15$ кг.
С-43	Вібросито	1	Виробник завод «Прогресс». Споживана потужність 2,2 кВт. Продуктивність 700 кг/год. Сито №11 або №20. Діаметр отвору (1,1 \pm 0,07)мм, (2 \pm 0,07)мм відповідно. Загрузка-вручну вигрузка-самоплином
С-44	Вібросито	1	Виробник завод «Прогресс». Споживана потужність 2,2 кВт. Продуктивність 700 кг/год. Сито №32 або №38. Діаметр отвору (0,2 \pm 0,03)мм, (0,195 \pm 0,021)мм відповідно. Загрузка-вручну вигрузка-самоплином
Р-47	Реактор змішувач для отримання порошку для наповнення	1	Реактор з нержавіючої сталі об'ємом 250 л, оснащений перемішуючим пристроєм, виробник «Стройторгсервис» (Україна)
З-48	Збірник порошку для наповнення	1	Реактор з нержавіючої сталі об'ємом 250 л, оснащений перемішуючим пристроєм, виробник «Стройторгсервис» (Україна)

1	2	3	4
КН-49	Установка для наповненню желатинових капсул	1	Капсулонаповнювальна машина ZANASI 25 фірми IMA (Італія), продуктивність 25000 капсул в годину. Загрузка-вручну вивозка- самоплином.
3-50	Збірник для наповнених капсул	1	Реактор з нержавіючої сталі об'ємом 250 л, оснащений перемішувачим пристроєм, виробник «Стройторгсервис» (Україна)
3-51, 3-53, 3-55	Збірник для некондиційних капсул	3	Реактор з нержавіючої сталі об'ємом 40 л, оснащений перемішувачим пристроєм, виробник «Стройторгсервис» (Україна)
С-51	Сито для обезпилювання капсул	1	Діаметр отвору сита (3,0 + 0,07) мм (5,0+0,09) мм. Завантаження і вивантаження вручну.
3-52	Збірник для знепиленних капсул	1	Реактор з нержавіючої сталі об'ємом 250 л, оснащений перемішувачим пристроєм, виробник «Стройторгсервис» (Україна)
ФЛ-54	Лінія фасовки капсул у флакони	1	Автоматична лінія для фасування капсул фірми КоролевФармТех (Росія). Лінія включає автомат для орієнтації флаконів, автомат для фасування капсул у флакони, конвеєрні ваги, автомат для вкладання вати у флакон, автомат для закупорювання флаконів, автомат для запайки мембрани та автомат для нанесення етикетки на флакон. Продуктивність – до 60 флаконів за хвилину.
ПМ-56	Машина для упаковки флаконів в коробки	1	Машина SVC 1600 (Росія), продуктивність 20-60 упаковок за хвилину.

1	2	3	4
ПМ-57	Машина для пакування у групову упаковку	1	Машина Romaco Promatic PAK 100 (Італія), продуктивність – 5 коробок на хвилину.
РМ-58	Машина для різки некондиційних капсул	1	Продуктивність 60 кг/год. Загрузка-вручну вигрузка- самоплином, виробник Україна.

5.3. Опис технологічної схеми ділянки виробництва ЛЗ

Технологічна схема отримання тирозину 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, наповнення капсул) та стадії пакування, маркування, відвантаження (фасування капсул у флакони, пакування флаконів у картонні пачки та пакування пачок у групову тару).

ДР 1. Підготовка персоналу до роботи

ДР 1.1. Навчання персоналу

При прийнятті на роботу персонал повинен пройти підготовку за фахом, включаючи ознайомлення з "Правилами організації виробництва і контролю якості лікарських засобів (GMP)" і інструкцій з дотримання правил гігієни. Періодично персонал проходить технологічний інструктаж. Також навчання персоналу включає вивчення посадових інструкцій, правил внутрішнього розпорядку підприємства, вивчення вимог санітарії, правил особистої гігієни, заходів пожежної безпеки, правил охорони праці і техніки безпеки.

ДР 1.2. Перевірка знань персоналу

Після закінчення навчання робітники повинні пройти перевірку отриманих знань: по правилах GMP - у формі тестування; по знанням СОП - у формі співбесіди (теорія) і демонстрації практичних навичок на робочому місці (практика); по охороні праці і екології - у формі співбесіди.

ДР 1.3. Підготовка до роботи у чистих приміщеннях

У гардеробній верхнього одягу персонал знімає верхній одяг, головні убори, вуличне взуття і надягає перехідний одяг (халат, шапочку або косинку, тапочки), що використовують для переміщення персоналу поза виробничими зонами. Потім персонал направляється в умивальну, де миє руки.

Далі персонал іде в гардероб технологічного одягу, де знімає перехідний одяг (халат, шапочку або косинку) і одягає технологічний одяг (халат або блузон і штани і шапочку або косинку) і в перехідних тапочках направляється до роздільного коврику. Працівники в технологічному одязі і перехідному взутті стають на половину роздільного коврика, ретельно витирають підошву тапочок об нього, знімають перехідне взуття і одягають технологічне взуття, стаючи нею на іншу половину роздільного коврика. Потім персонал направляється до умивальника, де миє і обробляє дезінфікуючими засобами руки. руки теплою водою до ліктів. Сушать руки за допомогою повітряної сушарки.

В якості дезінфікуючого засобу використовують «Віпасепт». Витрата дезінфікуючого засобу виходячи з розрахунку 9-10 мл на людину вдень. Антисептичну обробку рук проводять відповідно до вимог інструкції. Наливають на долоню з дозатора близько 5 мл антисептика, ретельно розподіляють його по внутрішній і зовнішній поверхні кисті, між пальцевими проміжками і навколо нігтевим простором рук і дають висохнути. Рукавички використовує персонал безпосередньо контактуючий з сировиною і не розфасованим продуктом. Дезобробку рук проводять через кожні 2-3 години, але не менш 3 разів в зміну.

Після того, як надітий весь комплект захисного спеціального одягу (*від ДР 2.6*), персонал обробляє руки антисептиком, надягає рукавички і входить у виробничі приміщення на ділянку виробництва капсул. При необхідності вийти з виробничого приміщення, персонал робить операції перевдягання у зворотному порядку, зводячи до мінімуму забруднення одягу. При повторному вході у виробниче приміщення, персонал проходить всі стадії обробки спочатку, з обов'язковою антисептичною обробкою рук.

Визначення мікробної контамінації рук персоналу проводить мікробіолог один раз в тиждень під час виробничого процесу, в кожному виробничому приміщенні, вибірково в декількох працівників і один раз в два тижні безпосередньо після обробки рук антисептиками. Контроль мікробної мікрофлори рук персоналу здійснюється за допомогою змивів тампонами. Після обробки рук антисептиками в змивах з рук не повинні міститися життєздатні мікроорганізми.

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

ДР 2. Підготовка технологічного одягу

ДР 2.1. Прання технологічного одягу

Прання технологічного одягу здійснюється в спеціально призначених для цього приміщеннях D класу чистоти. Прання проводять в пральній машині (ПМ-1) протягом 20-30 хвилин з моменту включення машини. На кожний кілограм одягу, що завантажується, повинно припадати не менш 10 л розчину миючого засобу. Для прання слід використовувати синтетичні миючі засоби, що володіють низькими піноутворюючими властивостями. Концентрація розчину – 2 г/л, рекомендована температура прання 90°C.

ДР 2.2. Ополіскування технологічного одягу

Після закінчення прання одяг кілька разів ополіскують протягом 20-30 хвилин водою очищеною (від ДР 6.4) спочатку теплою, потім холодною.

ДР 2.3. Сушіння технологічного одягу

Після прання одяг струшують та по комплектах розвішують на плічки і поміщають в спеціальну шафу (СШ-2), в яку через фільтр тонкого очищення поступає тепле повітря при температурі 100°C протягом 120 хвилин.

ДР 2.4. Пакування технологічного одягу

Після закінчення сушки кожен комплект технологічного одягу загортають в два шари рослинного пергаменту на пакувальному столі (С-3). Після цього згортки

поміщають в бікси або інші контейнери, що закриваються кришками, і передають на стерилізацію.

ДР 2.5. Стерилізація технологічного одягу

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

ДР 2.6. Зберігання технологічного одягу

Пакети з одягом зберігають на стелажах (Ст-5) в окремому спеціально обладнаному чистому приміщенні із забезпеченням збереження упаковки у місці, що по класу чистоти перевищує приміщення, в якому одяг експлуатуватиметься при відносній вологості приміщення не більше 60%.

Мікробіологічний контроль одягу здійснюється вибірково у декількох робітників нерідше одного разу на тиждень. У змивах допускається наявність не більше 10 мікроорганізмів (бактерій і грибів сумарно) на 100 см² площі поверхні, при відсутності бактерій родини *Enterobacteriaceae*

ДР 3. Підготовка дезінфікуючих розчинів

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

Для приготування 100 л 3 % розчину перекису водню у реактор-змішувач (Р-7) об'ємом 160 л, обладнаного перемішуючим пристроєм, через об'ємно-ваговий дозатор (Д-6) вносять 12 л 30% розчину перекису водню та додають 88 л води очищеної (від ДР 6.4) та вмикають перемішуючий пристрій.

