

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

«До захисту в ЕК»

Директор інституту(декан факультету)

Наталія ГРЕГІРЧАК

(підпис)

(прізвище та ініціали)

«___» _____ 202__ р.

«До захисту допущено»

Завідувач кафедри

Віктор СТАБНІКОВ

(підпис)

(прізвище та ініціали)

«___» _____ 202__ р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ МАГІСТРА

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код та назва спеціальності)

освітньо-професійної програми «Фармацевтична біотехнологія»

на тему: «Мікробні підсолоджувачі як компоненти лікарських засобів»

Виконав: здобувач 2 курсу, групи 2М

ЧУМАК Сергій Юрійович

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Керівник СТАРОВОЙТОВА Світлана Олександрівна

(прізвище, ім'я та по батькові повністю)

(підпис)

Консультанти

Рецензент Олександр ДОНЕЦЬ

(прізвище та ініціали)

(підпис)

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

Здобувач _____

(підпис)

Київ – 2023 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь магістр

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

Освітньо-професійна програма «Фармацевтична біотехнологія»
(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і
мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ

“ 01 ” листопада 2022 року

З А В Д А Н Н Я НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

Чумак Сергій Юрійович

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи «Мікробні підсолоджувачі як компоненти лікарських засобів»

керівник роботи доцент, кандидат біологічних наук Старовойтова С.О.
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від 31 жовтня 2022 року № 782-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 03.02.2023

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент *Lactobacillus intermed.*

Цільовий продукт - манітол

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

Розділ 1. Біотехнологічне одержання підсолоджувачів, що використовуються у фармацевтичному виробництві; Розділ 2. Останні досягнення в мікробному біосинтезі маніту; Розділ 3. Техніко-економічне обґрунтування виробництва лікарського засобу (ЛЗ); Розділ 4. Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях отримання субстанції; Розділ 5. Специфікація обладнання (етапи виділення та очистки субстанції); Розділ 6. Опис технологічної схеми післяферментаційного виділення і очищення субстанції для одержання; Розділ 7. Контроль виробництва субстанції для ЛЗ; РОЗДІЛ 8. Обґрунтування вибору технологічної схеми одержання ЛЗ; Розділ 9. Специфікація обладнання (етапи отримання ЛЗ); Розділ 10. Опис технологічної схеми (отримання ЛЗ); Розділ 11. Опис лікарського засобу згідно АНД (проект АНД)

5. Перелік графічного матеріалу

технологічна схема післяферментаційного виділення і очищення субстанції, апаратурна схема післяферментаційного виділення і очищення субстанції, технологічна схема отримання ЛЗ, апаратурна схема отримання ЛЗ

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 01 листопада 2022 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1.	Біотехнологічне одержання підсолоджувачів	02.11.2022-07.11.2022	
2.	Останні досягнення в мікробному біосинтезі манігу	08.11.2022-11.11.2022	
3.	Техніко-економічне обґрунтування виробництва лікарського засобу	12.11.2022-17.11.2022	
4.	Підбір технологічного обладнання	18.11.2022-25.11.2022	
5.	Специфікація обладнання (етапи виділення та очистки субстанції)	26.11.2022-01.12.2022	
6.	Опис технологічної схеми (одержання субстанції)	02.12.2022-07.12.2022	
7.	Контроль виробництва субстанції для ЛЗ	08.12.2022-15.12.2022	
8.	Обґрунтування вибору технологічної схеми одержання ЛЗ	16.12.2022-24.12.2022	
9.	Специфікація обладнання (етапи отримання ЛЗ)	25.12.2022-02.01.2023	
10.	Опис технологічної схеми (отримання ЛЗ)	03.01.2023-13.01.2023	
11.	Опис лікарського засобу згідно АНД (проект АНД)	14.01.2023-20.01.2023	
12.	Виконання графічної частини	21.01.2023-26.01.2023	

Здобувач _____
(підпис)

Сергій ЧУМАК _____
(ім'я та прізвище)

Керівник роботи _____
(підпис)

Світлана СТАРОВОЙТОВА _____
(ім'я та прізвище)