Для приготування 100 л 6 % розчину перекису водню у реактор-змішувач (Р-10) об'ємом 160 л, обладнаного перемішуючим пристроєм, через об'ємно-ваговий дозатор (Д-9) вносять 24 л 30% розчину перекису водню та додають 76 л води очищеної (від ДР 6.4) та вмикають перемішуючий пристрій. Приготовлений розчин перекису водню можна зберігати в герметично закритій скляній посудині в прохолодному місці не більше доби.

ДР 3.2. Приготування розчину етанолу 76%.

Для приготування 100 л спирту етилового 76 % у реактор-змішувач (Р-13) об'ємом 160 л, обладнаного перемішуючим пристроєм, через об'ємно-ваговий дозатор (Д-12) вносять 79,2 л 96% етилового спирту, додають 20,8 л води очищеної (від ДР 6.4) та вмикають перемішуючий пристрій. Приготовлений розчин спирту етилового 76% зберігають в герметично закритій скляній посудині в прохолодному місці не більше 5-6 діб.

ДР 3.3. Приготування робочого розчину «Гуасепт»

Для дезінфекції поверхонь необхідно приготувати 0,3% розчин «Гуасепт». У чисте емальоване відро об'ємом 10 л наливають 30 мл концентрату дезінфікуючого розчину та 10 л водопровідної води. Зміна відра відбувається через кожні 10 м² приміщення.

Розчин використовують для щоденної обробки стін, дверей, підлоги, зовнішніх поверхонь технологічного обладнання, обробки виробничої зони ізони контролю якості. Приготовлений розчин можна зберігати у прохолодному місці протягом 60 діб.

ДР 3.4. Приготування робочого розчину «Бланідак Актив»

Для дезінфекції поверхонь необхідно приготувати 0,1% розчин «Бланідак Актив» КС. У чисте емальоване відро об'ємом 10 л додають 10 мл концентрату дезінфікуючого розчину та 10 л водопровідної води. Зміна відра відбувається через кожні 10 м² приміщення.

Розчин використовують для щоденної обробки стін, дверей, підлоги, зовнішніх поверхонь технологічного обладнання, обробки виробничої зони ізони контролю якості. Приготовлений розчин можна зберігати у прохолодному місці протягом 16 діб.

ДР 4. Підготовка виробничих приміщень

ДР 4.1. Щоденне прибирання

Щоденне очищення й дезінфекцію приміщень проводять безпосередньо по закінченню виробничого процесу, після кожної зміни. Збирають розсипані тверді інгредієнти, механічні забруднення за допомогою пилососа, витирають проліті рідини. Відходи при фасовці і упаковці препарату (залишки друкованої продукції

розривають, номери серій закреслюють фломастером). Весь викинутий матеріал використанню не підлягає.

Проводять вологе вбирання теплою водою із застосуванням робочого розчину «Гуасепт» (від ДР 3.3) або «Бланідас Актив» (від ДР 3.4), із розрахунком 100 мл/м², протираючи поролоною губкою панелі, стіни, двері, ручки дверей, повітропроводи, опалювальні прилади і простір за ними, потім цим ж розчином миють підлогу. Обробку приміщень починають в точці, найбільш віддаленій від дверей.

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

Після прибирання здійснюють мікробіологічний та хімічний контроль. Безпосередньо після обробки дезінфекційними розчинами поверхні приміщень не повинні знаходитися життєздатні мікроорганізми.

На поверхнях виробничих приміщень у процесі виробництва допускається не більше 1 КУО на 100 см² площі поверхні та не допускається наявність бактерій родини *Enterobacteriaceae*, *S. aureus* та *P.aeruginosa*; повинні бути відсутніми залишки миючих розчинів на поверхні приміщень.

ДР 4.2. Генеральне прибирання

Генеральну підготовку виробничих приміщень D класу чистоти слід проводити робочим розчином «Гуасепт» (від ДР 3.3) або «Бланідас Актив» (від ДР 3.4). Стіни, двері і інші поверхні приміщення слід протирати поролоною губкою, рясно змоченою робочим розчином з розрахунку 100 мл/м², потім цим же розчином вимити підлогу.

Також проводиться очищення освітлювального оснащення, скляних поверхонь, віконних рам.

Після прибирання здійснюють мікробіологічний та хімічний контроль. Безпосередньо після обробки дезінфекційними розчинами на поверхні приміщень не повинні знаходитися життєздатні мікроорганізми.

На поверхнях виробничих приміщень у процесі виробництва допускається не більше 1 КУО на 100 см² площі поверхні та не допускається наявність бактерій

родини *Enterobacteriaceae*, *S. aureus* та *P.aeruginosa*; повинні бути відсутніми залишки миючих розчинів на поверхні приміщень.

ДР 5. Підготовка обладнання, інвентарю та трубопроводів

ДР 5.1. Миття обладнання та комунікацій

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

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

Потім обладнання промивають водою очищеною до одержання позитивного результату при контролі відмивання на відсутність миючих і дезінфікуючих засобів і слідів попереднього препарату. Після мийки внутрішні частини устаткування сушать стисненим повітрям.

ДР 5.2. Технічний огляд обладнання

Технічний огляд обладнання здійснюється технологом або майстром ділянки. При виявленні недоліків чи несправності обладнання проводиться його ремонт.

ДР 5.3. Дезінфекція обладнання та комунікацій

Внутрішні частини устаткування, розбірні деталі, які стикаються із продуктом, дезінфікують 76% розчином етилового спирту (від ДР 3.2). Після використання матеріали для обробки протягом 2-3 годин знешкоджують замочуванням в розчині пероксиду водню 6% (від ДР 3.1).

Після дезінфекції здійснюють мікробіологічний та хімічний контроль. Безпосередньо після обробки дезінфекційними розчинами у змивах з обладнання не повинні знаходитися життєздатні мікроорганізми.

У процесі виробництва не допускається наявність бактерій родини *Enterobacteriaceae*, *S. aureus* та *P.aeruginosa*; повинні бути відсутніми залишки дезінфікуючих розчинів на обладнанні.

ДР 6. Підготовка води очищеної

ДР 6.1. подача води

Водопровідна вода через патронний фільтр (Ф-16) за допомогою насосу (Н-15) поступає в накопичувальний збірник (З-17). Оптимальна температура води, що подається на установку очищення води складає 25⁰С, для цього в збірник (З-17) добавляють 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) за допомогою насосу (Н-18) подається на патронний фільтр (Ф-19), а далі на пісочний фільтр (Ф-20), при цьому підтримується постійне значення тиску в лінії подачі води 3-4 бар. Пісочний фільтр затримує домішки розміром до 10 мкм.

ДР 6.2.2. Очистка через вугільний фільтр

Після пісочного фільтра вода (від ДР 6.2.1) поступає на вугільний фільтр (Ф-21). Фільтрація через вугільний патронний фільтр дозволяє знизити концентрацію органічних речовин і хлору.

ДР 6.2.3 Пом'якшення води

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

ДР 6.2.4. Остаточна очистка води від механічних домішок

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

ДР 6.3. Отримання води очищеної

ДР 6.3.1. Зворотньоосмотичне фільтрування

Високонапірний плунжерний насос (Н-25) підвищує тиск води (від ДР 6.2.4) до 30-65 бар, в результаті чого приблизно 30 % поданої води проштовхуються на сторону чистої води через мембрани модуля установки зворотного осмосу (ЗО-26). Іони солей та інші забруднення не можуть проникнути через мембрану і разом із залишком поданої води витісняються наступною порцією води, що надходить до модуля.

Концентрат через клапан при нормальній роботі установки направляється в каналізаційний колектор (до ЗВ 13.1). Для здійснення контролю очищеної води відбирають пробу через вентиль відбору проби. Значення електропровідності очищеної води повинно бути не більше за 8,5 мкС/см.

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

ДР 6.4. Розподіл води очищеної

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

ДР 7. Підготовка вентиляційного повітря

Очищення повітря, що подається у виробничі приміщення класу чистоти D, проводять по 3-х східчастих системі: попередньої, тонкої і надтонкої очистки.

ДР 7.1. Забір повітря

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

ДР 7.2. Грубе очищення повітря

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

ДР 7.3. Транспортування технологічного повітря

Після фільтрів (Ф-32) попереднього очищення повітря надходить у систему вентиляції за рахунок вентилятора (В-33).

ДР 7.4. Регуляція термодинамічних показників повітря

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

ДР 7.5. Тонке очищення повітря

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

ДР 7.6. Надтонке очищення повітря

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

Проводиться мікробіологічний контроль очищеного повітря не рідше 1 разу на тиждень. Повинно бути не більше 200 КУО життєздатних мікроорганізмів на 1 м³ повітря.