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ.....	5
ВСТУП.....	6

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

РОЗДІЛ 1. Біотехнологічне одержання підсолоджувачів, що використовуються у фармацевтичному виробництві.....	8
РОЗДІЛ 2. Останні досягнення в мікробному біосинтезі маніту.....	21

ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування виробництва лікарського засобу (ЛЗ).....	33
3.1. Аналіз фармакологічних властивостей маніту та галузей використання.....	33
3.2. Обґрунтування вибору форми випуску лікарського засобу (ЛЗ)...	38
3.2.1. Обґрунтування форми випуску ЛЗ.....	38
3.2.2. Обґрунтування вибору первинної і вторинної упаковки ЛЗ...	41
3.3. Обґрунтування вибору біологічного агенту для отримання субстанції для інженерної частини роботи.....	42
3.4. Розрахунок потреби у субстанції для випуску ЛЗ та розрахунок річної потреби у культуральній рідині для одержання розрахованої кількості субстанції.....	49
РОЗДІЛ 4. Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях отримання субстанції.....	53
РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання(етапи виділення та очистки субстанції).....	71
РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми післяферментаційного виділення і очищення субстанції для одержання ЛЗ.....	74
РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва субстанції для ЛЗ.....	78
РОЗДІЛ 8. Обґрунтування вибору технологічної схеми одержання ЛЗ...	84

8.1. Розрахунок річної потужності виробництва ЛЗ та кількості серій на рік.....	84
8.2. Обґрунтування вибору класів чистоти виробничих приміщень...	84
8.3. Обґрунтування вибору підготовки первинної упаковки.....	86
8.4. Обґрунтування вибору підготовки води.....	88
8.5. Вибір технологічних стадій та операцій, обладнання.....	89
РОЗДІЛ 9. Специфікація обладнання(етапи отримання ЛЗ).....	97
РОЗДІЛ 10.Опис технологічної схеми (отримання ЛЗ).....	101
РОЗДІЛ 11. Опис лікарського засобу згідно АНД (проект АНД).....	107
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	116

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена проектуванню виробництва з одержання манітолу використовуючи *Lactobacillusintermedius* NRRL B-3693 з субстратом фруктоза 67 г/л та глюкоза 33,5г/л.

У кваліфікаційній роботі дано обґрунтування та викладено технологічний процес ділянки синтезу підсоложувача манітолу, який включає блок допоміжних робіт, стадії підготовки посівного матеріалу та вирощування культури у виробничому ферментері, розраховано річну потужність. Також дано обґрунтування та викладено технологічний процес ділянки виділення та очищення синтезованого манітолу, який включає відокремлення біомаси, концентрування супернатанту, кристалізації манітолу, стадія відокремлення кристалів манітолу від маткового розчину, сушіння кристалів манітолу, а також фасування, пакування та маркування субстанції манітолу. Описана технологічна схема виготовлення розчину для інфузій, що містить манітол, яка включає допоміжні роботи (підготовка вентиляційного повітря, підготовка води для ін'єкцій та підготовка первинного пакування) та технологічний процес (приготування розчину для інфузій, фільтрація розчину та розлив у флакони, стерилізація розчину у первинному пакуванні, а також пакування та маркування у вторинну упаковку).

Кваліфікаційна робота складається зі вступу, одинадцяти розділів, графічної частини (технологічної та апаратурної схем) та списку використаної літератури з 141 найменування. Загальний обсяг проекту – 130 сторінок, 10 таблиць та 14 рисунків.

Ключові слова: манітол, мікробний синтез, *Lactobacillusintermedius* NRRL B-3693, підсолоджувач.

ВСТУП

Надмірне споживання цукру та жиру є однією з основних причин ожиріння, яке є основним фактором ризику серцево-судинних захворювань, діабету, захворювань опорно-рухового апарату та деяких видів раку.

В даний час на ринку є широкий асортимент замінників цукру, відомих як підсолоджувачі. Сполуки, які замінюють цукор, але забезпечують дуже мало калорій або не містять їх, називаються низько енергетичними або неживими підсолоджувачами. Вони в разі солодше сахарози, тому їх можна застосовувати в дуже малих кількостях. Прикладами таких сполук є стевія, аспартам, сахарин, сукралоза, неотам, ацесульфам калію та адвантам.