ДР 8. Підготовка сировини

Сировина та допоміжні матеріали, які використовуються при виробництві тирозину в капсулах, надходять зі складу заводу на візках або автокарах в первинній тарі постачальника з обов'язковою вказівкою статусу сировини та наявністю протоколу аналізу вхідного контролю. Отримана зі складу сировина зберігається в спеціально відведеній коморі в кількості необхідній для виробництва однієї серії.

ДР. 8.1. Зважування сировини

Субстанцію тирозину зважують на вагах (В-41) у збірнику (З-39). На вагах (В-42) у збірнику (З-40) зважують кальцію стеарат, лактозу, крохмаль, мікрокристалічну целюлозу (МКЦ) та сорбіт.

ДР. 8.2. Просіювання сировини

Тирозин (від ДР 8.1) просіюють на просіювачі (С-43) з ситом №11 або №20. Завантаження проводять вручну за допомогою совка, вивантаження здійснюється самоплином у збірник (З-45).

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

ТП 9. Одержання маси для наповнення капсул

ТП 9.1. Змішування

Змішування здійснюється в реакторі-змішувачі (Р-47). Сировину (від ДР 8.2) завантажують із збірок (З-45, З-46) в реактор-змішувач (Р-47) за допомогою вакуумного завантаження та перемішують 3 хв. Готова маса для наповнення капсул вивантажується у збірник (З-48).

ТП 10. Наповнення капсул, знепилювання і полірування

ТП 10.1. Наповнення капсул

Наповнення здійснюється на установці для наповнення капсул (КН-49). Заповнюють порожніми капсулами бункери для капсул (порожні капсули додаються в міру використання). Заповнюють прийомний бункер для порошку за допомогою вакуумного завантаження масою для наповнення капсул (від ТП 9.1). Наповнення капсул проводиться у автоматичному режимі при тиску стиснутого повітря – 6 бар (0,6 МПа), тиску вакууму – 0,02 бар (0,002 МПа). Наповнення твердих желатинових капсул здійснюється в п'ять операцій: спочатку здійснюється орієнтування порожніх капсул, потім розкриття порожніх капсул, наповнення корпусу капсули здійснюється шляхом подання наповнювача з бункера у дозувальний канал, з якого порошок надходить у корпус капсули. Після цього відбувається з'єднання і закриття тіла і кришечки капсули, далі капсули заклеюються підпавленою стрічкою желатину або полівінілового спирту. Далі йде відбракування порожніх капсул (легко відсмоктуються, якщо мають меншу масу), які 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 на установці (С-51). Обезпилені капсули надходять у збірник (З-52). Некондиційні 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*) із збірника (З-52) завантажують в бункер фасувального автомату автоматичній лінії для фасування капсул (ФЛ-54) (капсули додають в міру їх використання).

Капсули з бункера автоматично по багатоканальному конвеєру проходять через станцію розпізнавання, де відбувається відлік 90 капсул і їх фасування за допомогою погрузаємого сопла у флакон, що виключає можливість втрати продукту. Після цього флакони з капсулами переміщуються за допомогою транспортерної стрічки, а на їх місце надходять порожні.

Потім флакони з капсулами проходять по конвеєрним вагам, де перевіряється маса флаконів з капсулами. Система подає звуковий сигнал при виявленні відхилення у вазі, при цьому відбувається відбраковування цих флаконів за допомогою пневматичної системи.

Далі за допомогою ватонабивного автомату здійснюється вкладання вати в флакон з капсулами, щоб капсули не стиралися в процесі транспортування, або зберігання.

Ватонабивний автомат використовує в якості сировини довгий рулон вати або бавовни, який поділяється на шматочки необхідного розміру і вставляється в флакон з капсулами в автоматичному режимі.

Після цього здійснюється закручування кришки за допомогою спеціального автомата. Кришка закручується за допомогою обертових роликів поступово, у міру проходження флакона по конвеєру.

Далі за допомогою системи індукційного запаювання мембрани відбувається герметичне запаювання горлечка флакону алюмінієвою мембраною, що гарантує справжність, стійкість продукту і захищає від зовнішніх факторів під час транспортування.

Для закупорювання мембраною флакон з попередньо закрученою кришкою по конвеєру надходить на автомат індукційного запаювання. Індукційна котушка випромінює високочастотне електромагнітне поле, алюмінієвий диск нагрівається і полімер, нанесений на цей диск, плавиться і припаюється до горлечка флакона.

Після цього флакони направляються на етикетировочну машину для маркування. Флакони з капсулами маркуються шляхом нанесення етикетки за допомогою етикетировочної машини.

На етикетці, виготовленій поліграфічним способом друку, попередньо вказують назву препарату, концентрацію, виробник, умови зберігання.

При проходженні стрічки з етикетками через друкарський пристрій на етикетку наносять номер серії та термін придатності.

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

Після наклеювання етикеток флакони передаються на автомат для упаковки у картонні пачки.

Розфасовані у флакони капсули передають на операцію ПМВ 11.2.

Некондиційні капсули надходять у збірник (З-55) на стадію ПВ 12.

ПМВ 11.2 Пакування флаконів у пачки.

Пакування флаконів з капсулами (від ПМВ 11.1) у вторинну упаковку – картонні пачки здійснюється на фасувально-пакувальній машині (ПМ-56).

Пакування здійснюється за допомогою картонажної машини (ПМ-56), яка формує пачку, поміщає в картонну пачку інструкцію і флакон, наносить на клапан картонної пачки маркування (дату, фармкод), закриває заповнену картонну пачку.

На картонних пачках попередньо зазначається назва виробника, його товарний знак і адреса, назва препарату латинською і українською мовами, концентрація, умови зберігання, реєстраційний номер, штриховий код.

Упаковки передають на станцію ПМВ 11.3.

ПМВ 11.3. Пакування пачок у групову тару

На пачці та етикетці групової тари вказують назву заводу, його товарний знак, адресу назву препарату латинською, українською або латинською, українською та

російською мовою, дозування, кількість капсул в упаковці, «Застосування за призначенням лікаря», «Зберігання в недоступному для дітей місці», умови зберігання, номер реєстрації, номер серії, термін придатності, штриховий код. На етикетці групової тари додатково вказують кількість упаковок.

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

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

ПВ 12. Переробка відходів

Капсули некондиційні після стадії наповнення (від ТП 10.1) та обезпилювання (від ТП 10.2) та стадії пакування у флакони (від ПМВ 11.1) надходять у машину для різки некондиційних капсул (РМ-58). В бункер даної машини капсули некондиційні завантажують за допомогою совка.

ЗВ 13. Знешкодження відходів

ЗВ 13.1. 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 і можуть зливатися в міську каналізаційну мережу без попереднього очищення.

ЗВ 13.2. Знешкодження твердих відходів

Тверді відходи (пил лікарських засобів), які осідають в рукавних фільтрах систем місцевих відсмоктувань і вакуумних пилеприбирань збираються в спеціальні мішки і утилізуються. Збір і утилізація твердих відходів виробництва (упаковки, тари і т. д.) проводиться згідно діючим договорам на утилізацію відходів.

ЗВ 13.3. Очистка відрацьованого повітря.

Відпрацьоване повітря з виробничих приміщень за допомогою вентилятора (В-37) направляється на фільтри класу G3 (Ф-38) та очищається від пилу та домішок, ефективність очищення складає 65-90% частинок розміром 5 мкм.

5.4. Контроль ділянки виробництва ЛЗ

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

Контроль ефективності обробки антисептиками рук персоналу проводять не рідше одного разу на місяць безпосередньо після їх обробки перед надяганням рукавичок, контроль мікробіологічної чистоти рук (рукавичок) під час виробничого процесу - не рідше одного разу на тиждень вибірково у декількох робітників. Контроль мікробіологічної чистоти одягу під час виробничого процесу проводять вибірково у декількох робітників не рідше одного разу на тиждень.

Використовують метод змивів тампонами. Випробування проводять у лабораторії, дотримуючись правил асептики. Кожний тампон ретельно виполіскують в пробірці, щомістить 10 мл буферного розчину із натрію хлоридом і пептоном рН 7.0.

З кожної пробірки, що містить змивну рідину, роблять посів по 1 мл в дві чашки Петрі з поживним середовищем для вирощування бактерій і в дві з поживним середовищем для вирощування грибів, використовуючи один з наведених нижче методів, описаних в ДФУ (розділ 2.6.12) для випробування мікробіологічної чистоти нестерильних лікарських засобів:

- метод глибинного висівання;
- метод двошарового висівання.

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

При проведенні випробування на наявність *S.aureus* і *P.aeruginosa* 5 мл змивної рідини вносять у 50 мл відповідних рідких поживних середовищ, 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 наявності росту мікроорганізмів на контрольних поживних середовищах, партію поживного середовища вважають непридатною, а випробування, проведене з використанням цієї партії середовища - недійсним.

Облік результатів: Після закінчення інкубації для кожного змиву з однієї руки підраховують кількість колоній на всіх чашках Петрі з кожним поживним середовищем, знаходять середнє арифметичне значення та, множачи його на 10, обчислюють кількість бактерій або грибів у змивах з однієї руки.

При наявності візуальних ознак росту у флаконах зживильним середовищем №3 проводять ідентифікацію бактерій родини *Enterobacteriaceae* по ДФУ (розділ 2.6.13).

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

У змивах, взятих з одягу та рукавичок після термічної обробки, допускається наявність не більше 10 мікроорганізмів (бактерій і грибів сумарно) на 100 см^2 площі поверхні одягу чи площі однієї рукавички, при відсутності бактерій родини *Enterobacteriaceae*. У змивах з рук (рукавичок) персоналу не допускається наявність *S.aureus* та *P.aeruginosa*. Результати випробувань реєструють.

Контроль мікробіологічної чистоти поверхонь виробничих приміщень

Контроль мікробіологічної чистоти поверхонь виробничих приміщень проводять не рідше одного разу на тиждень під час виробничого процесу і не рідше одного разу на місяць після обробки дезінфікуючими розчинами.

Випробування методом відбитків. Готують агарові пластини одним з наведених нижчеспособів:

- в чашки Петрі діаметром 100 мм по радіусам закладають 4шматки марлі, стерилізують, потім заливають поживним середовищем.Після застигання середовища його розрізають на 4 сектори,дотримуючись правил асептики;

- заливають поживне середовище у поглиблення кришечкибакпечатки і дають застигнути;

- використовують готові агарові пластини.

Підготовлені матеріали вміщують у бікс. Перед передачею біксів 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, якіописані 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 площі100 см²; N - середнє арифметичне значення числа колоніймікроорганізмів; S - площа пластини (см²).

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 виробничих приміщень у процесі виробництва допускається не більше 1 КУО на 100 см² площі поверхні та не допускається наявність бактерій

родини *Enterobacteriaceae*, *S. aureus* та *P. aeruginosa*. Результати випробувань реєструють.

Контроль видалення миючих засобів з поверхні приміщень

Повноту видалення залишків мийних засобів на основі аніонних поверхнево-активних речовин з робочих поверхонь технологічного обладнання, комунікацій, інвентарю, внутрішньоцехової тари контролюють шляхом визначення вмісту залишкової кількості мийних засобів (за залишками аніонних поверхнево-активних речовин) в останній порції промивної води.

Наявність аніонних поверхнево-активних речовин у промивній воді визначають шляхом додавання до 50 см³ останньої порції промивної води 5 крапель 1 % розчину фенолфталеїну (при необхідності суміш нейтралізують 1 моль/ дм³ розчином гідроокису натрію чи 0.5 моль/дм³ розчином сірчаної кислоти до слабкорозового забарвлення) і додають 15 см³ хлороформу, 10 см³ змішаного індикатору та 10 см³ 0,004 моль/дм³ розчину гіаміну 1622. Зникнення рожевого і поява сіро-синьозабарвлення свідчить про наявність залишків мийних засобів на основі аніонних поверхнево-активних речовин.

Контроль мікробіологічної чистоти технологічного обладнання

Контроль мікробіологічної чистоти обладнання проводять не рідше одного разу на місяць після обробки дезінфікуючими розчинами та відповідної експозиції.

Проведення випробувань: Кожний тампон ретельно виполіскують у пробірці, щомістить 10 мл стерильного буферного розчину із натрію хлоридом і пептоном рН 7.0.

З кожної пробірки, яка вміщує змивну рідину, роблять посів по 1 мл в дві чашки Петрі з поживним середовищем для вирощування бактерій та в дві - з середовищем для вирощування грибів, використовуючи один з приведених нижче методів, описаних в ДФУ (розділ 2.6.12) для випробування мікробіологічної чистоти нестерильних лікарських засобів

- метод глибинного висівання;
- метод двошарового висівання.

Чашки Петрі з поживним середовищем для вирощування бактерій інкубують при температурі 32.5 ± 2.5 °C, з середовищем для вирощування грибів - при температурі 22.5 ± 2.5 °C не менше 5 діб.

При проведенні випробування на наявність бактерій родини *Enterobacteriaceae*, *S.aureus* та *P.aeruginosa* 5 мл змивної рідини вносять у 50 мл відповідних рідких поживних середовищ, які інкубують при температурі 32.5 ± 2.5 °C протягом 48 год.

Облік результатів: Після закінчення терміну інкубації проводять перегляд чашок на наявність росту мікроорганізмів. При проведенні 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 з технологічного обладнання безпосередньо після їх обробки не повинні знаходитися життєздатні мікроорганізми.

Контроль повноти видалення дезінфікуючих засобів з поверхні обладнання

Повноту видалення залишків дезінфекційних та мийно-дезінфекційних засобів з об'єктів хіміко-фармацевтичної промисловості контролюють шляхом визначення вмісту залишкової кількості активної діючої речовини в останній порції промивної води.

Повноту видалення перекису водню з поверхні об'єктів контролюють шляхом додавання до 1 см³ останньої порції промивної води 0.2 см³ розведеної соляної кислоти, 2 см³ ефіру для наркозу та 0.2 см³ розчину біхромату калію. Поява синього забарвлення ефірного шару після збовтування свідчить про наявність залишків перекису водню на поверхні оброблених об'єктів.

Допускається контролювати повноту видалення залишків дезінфекційних та мийно-дезінфекційних засобів з групи окислювачів (дезактин, перекис водню, хлорантоїн) з робочих поверхонь технологічного обладнання, комунікацій, інвентарю, внутрішньоцехової тари за допомогою індикаторного йод-крохмального паперу (ТУ 6-09-3409). Індикаторний йод-крохмальний папір зволожують промивною водою з відповідного об'єкту. Зміна

кольоруіндикаторного паперу до синього чи синьо-чорного свідчить про наявність залишків дезінфекційних засобів з групи окислювачів на поверхні об'єкту.

Контроль вмісту мікроорганізмів в повітрі

Контроль вмісту мікроорганізмів в повітрі виробничих приміщень слід проводити під час виробничого процесу приміщень класу D не рідше одного разу на тиждень аспіраційним методом, який заснований на принципі ударної дії струму повітря. Використовують пробовідбірники інерційного типу (імпактори).

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 проби залежить від очікуваної концентрації мікроорганізмів у повітрі. Сумарний об'єм проби має бути таким, щоб для кожної контрольної точки сумарне число колоній, які зросли на поверхні агару в усіх чашках Петрі, було не менше 40.

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

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

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

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

Максимально допустима кількість мікроорганізмів (бактерій і грибів сумарно) в 1 м^3 повітря для приміщення класу D становить 200 КУО.

Методики контролю тирозину в капсулах наведені у 3.5.3.

Карта постадійного контролю наведена у *табл. 5.3*.

Карта контролю

Таблиця 5.3

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	Руки персоналу, кількість колонеутворюючих одиниць	Мікробіологічний метод, метод змивів тампонами	Не рідше одного разу на місяць безпосередньо після їх обробки перед надяганням рукавичок, під час виробничого процесу - не рідше одного разу на тиждень вибірково у декількох робітників.	Після обробки рук антисептиками в змивах з рук не повинні міститися життєздатні мікроорганізми. Під час виробничого процесу в змивах з рук (рукавичок) допускається наявність не більше 10 мікроорганізмів (бактерій і грибів сумарно) на 100 см ² площі поверхні одягу чи площі однієї рукавички та не допускається наявність бактерій родини <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>S.aureus</i> та <i>P.aeruginosa</i> .
Кт, Кх 2.1 Прання технологічного одягу	Одяг, концентрація миючого засобу, температура води, час прання	Хімічний метод, термометр технічний, годинник	Під час прання одягу	C=0,3%, t=90 ⁰ 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 ⁰ 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 ⁰ C, τ = 45 хв

Продовження табл. 5.3

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 «Гуасепт»	Розчин «Гуасепт», концентрація розчину	Хімічний метод	Після приготування розчину	C=0,3%
Кх 3.4 Приготування робочого розчину «Бланідас Актив»	Розчин «Бланідас Актив», концентрація розчину	Хімічний метод	Після приготування розчину	C=0,1%
Кт, Кх 4.1 Щоденне прибирання	Поверхні виробничих приміщень; кількість колонеутворюючих одиниць, наявність миючих засобів	Мікробіологічний метод змивів тампонами або 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 післяобробки дезінфекційними розчинами не повинні знаходитися життєздатні мікроорганізми. У процесі виробництва допускається не більше 1 КУО на 100 см ² площі поверхні та не допускається наявність бактерій родини <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>S. aureus</i> та <i>P. aeruginosa</i> ; відсутність залишків миючих розчинів на поверхні приміщень