Іншою великою групою замінників цукру є поліюли, наприклад, ксиліт, сорбіт, еритритол, мальтит і лактит. Їх харчова енергія приблизно вдвічі нижча за сахарози, і вони також менш солодкі.

Дослідники пропонують одержувати підсолоджувачі саме мікробіологічним синтезом. Спочатку застосовували хімічний спосіб одержання підсолоджувачів, який має ряд недоліків (утворення хімічних відходів і високі енерговитрати). В останні роки дослідження вчених були спрямовані на розвиток біотехнологічних процесів виробництва підсолоджувачів. Ця альтернатива пояснюється економічністю, автоматизацією процесів, зниженням споживання енергії і простотою у виділенні через оптимізацію процесів. Науковці активно займаються знаходженням та забезпеченням більш екологічно безпечного процесу. На сьогодні перспективним є одержання нешкідливих натуральних цукрозамінників з пребіотичними властивостями з метою маскування неприємних смакових властивостей таблеток та інших фармацевтичних продуктів, а також створення функціональних продуктів харчування. Останні

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.08 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дат</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Чумак С.Ю.</i>			ВСТУП	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Активов</i>
<i>Перевіп.</i>		<i>Старовойтов</i>					6	2
<i>Консультан</i>						8		
<i>Н. Контр.</i>						Кафедра БТМ		
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков</i>						

роки призвели до швидкого розвитку методів біосинтезу підсолоджувачів з недорогих субстратів. Прикладом є біосинтез такого підсолоджувача, як манітол.

Застосування різних молочнокислих бактерій у виробництві манітолу було в центрі уваги деяких досліджень в останні роки [1]. Виробництво манітолу молочнокислими бактеріями та іншими мікроорганізмами має кілька важливих переваг. По-перше, мікроорганізми, які застосовуються в харчових продуктах, не безпосередньо використовуються без будь-яких обмежень. По-друге, немає необхідності в ретельному розділенні продуктів. По-третє, деякі молочнокислі бактерії вважаються корисними для шлунково-кишкового тракту. Вироблення манітолу цими бактеріями може посилити їх здатність сприяти здоров'ю.

Деякі гомоферментативні молочнокислі бактерії виробляють невелику кількість манітолу. Найкращі молочнокислі бактерії, що продукують манітол, демонструють гетероферментативний метаболізм. Вже зазначалося, що ферментація фруктози гетероферментативною молочнокислою бактерією *Lactobacillus pentoceticus* призвела до утворення манітолу. У присутності фруктози або сахарози *Leuconostoc pseudomesenteroides* виробляє високі рівні манітолу. Дві інші гетероферментативні молочнокислі бактерії, *Lactobacillus sp.* і *Leuconostoc sp.*, також виробляли маніт з фруктози та сахарози [2]. З огляду на наведені вище дискусії, для досягнення мети генної інженерії щодо створення пробіотичного штаму, що продукує маніт, деякі дослідники запропонували використовувати молочнокислі бактерії, такі як гомоферментативні та гетероферментативні молочнокислі бактерії [3, 4].

Отже виходячи з вищенаведених переваг манітолу отриманого мікробним шляхом, можна зробити висновок, що дана робота є актуальною.

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

РОЗДІЛ 1. БІОТЕХНОЛОГІЧНЕ ОДЕРЖАННЯ ПІДСОЛОДЖУВАЧІВ, ЩО ВИКОРИСТОВУЮТЬСЯ У ФАРМАЦЕВТИЧНОМУ ВИРОБНИЦТВІ

Незважаючи на те, що споживання цукру відіграє важливу роль у здоров'ї людини, останніми роками споживання цукру на душу населення було обмежено через підвищення обізнаності про здоров'я. За останні 10–15 років спостерігався сплеск використання безкалорійних підсолоджувачів. Протягом цього періоду велика кількість населення перейшла зі звичайного цукру на низькокалорійні або безкалорійні підсолоджувачі[1]. Однак ця зміна насамперед пов'язана зі зміною стилю життя, меншою фізичною активністю, культурою автоматичної роботи та підвищеною залежністю від машин, що призвело до меншого спалювання калорій, що зрештою спричинило діабет та інші проблеми зі здоров'ям[2]. Незважаючи на зростаючий попит на підсолоджувачі, існують деякі вражаючі обмежувальні фактори у зростанні підсолоджувачів, такі як характерні смакові якості, довгострокові проблеми зі здоров'ям, низькі врожаї, висока вартість і стійкі практики в сільському господарстві.