Продовження табл. 5.3

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 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 післяобробки дезінфекційними розчинами не повинні знаходитися життєздатні мікроорганізми. У процесі виробництва допускається не більше 1 КУО на 100 см ² площі поверхні та не допускається наявність бактерій родини <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>S. aureus</i> та <i>P. aeruginosa</i> ; відсутність залишків миючих розчинів на поверхні приміщень
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 дезінфекції обладнання, мікробіологічний контроль - не рідше одного разу на місяць після обробки дезінфекційними розчинами та відповідної експозиції, хімічний контроль – кожного разу	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

Продовження табл. 5.3

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	Манометр технічний, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	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 кондиціонування повітря	t = 30-35 °C, W=60%
Кт 7.5 Тонке очищення повітря	Повітря, ступінь очищення	Манометр технічний, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	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	Манометр технічний, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра, мікробіологічний контроль	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 м ³
Кт 8.2 Просіювання сировини	Діюча та допоміжні речовини, діаметр сита	Візуальний контроль	Перед просіюванням	Діаметр отворів сита по номеру сита: Сито №20- (2,0±0,070)мм; №10- (1,0±0,070)мм; №32- (0,2±0,030)мм; №38- (0,2±0,195)мм
Кт 9.1. Змішування	Діюча та допоміжні речовини, час	Годинник	Під час змішування	τ = 3 хв

Закінчення табл. 5.3

1	2	3	4	5
Кт 10.1 Наповнення капсул	Капсули, тиск повітря, тиск вакууму	Манометр технічний	Під час наповнення	P(повітря)=6 бар (0,6 МПа), P(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	Манометр технічний, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення	E = 65-90 % (частинок розміром 5 мкм) тиск згідно паспорту

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Xu S., Zhang Y., Li Y., Xia X., et. al. Production of L-tyrosine using tyrosine phenol-lyase by whole cell biotransformation approach. *Enzyme Microb. Technol.* 2019; 131: 109430. doi: 10.1016/j.enzmictec.2019.109430
2. Kim S.C., Min B.E., Hwang H.G., Seo S.W., Jung G.Y. Pathway optimization by re-design of untranslated regions for L-tyrosine production in *Escherichia coli*. *Scientific reports.* 2015; 5: 13853. doi: 10.1038/srep13853
3. Huang J., Lin Y., Yuan Q., Yan Y. Production of tyrosine through phenylalanine hydroxylation bypasses the intrinsic feedback inhibition in *Escherichia coli*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2015; 42(4): 655-659. doi: 10.1007/s10295-015-1591-z
4. Датиєва В.К., Ляшенко Е.А., Левин О.С. Применениемелатонинапринарушениисна. *Современная терапия в психиатрии и неврологии.* 2015; 1: 36-38.
5. Немченко А.С., Міщенко В.І., Тимофєєв С.В, Винник О.В., Савченко А.С. Аналіз асортименту парафармацевтиків, що застосовуються для профілактики нервових захворювань в Україні. 2018; 176-178. <http://dspace.nuph.edu.ua/bitstream/123456789/18182/1/176-178.pdf>
6. Сиволап В.Д. Основи діагностики захворювань щитоподібної залози: навч. посіб. / В. Д. Сиволап, Е. Ю. Гура. – Запоріжжя : ЗДМУ, 2018. – 91с.
7. Santos C.N.S., Xiao W., Stephanopoulos G. Rational, combinatorial, and genomic approaches for engineering L-tyrosine production in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2012; 109 (34): 13538-13543. doi:10.1073/pnas.1206346109
8. Kumari V. Biotransformation of phenol to L-tyrosine with resting cells of *Citrobacter freundii* MTCC 2424. *Int. J. Life. Sci. Scienti. Res.* 2017; 3(5): 1339-1344. doi: 10.21276/ijlssr.2017.3.5.12
9. Нетюхайло Л.Г. Метаболізм амінокислот, специфічні шляхи перетворень амінокислот, спадкові ензимопатії. *Вісник проблем біології і медицини.* 2012; 2 (1): 11-13.

-
- 10 Slominski A., Zmijewski M.A., Pawelek J. L-tyrosine and L-dihydroxyphenylalanine as hormone-like regulators of melanocyte functions. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2011; 25(1): 14–27. doi:10.1111/j.1755-148x.2011.00898.x
- 11 Hung C.H., Chiu C.C., Liu K.S., Chen Y.W., Wang J.J. Subcutaneous l-tyrosine elicits cutaneous analgesia in response to local skin pinprick in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 2015; 765: 457–462. doi:10.1016/j.ejphar.2015.09.010
- 12 Watson P., Enever S., Page A., Stockwell J., Maughan R.J. Tyrosine supplementation does not influence the capacity to perform prolonged exercise in a warm environment. *Int. J. Sport. Nutr. Exerc. Metab.* 2012; 22(5): 363–373. doi:10.1123/ijsnem.22.5.363
- 13 Tumilty L., Davison G., Beckmann M., Thatcher R. Failure of oral tyrosine supplementation to improve exercise performance in the heat. *Med. Sci. Sports Exerc.* 2014; 46(7): 1417–1425. doi:10.1249/mss.0000000000000243
- 14 Lang J.A., Smaller K.A. Oral l-tyrosine supplementation augments the vasoconstriction response to whole-body cooling in older adults. *Exp. Physiol.* 2017; 102(7): 835–844. doi:10.1113/ep086329
- 15 Lang J.A., Krajek A.C., Schwartz K.S., Rand J.E. Oral L-Tyrosine supplementation improves core temperature maintenance in older adults. *Med. Sci. Sports Exerc.* 2019.
- 16 Van de Rest O., Bloemendaal M., de Heus R., Aarts E. Dose-Dependent Effects of Oral Tyrosine Administration on Plasma Tyrosine Levels and Cognition in Aging. *Nutrients.* 2017; 9(12): 1279. doi:10.3390/nu9121279
- 17 Colzato L.S., Steenbergen L., Sellaro R., Stock A.K., et al. Effects of l-Tyrosine on working memory and inhibitory control are determined by DRD2 genotypes: A randomized controlled trial. *Cortex.* 2016; 82: 217–224. doi:10.1016/j.cortex.2016.06.010
- 18 Colzato L.S., de Haan A.M., Hommel B. Food for creativity: tyrosine promotes deep thinking. *Psychol. Res.* 2014; 79(5): 709–714. doi:10.1007/s00426-014-0610-4
- 19 Steenbergen L., Sellaro R., Hommel B., Colzato L.S. Tyrosine promotes cognitive flexibility: Evidence from proactive vs. reactive control during task switching

performance. *Neuropsychologia*. 2015; 69: 50–55. doi:10.1016/j.neuropsychologia.2015.01.022

20 Jongkees B.J., Hommel B., Kühn S., Colzato L.S. Effect of tyrosine supplementation on clinical and healthy populations under stress or cognitive demands—A review. *J. Psychiatr. Res.* 2015; 70: 50–57. doi:10.1016/j.jpsychires.2015.08.014

21 Messineo A.M., Gineste C., Sztal T.E., McNamara E.L., et al. L-tyrosine supplementation does not ameliorate skeletal muscle dysfunction in zebrafish and mouse models of dominant skeletal muscle α -actin nemaline myopathy. *Sci. Rep.* 2018; 8(1). doi:10.1038/s41598-018-29437-z

22 Sahin S., Oncel M.Y., Bidev D., Okur N., et al. Nemaline rod myopathy treated with L-tyrosine to relieve symptoms in a neonate. *Arch. Argent. Pediatr.* 2019; 117(4): 382–386. doi: 10.5546/aap.2019.e382.

23 Webster D., Wildgoose J. Tyrosine supplementation for phenylketonuria. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2013; 6. doi:10.1002/14651858.cd001507.pub3

24 Israely M., Ram A., Brandeis R., Alter Z., et al. A double blind, randomized cross-over trial of tyrosine treatment on cognitive function and psychological parameters in severe hospitalized anorexia nervosa patients. *Isr. J. Psychiatry Relat. Sci.* 2017; 54(3): 52–58. pmid: 29735813.

25 Wang Z., Li J., Wang Z., Xue L., et al. L-tyrosine improves neuroendocrine function in a mouse model of chronic stress. *Neural Regen. Res.* 2012; 7(18): 1413–1419. doi: 10.3969/j.issn.1673-5374.2012.18.008.

26 Alabsi A., Khoudary A.C., Abdelwahed W. The Antidepressant Effect of L-Tyrosine-Loaded Nanoparticles: Behavioral Aspects. *Annals of Neurosciences*. 2016; 23(2): 89–99. doi:10.1159/000443575

27 Dowlati Y., Ravindran A.V., Maheux M., Steiner M., et al. No effect of oral tyrosine on total tyrosine levels in breast milk: implications for dietary supplementation in early postpartum. *Arch. Womens Ment. Health*. 2014; 17(6): 541–548. doi:10.1007/s00737-014-0441-8

28DiFrancisco-Donoghue J., Rabin E., Lamberg E.M., Werner W.G. Effects of Tyrosine on Parkinson's Disease: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Movement Disorders Clinical Practice*. 2014; 1(4): 348–353. doi:10.1002/mdc3.12082

29Зуєв К.О. Особливості баріатричного впливу стифімоу в пацієнтів із цукровим діабетом 2-го типу з ожирінням та артеріальною гіпертензією. *Міжнародний ендокринологічний журнал*. 2017; 13(8): 596-603. doi:10.22141/2224-0721.13.8.2017.119277.

30Гетало О.В. Аналіз сучасного вітчизняного ринку засобів для перитонеального діалізу. *PHARMA Tech Expo: обладнання, сировина та технології для фармацевтичної промисловості*. 2015; 1: 91-94.

31Владимирова І.М. Стандартизація підходів до цілеспрямованого пошуку лікарських засобів рослинного походження для лікування захворювань щитоподібної залози. 2014.

32Mahmoud S., Saad M., Omara M. Improvement of New Zealand rabbit bucks performance by l. Tyrosine supplement. *Lucrări Științifice*. 2014; 57(3-4): 29-38.

33El-Ella A.A.A.B.U., El-Gohary E.S., Abdel-Samee A.M. Productive and reproductive performance of goats as affected by L-tyrosine supplement. 1-Sexual activity and reproductive performance. *Egyptian Journal of Sheep & Goat Sciences*. 2011; 6(2): 37-46.

34Gabr S.A. Reproductive performance and milk yield of Friesian dairy cows affected by L-tyrosine treatment during early postpartum period. *Life Sci J*. 2012; 9(4): 4486-89.

35El-Hamd M.A., Sayah M.S., Shamiah S.M., Gabr S.A. effect of l-tyrosine on growth performance and some blood constituents of suckling friesian calves during winter and summer seasons. *Egyptian J. Anim. Prod*. 2012; 49:57-63.

36Watson A., Servet E., Hervera M., Biourge V.C. Tyrosine supplementation and hair coat pigmentation in puppies with black coats – A pilot study. *Journal of Applied Animal Nutrition*. 2015; 3. doi:10.1017/jan.2015.8

-
- 37Fadzliana N.A.F., Rogayah S., Shaharuddin N.A., Janna O.A. Addition of L-Tyrosine to Improve Betalain Production in Red Pitaya Callus. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*. 2017; 40(4): 521-532.
- 38Sato Y., Tajima K., Munekata M., Keasling J.D., Lee T.S. Engineering of L-tyrosine oxidation in *Escherichia coli* and microbial production of hydroxytyrosol. *Metab. Eng.* 2012; 14(6): 603-610.doi:10.1016/j.ymben.2012.08.002
- 39Raval K.M., Vaswani P.S., Majumder D.R. Biotransformation of a single amino-acid L-tyrosine into a bioactive molecule L-DOPA. *Int. J. Sci. Res.* 2012; 2: 2250-3153.
- 40Surwase S.N., Jadhav J.P. Bioconversion of L-tyrosine to L-DOPA by a novel bacterium *Bacillus* sp. *JPJ. Amino acids*. 2011; 41(2): 495-506.doi: 10.1007/s00726-010-0768-z
- 41Surwase S.N., Patil S.A., Apine O.A., Jadhav J.P. Efficient microbial conversion of L-tyrosine to L-DOPA by *Brevundimonas* sp. *SGJ. Appl. Biochem. Biotechnol.* 2012; 167(5): 1015-1028.doi: 10.1007/s12010-012-9564-4
- 42Patil S., Rathod V., Ranganath E. Inducive effect of L-methionine in transformation of L-tyrosine to L-Dopa and tyrosinase production by *Streptomyces* sp. VRS9. *Ind. J. Biotechnol.* 2012;11: 320-325.
- 43Ali S., Rizvi N. Microbiological Transformation of L-Tyrosine to L-Dopa from Methanol Pretreated Biomass of a Novel *Coriolus versicolor* under Submerged Culture. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2014; 172(4): 2041-2054.doi: 10.1007/s12010-013-0658-4
- 44Gurme S.T., Surwase S.N., Patil S.A., Jadhav J.P. Evaluation of various factors affecting bioconversion of L-tyrosine to L-DOPA by yeast *Yarrowia lipolytica*-NCIM 3450 using response surface methodology. *Natural products and bioprospecting, Nat. Prod. Bioprospect.* 2014; 4(3): 141-147.doi: 10.1007/s13659-014-0017-3
- 45Agarwal P., Pareek N., Dubey S., Singh J., Singh R.P. *Aspergillus niger* PA2: a novel strain for extracellular biotransformation of l-tyrosine into l-DOPA. *Amino acids*. 2016; 48(5): 1253-1262.doi: 10.1007/s00726-016-2174-7

46LyuX., NgK.R., Lee J.L., Mark R., Chen W.N. Enhancement of naringenin biosynthesis from tyrosine by metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Agric. Food Chem.* 2017; 65(31): 6638-6646.doi: 10.1021/acs.jafc.7b02507

47Wu J., YuO., DuG., Zhou J., ChenJ. Fine-tuning of the fatty acid pathway by synthetic antisense RNA for enhanced (2S)-naringenin production from L-tyrosine in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2014; 80(23): 7283-7292. doi:10.1128/AEM.02411-14

48ZhuS., Wu J., Du G., Zhou J., Chen J. Efficient synthesis of eriodictyol from L-tyrosine in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2014; 80(10): 3072-3080.doi:10.1128/AEM.03986-13

49Wu J., LiuP., FanY., Bao H., Du G., Zhou J., ChenJ. Multivariate modular metabolic engineering of *Escherichia coli* to produce resveratrol from L-tyrosine. *J. Biotechnol.* 2016; 167(4): 404-411.doi: 10.1016/j.jbiotec.2013.07.030

50JangS., Gang H., Kim B.G., Choi K.Y. FCS and ECH dependent production of phenolic aldehyde and melanin pigment from l-tyrosine in *Escherichia coli*. *Enzyme Microb. Technol.* 2018; 112: 59-64.doi: 10.1016/j.enzmictec.2017.10.011

51Vasanthakumar A., DeAraujo A., Mazurek J., Schilling M., Mitchell R. Pyomelanin production in *Penicillium chrysogenum* is stimulated by L-tyrosine. *Microbiology.* 2015; 161(6): 1211-1218. doi:10.1099/mic.0.000030

52Almeida-Paes R., Frases S., de Sousa Araújo G., de Oliveira M.M.E., Gerfen G.J., Nosanchuk J. D., Zancopé-Oliveira R.M. Biosynthesis and functions of a melanoid pigment produced by species of the *Sporothrix* complex in the presence of L-tyrosine. *Appl. Environ. Microbiol.* 2012; 78(24): 8623-8630. doi:10.1128/AEM.02414-12

53 Xu S., Wang Q., Zeng W., Li Y., Shi G., Zhou J. Construction of a heat-inducible *Escherichia coli* strain for efficient de novo biosynthesis of L-tyrosine. *Process Biochemistry.* 2020. doi:10.1016/j.procbio.2020.02.023

54MaoJ., Liu Q., LiY., YangJ., Song X., Liu X., QiaoM. A high-throughput method for screening of L-tyrosine high-yield strains by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 2018. doi:10.2323/jgam.2017.12.001

55 Пат. US9267118B2 Stephanopoulos G., Santos C.N.S. Methods for identifying bacterial strains that produce L-tyrosine. 2016-02-23 <https://patents.google.com/patent/US9267118B2/en>

56 Juminaga D., Baidoo E.E., Redding-Johanson A.M., Batt T.S., et al. Modular engineering of L-tyrosine production in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2012; 78(1): 89-98. doi:10.1128/AEM.06017-11

57 Kim B., Binkley R., Kim H.U., Lee S.Y. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the enhanced production of l-tyrosine. *Biotechnol. Bioeng.* 2018; 115(10): 2554-2564. doi: 10.1002/bit.26797

58 Jo M., Noh M.H., Lim H.G., Kang C.W., et al. Precise tuning of the glyoxylate cycle in *Escherichia coli* for efficient tyrosine production from acetate. *Microb. Cell Fact.* 2019; 18(1): 57. doi: 10.1186/s12934-019-1106-0.