Загалом підсолоджувачі можна розділити на шість основних груп: штучні підсолоджувачі; модифіковані цукру; натуральні калорійні підсолоджувачі; натуральні підсолоджувачі з нульовою калорійністю; цукри; і цукрові спирти[3].

В даний час основні штучні підсолоджувачі та цукрові спирти комерційно виробляються хімічними методами [4, 5, 6, 7, 8]. Біотехнологічне виробництво підсолоджувачів є життєздатним і стійким рішенням для задоволення зростаючого попиту. Як природний екстракт рослин,

					НУХТ БТЕК 02.02.08 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ документа	Підпис	Дат				
Розроб.		Чумак С.Ю.			Розділ 1. Біотехнологічне одержання підсолоджувачів, що	Літ.	Арк.	Аквусів
Перевір.		Старовойтов					8	13
Консультант						10		
Н. Контр.						Кафедра БТМ		
Затверд.		Стабніков						

лігноцелюозна біомаса, так і мікробне виробництво на основі всіх підсолоджувачів можна виробляти за допомогою біотехнологічних шляхів виробництва. Однак у виробництві підсолоджувачів за допомогою біотехнологічних шляхів існують значні технологічні проблеми та проблеми з розширенням масштабів [9, 10]. Наприклад, відновлення геміцелюозних цукрів з біомаси з максимальним виходом і мінімальними інгібіторами є важливим параметром для комерційного виробництва ксиліту. Пізніше роль сучасних біотехнологічних шляхів, які використовують метаболічну інженерію для розробки мікробних штамів, може бути придатною для комерційного виробництва економічних підсолоджувачів. Майбутні зусилля щодо збільшення мікробного виробництва натуральних підсолоджувачів отримають прибуток від нових методів, таких як CRISPR/Cas9, а також від поєднання раціональної інженерії штамів, адаптивної лабораторної еволюції та підходів до високопродуктивного скринінгу [11].

1.1. Ксилітол.

Ксиліт має низький глікемічний індекс і низьку калорійність (3 ккал/г) порівняно з сахарозою, використовується в харчовій, фармацевтичній та стоматологічній промисловості. Це нетоксична сполука, сертифікована Управлінням з контролю за якістю харчових продуктів і медикаментів (FDA) як GRAS (загалом вважається безпечною), тому споживання не рекомендується перевищувати 60 г/день, щоб уникнути ризику проносного ефекту. Однією з переваг цієї суміші є її хімічна та мікробіологічна стабільність, що гарантує її ефективність навіть у низьких концентраціях. Має інсулінонезалежний метаболізм і не викликає великих коливань рівня глюкози в крові. Деякі сприятливі наслідки використання ксиліту для здоров'я включають протикаріозну дію, лікування та профілактику гострого отиту та легеневої інфекції, які пов'язані з тим, що ксиліт є токсичним для бактерій, які викликають ці інфекції; а також як профілактика остеопорозу, оскільки його споживання може стимулювати збільшення засвоєння кальцію, і терапевтичний засіб при лікуванні пацієнтів з гемолітичною анемією.

Сучасне комерційне виробництво ксиліту відбувається хімічним способом, заснованим на каталізованому гідруванні очищеної ксилози з використанням нікелю як каталізатора, високих температур і тиску. Хімічний процес дозволяє перетворити лише 50%-60% ксилану в субстанції в ксиліт, досягаючи ефективності до 98% від чистої ксилози [12]. Цей процес вважається дорогим, енерговитратним і неекологічним через складність етапу очищення ксилози, високу вартість каталізатора, необхідність високого тиску і температури. Як альтернатива цьому процесу, біотехнологічне виробництво має такі переваги, як вибірковий біологічний процес, який не потребує послідовних етапів очищення ксилози та помірних вимог до температури та тиску. Біотехнологічне виробництво ксиліту полягає в основному у використанні специфічних ферментів або мікроорганізмів, які здійснюють перетворення ксилози в ксиліт. Ксилоза є основним складовим мономером геміцелюлозної фракції кількох багатих ксиланом лігноцелюлозних біомас, включаючи біомасу листяної деревини та агропромислові побічні продукти.