59 Kang S.Y., Choi O., Lee J.K., Ahn J.O., et al. Artificial de novo biosynthesis of hydroxystyrene derivatives in a tyrosine overproducing *Escherichia coli* strain. *Microb. Cell Fact.* 2015; 14(1). doi:10.1186/s12934-015-0268-7

60 Noda S., Shirai T., Oyama S., Kondo A. Metabolic design of a platform *Escherichia coli* strain producing various chorismate derivatives. *Metab. Eng.* 2016; 33: 119–129. doi:10.1016/j.ymben.2015.11.007

61 Li S., Jendresen C.B., Nielsen A.T. Increasing production yield of tyrosine and mevalonate through inhibition of biomass formation. *Process Biochem.* 2016; 51(12): 1992–2000. doi:10.1016/j.procbio.2016.09.007

62 Rahman M.M., Lopa N.S., Kim K., Lee J.-J. Selective detection of l-tyrosine in the presence of ascorbic acid, dopamine, and uric acid at poly(thionine)-modified glassy carbon electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry.* 2015; 754: 87–93. doi:10.1016/j.jelechem.2015.06.018

63 Deng K.-Q., Zhou J., Li X.-F. Direct electrochemical reduction of graphene oxide and its application to determination of l-tryptophan and l-tyrosine. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 2013; 101: 183–188. doi:10.1016/j.colsurfb.2012.06.007

64 Kim D.Y., Rha E., Choi S.L., Song J.J., Hong S.P., Sung M.H., Lee S.G. Development of bioreactor system for L-tyrosine synthesis using thermostable tyrosine phenol-lyase. *J Microbiol Biotechnol.* 2007; 17(1): 116-122.

65 Patnaik R., Zolandz R.R., Green D.A., Kraynie D.F. L-Tyrosine production by recombinant *Escherichia coli*: Fermentation optimization and recovery. *Biotechnol Bioeng.* 2008; 99(4): 741–752. doi:10.1002/bit.21765

66 Gogoi, M., Goswami, R., Ingole, P. G., & Hazarika, S. (2019). *Selective Permeation of L-tyrosine through functionalized Single-walled Carbon Nanotube Thin Film Nanocomposite Membrane. Separation and Purification Technology, 116061.* doi:10.1016/j.seppur.2019.116061

67. L-Тирозин [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://compendium.com.ua/dec/319781/>

68. Заклади охорони здоров'я та захворюваність населення України [Електронний ресурс] – Режим доступу: http://www.ukrstat.gov.ua/druk/publicat/kat_u/2018/zb/06/zb_zoz_17.pdf

69. Котвіцька А.А., Прокопенко О.С. Дослідження економічної складової проблеми хвороби Паркінсона у різних країнах світу. *Актуальні проблеми розвитку галузевої економіки та логістики.* 2017. 400–403. <http://91.234.42.22/bitstream/123456789/12530/1/400-403.pdf>

70. Шафранський В.В., Дудник С.В. Психічне здоров'я населення України: стан, проблеми та шляхи вирішення. *Україна. Здоров'я нації.* 2016; 3: 12-18.

71. Пат. RU № 2639556. Тийстерман Я.А. Технологический способ получения биологического вещества, такого как белок, с периодической подпиткой с применением чередующихся биореакторов.

72. Свистунов А.И. Классификация способов ферментации и ферментеров. *Вестник НГИЭИ.* 2013; 10 (29): 109-114.

73. Стасевич М.В., Милян А.О., Гузьова І.О. Обладнання технологічних процесів фармацевтичних та біотехнологічних виробництв: навч. посібник для студ. вищ. навч. заклад. / за ред. В.П. Новікова – Вінниця: нова Книга, 2012. – 408 с. : іл.

74. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія // Підручник. – К.: НУХТ. – 2010. – 632 с.

75. Антибиотики (стоковые растворы). [Электронный ресурс] – Режим доступа: http://molbiol.edu.ru/solution/03_04.html

76. Пат. № 0002508400 Храмов М.В., Шепелин А.П., Мартовецкий М.Н., Полосенко О.В., Марчихина И.Н., Шолохова Л.П. Сухая хромогенная питательная среда для обнаружения колиформных бактерий и *E.coli* (варианты) 27.02.2014

77. Antifoam 204 [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a8311?lang=en®ion=UA>

78. Тирозин [Электронный ресурс] – Режим доступа: http://www.cniga.com.ua/index.files/tirozin_i_ego_svoistva.htm

79. Паспорт безопасности в соответствии с Постановлением (EU) No.1907/2006 108371 L-Тирозин [Электронный ресурс] – Режим доступа: https://www.google.com.ua/url?Sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahukewiz5qdbr_fqahxxmiskhhuoцпуqfjagegqibbab&url=https%3A%2F%2Fwww.merckmillipore.com%2Fweb-AU-Site%2Fen_US%2F-%2FUSD%2Fshowdocument-File%3Fproductsku%3DMDA_CHEM-108371%26documenttype%3DMSD%26documentid%3D108371_SDS_RU_RU.PDF%26documentuid%3D385291%26Language%3DRU%26Country%3DRU%26Origin%3Dnull&usg=aovvaw2vd6gp4big_fvrf1ujl6l_

80. Новиков Д.А. Выделение и очистка продуктов биотехнологии. Методическое пособие – Минск.: БГУ, 2014. – 256 с.

81. Д.А. Васильев, С.Н.Золотухин, А.А.Щербаков, Н.И. Молофеева Учебно – методические материалы по подготовке к лабораторным и семинарским занятиям по курсу биотехнологии – Режим доступа: <https://studfile.net/preview/1150612/page:12/>

82. Методы отделения биомассы от культуральной жидкости [Электронный ресурс] – Режим доступа: https://studbooks.net/964217/ekologiya/metody_otdeleniya_biomassy_ot_kulturalnoy_zhidkosti

83 Д.А.Васильев,С.Н.Золотухин, Н.И.Молофеева, Е.А. Корнеев, В.В. Батраков
Учебно - Методические материалы по подготовке к лабораторным и семинарским
занятиям по курсу биотехнологии – Режим доступа:
<https://studfile.net/preview/1150610/page:2/>

84 Т.А. Ковалева, А.И. Сливкин, А.С. Беленова С.Н. Суслина
БИОТЕХНОЛОГИЯ (Часть 1) Микробная биотехнология Химическая энзимология /
m

Учебное пособие. - 2011. – Режим доступа:
<Http://www.pharm.vsu.ru/sources/biotech.pdf>

85 Калишук Д. Г.Лекции Ч. 1 [Электронный ресурс] – Режим доступа:
<https://www.belstu.by/Portals/0/userfiles/72/LK/LK-1-14-2.pdf>

86 Центрифуги фильтрующие[Электронный ресурс] – Режим доступа:
<https://tirit.org/catalogs/pdf/rousselet.pdf>

87 Плюсы и минусы обратного осмоса[Электронный ресурс] – Режим доступа:
<Https://diasel.ru/article/plyusy-i-minusy-obratnogo-osmosa/>

88Роторно-плёночный испаритель (РПИ)[Электронный ресурс] – Режим
доступа: <https://agroservers.ru/b/rotorno-plenochnyy-ispavitel-rpi-reaktory-emkosti-do-100-m3-875652.htm>

89Роторно-пленочный испаритель [Электронный ресурс] – Режим доступа:
<https://www.imixing.ru/pischevoe-i-pr-oborudovanie/rotorno-plenochnyj-ispavitel/>

90Гель-фильтрация[Электронный ресурс] – Режим доступа:
http://www.ibmс.msk.ru/content/Education/w-o_pass/ММoB/3.pdf

91Аффинная хроматография[Электронный ресурс] – Режим доступа:
<http://www.bialexa.ru/technical-support/methods/affinity-chromatography/>

92 Хроматометрические методы анализа [Электронный ресурс] – Режим доступа: https://studbooks.net/503146/tovarovedenie/hromatometricheskie_metody_analiza

93 Ионообменная хроматография: описание метода [Электронный ресурс] – Режим доступа: <http://www.alto-lab.ru/zanimatelnya-himia/ionoobmennaya-hromatografiya/>

94 Ибрагимов А.Н., Бикмуллин А.Г., Сатаева Д.А., Лопухов Л.В., Зайнуллин Л.И., Алимова Ф.К. Хроматографические методы очистки белков. Учебно-методическое пособие. – Казань: ФГАОУ ВПО КФУ, 2013. – 48 с.

95 Сова В.В., Кусайкин М.И. Методическое пособие к практическим занятиям по очистке белков - Владивосток: Изд-во Дальневост. ун-та, 2006. - 42 с.

96 Промышленные хроматограф Biotage™ Flash 400 [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://www.bcmst.ru/catalog/chromatography/flash400/>

97 Hund H.K., Keller B., Lingens F. Phenylalanine and tyrosine biosynthesis in sporeforming members of the order Actinomycetales. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 1987; 42(4): 387-393.

98 Выделение (очистка) полученных соединений. [Электронный ресурс] – Режим доступа: <http://www.chem.msu.su/rus/teaching/ponomar/glava3.html>

99 С. К. Мясников Кристаллизационные методы разделения . [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://bigenc.ru/chemistry/text/2112791>

100 Patnaik R., Zolandz R.R., Green D.A., Kraynie D.F. L-Tyrosine production by recombinant *Escherichia coli*: Fermentation optimization and recovery. *Biotechnol Bioeng*. 2008; 99(4): 741–752. doi:10.1002/bit.21765

101 Обзор достоинств и недостатков оборудования для фильтрации -из различных материалов [Электронный ресурс] – 2018. - Режим доступа: <https://gmpnews.ru/2018/02/obzor-dostoinstv-i-nedostatkov-oborudovaniya-dlya-filtracii-iz-razlichnykh-materialov>

102 Ключевые преимущества нутч-фильтров [Электронный ресурс] –Режим доступа: <https://plast-product.ru/dlya-chego-ispolzuyut-nutch-filtryi/>

103 Нутч-фільтр [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://dlu.com.ua/Нутч-фільтр-3>

104 Барабанная сушилка – преимущества и недостатки [Электронный ресурс] – 2016. - Режим доступа: <http://agroproplus.ru/sushilnyj-baraban-preimushhestva-i-nedostatki/>

105 Преимущества и недостатки сушилки с кипящим слоем в фармацевтической промышленности [Электронный ресурс] – 2019. - Режим доступа: <http://m.ru.trustarpack.com/info/advantages-disadvantages-of-fluid-bed-dryer-36651230.html>

106 Методы сушки продуктов фармацевтической промышленности. [Электронный ресурс] – 2013. - Режим доступа: https://life-prog.ru/1_22779_metodi-sushki-produktov-farmatsevticheskoj-promishlennosti.html

107 Лиофильная сушка (сублимационная сушилка) [Электронный ресурс] – Режим доступа: <http://snauka.ru/wtechnology/liofilnaya-sushka>

108 Сублимационная сушка [Электронный ресурс] –Режим доступа: <http://www.lisyz.ru/tehnologii-proizvodstva/sublimatsionnaya-sushka.html>

109 Вакуумный сушильный шкаф СВ-300 [Электронный ресурс] –Режим доступа: <https://spectrolab.com.ua/p27584540-vakuumnyj-sushilnyj-shkaf.html>

110 Виды дробилок (классификация дробильного оборудования) [Электронный ресурс] –Режим доступа: <https://www.tnzdo.ru/articles/vidy-drobilok-klassifikatsiya-drobilnogo-oborudovaniya.html>

111 Дробилки валкове [Электронный ресурс] – Режим доступа: <http://drobix.ru/drobilki-valkovye/>

112 Виды дробильного оборудования, различия и области применения – [Электронный ресурс] – 2016. - Режим доступа: <https://proteh.org/articles/19092016-vidy-drobilnogo-oborudovaniya-razli/>

113 Дробилки молотковые [Электронный ресурс] – Режим доступа: <http://drobix.ru/drobilki-molotkovye/>

114 Измельчитель YF8-1 Мельница Молотковая Дробилка [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://prom.ua/p606012619-izmelchitel-yf8-melnitsa.html>

115 L-тирозин, 50 капсул, Элит-фарм [Электронный ресурс] – Режим доступа: https://www.medtechnika.com.ua/l-tirozin-50-kapsul.html?gclid=EAIaIQobChMIwMWxhuWW7QIVyOeyCh21pA1dEAYYASABEgI7c_D_BwE

116 L-Тирозин, L-Tyrosine, Now Foods, 500 Мг, 60 Капсул [Электронный ресурс] – Режим доступа: https://vitaworld.com.ua/uk/l-tirozin-l-tyrosine-now-foods-500-mg-60-kapsul?target=google&gclid=EAIaIQobChMIwMWxhuWW7QIVyOeyCh21pA1dEAYYAiABEgLli_D_BwE

117 Л-Тирозин (L-tyrosine) 500 мг 50 капсул [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://biovit.ua/l-tirozin/l-tirozin-500-mg-50-kapsul>

118 Лич І.В. Промислова технологія лікарських засобів [Электронный ресурс]: конспект лекцій для студ. освітнього ступеня бакалавр спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» ден. та заоч. форм навч. / І.В. Лич. – К.: НУХТ, 2017. – 323 с.

119 Фасовка таблеток и порошков [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://biolight.com.ua/fasovka-gotovoj-produktsii/>

120 Слуцкая Р.Я. Фасовка и упаковка в фармацевтической промышленности Медицинский бизнес. 2000; 11(77):26-30.

121 АТС-классификация [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://compendium.com.ua/atc/L03A/>

122 Тирозин [Электронный ресурс] – Режим доступа: http://www.cniga.com.ua/index.files/tirozin_i_ego_svoistva.htm

123 L-ТИРОЗИН (L-tirozin) [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://compendium.com.ua/dec/319781/>

124L-Tyrosine [Електронний ресурс] – Режим доступу:
<http://fitnessbrain.ru/files/l-tirosine.pdf>

125 Смирнов В.А. Аминокислоты и полипептиды: учеб. пособ. Ч. I/ В.А. Смирнов, Ю.Н. Климочкин. – Самара. Самар. гос. техн. ун-т., 2007. – 110 с.: ил.

126 Биохимия. Практикум: Учебное пособие по курсу «Медицинская биохимия» /Л. А. Ганеева, Л. И. Зайнуллин, З.И. Абрамова, Н. Х. Тенишева. — Казань : ИСБ, 2015. — 176 с.

127 Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». — 1-е вид. —Доповнення 2. — Харків: Державне підприємство «Науковоекспертний фармакопейний центр», 2008. — 620 с

128Правила организации производства и контроля качества лекарственных средств (GMP) [Електронний ресурс] – Режим доступу:
<https://gmpua.com/World/Ru/OCT4251098/GMP.htm>

129Дезінфекція поверхонь [Електронний ресурс] – Режим доступу:
http://www.lysoform.net/ua/products/2-dezinfekcija_poverkhon

130 Поводзинський В.М. Основи проектування: Конспект лекцій для студ. спец. 6.092900 “Промислова біотехнологія” та 6.092902 “Біотехнологія біологічно активних речовин”, напряму 0929 “Біотехнологія” ден. форми навч. – К.: НУХТ, 2005.

131Мотина Г., Абрамов А. Система подготовки вентиляционного воздуха. *Ремедиум. Журнал о российском рынке лекарств и медицинской технике.* 2003; (3):72-74.

132 Очищення та підготовка води [Електронний ресурс] – Режим доступу:
<https://buklib.net/books/36176/>

133 А.Е.Приходько, А.А.Пантелеев Предварительная подготовка и получение воды очищенной – Режим доступу: <http://www.medbusiness.ru/248.php>

134 Технологія та обладнання одержання питної та технічної води. Практикум. Частина 1. [Електронний ресурс]: навчальний посібник для студ. спеціальності 161 «Хімічні технології та інженерія», спеціалізації «Хімічні технології неорганічних

речовин та водоочищення» / Н.М. Толстопалова, М.І. Літинська, Т.І. Обушенко; КПІ ім. Ігоря Сікорського – Електронні текстові дані (1 файл: 4,00 Мбайт). – Київ : КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2019. – 101 с

135 Машина для наполнения капсул низкой и средней производительности [Электронный ресурс] – Режим доступа: http://cphem.com/files/IMA/ACTIVE/Zanasi_RU.pdf

136 Линия фасовки капсул/таблеток в банку [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://kpht.ru/katalog-oborudovaniya/liniya-fasovki-kapsul-tabletok-v-banku>

137 Romaco Promatic ПАК [Электронный ресурс] – Режим доступа: http://cphem.com/files/Promatic/Romaco_DB_Promatic_PAK_320-RU.pdf

138. Пат. RU № 2140450С1. Гусятинер М.М., Лунц М.Г., Ивановская Л.В., Ростова Ю.Г., Бачина Т.А., Ахвердян В.З., Хургес Е.М., Лившиц В.А., Козлов Ю.И., Дебабов В.Г. Штамм бактерий *escherichia coli* продуцент l-лейцина 1999-10-27.

139. YSI 2700D Select Biochemistry Analyzer [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://www.marshallscientific.com/YSI-2700-Select-Biochemistry-Analyzer-p/ysi-2700.htm>

140. YSI 2700 Select Biochemistry Analyzer [Электронный ресурс] – Режим доступа: https://openwetware.org/wiki/YSI_2700_Select_Biochemistry_Analyzer

141. Определение аминного азота медным способом [Электронный ресурс] – Режим доступа: <http://helpiks.org/2-51110.html>

142. Пан Л.С., Бахирева О.И., Зелина М.А., Кочина Е.А. Микробиологический метод очистки сточных вод от аммонийного азота. *Вестник Пермского национального исследовательского политехнического университета. Химическая технология и биотехнология*. 2017; 4: 37-49. DOI: 10.15593/2224-9400/2017.4.03

143. Часть III. Определение биогенных веществ [Электронный ресурс] / Режим доступа: http://www.opengost.ru/iso/65_gosty_iso/65020_gost_iso/6502030_gost_iso/13263-chast-iii.-opredelenie-biogennyh-veschestv.-analiz-osadkov-i-ila.html

144Анализатор влажности порошков и гранул [Электронный ресурс] – Режим доступа: https://minipress.ru/katalog/eksperimentalnoe-oborudovanie/laboratornoe_oborudovanie/analizatory-vlazhnosti/analizator-vlazhnosti-poroshkov-i-granul-sf-01/