Лігноцелюлозна біомаса піддається процесу попередньої обробки для вивільнення зброджуваних цукрів у формі мономерів. Враховуючи виробництво ксиліту, гідроліз розбавленої кислоти є одним із найбільш використовуваних попередніх обробок, оскільки він сприяє переважно гідролізу геміцелюлозної фракції [14]. Традиційно розбавлений кислотний гідроліз здійснюється з використанням сірчаної кислоти 0,5%-1,5% (мас./мас.) і температури вище 121-160°C, що дозволяє отримати цукор від 70% до >95%. Завдання етапу попередньої обробки полягає в тому, щоб максимізувати відновлення ксилози з мінімальним утворенням сполук, які можуть бути потенційно токсичними для мікроорганізмів, порушуючи їх метаболізм і структуру. Найбільш важливими інгібіторами є фенольні сполуки, що утворюються в результаті часткової деградації лігніну; фурфурол і 5-гідроксиметилфурфурол, що утворюються при дегідратації при високій температурі і тривалому часі пентоз і гексоз відповідно; оцтова

кислота, що утворюється в результаті деацетилювання геміцелюлози; а також сліди іонів металів (заліза, хрому, нікелю, цинку) з матеріалу гідролізного реактора та/або ґрунту [15].

Процедури детоксикації перед етапом ферментації необхідні для видалення токсичних сполук до мінімальних концентрацій, які не перешкоджають ферментації мікроорганізмів. Було досліджено кілька методів детоксикації, таких як зміна рН, поєднання зміни рН і адсорбції за допомогою активованого вугілля, адсорбції за допомогою активованого вугілля з наступним застосуванням іонообмінних смол і застосуванням лише іонообмінних смол, біополімерами, нанofільтраційними мембранами, зворотним осмосом і біодетоксикацією [16]. Серед них адсорбція активованим вугіллям є одним із найбільш використовуваних методів детоксикації через його ефективність, низьку вартість і властивості, такі як висока хімічна спорідненість до органічних сполук, особливо фенольних сполук, і велика площа поверхні на одиницю маси.

Після детоксикації геміцелюлозного гідролізату, багатого на ксилозу, він буде використовуватися як культуральне середовище для мікробної ферментації. Кращими виробниками ксиліту вважаються дріжджі, такі як *Candida guilliermondii*, *Candida tropicalis*, *Candida maltosa*, *Kluuyveromyces marxianus*, *Debaromyces hansenii* тощо. Утворення ксиліту є результатом неповного метаболізму ксилози в цих мікроорганізмах, чому сприяють умови бродіння, головним чином доступ кисню. У випадку ксиліту ксилозоредуктаза (XR), залежна від НАД(Ф)Н, відновлює цю пентозу до ксиліту, який може бути виділений або окислений до ксилулози ксилітдегідрогеназою (XDH), залежною від НАД⁺, а потім ксилулоза інтегрується в неокислювальну фазу пентозно-фосфатного шляху (PPP) і центральний вуглецевий метаболізм вуглецю для регенерації кофакторів, утворення проміжних продуктів, енергії та клітинної біомаси.

Синтез ксиліту залежить від високої активності XR і низької активності XDH, на які впливають різні умови бродіння. Основним фактором є

обмеження доступності кисню в мікроаеробній атмосфері, оскільки окисно-відновний дисбаланс НАДН/НАД⁺ знижує активність ХДН за цієї умови. Накопичення ксиліту зменшує потік вуглецю через центральні метаболічні шляхи, зокрема через РРР, який є основним шляхом синтезу НАД(Ф)Н. Отже, регенерація НАД(Ф)Н стає важливою проблемою у виробництві ксиліту. Іншим важливим вузьким місцем для ефективної біоконверсії геміцелюлозних гідролізатів у ксиліт є послідовне використання глюкози, а ксилоза є однією з основних, яку необхідно вирішити. Цей факт пояснюється конкуренцією за транспортні системи між цими цукрами та інгібуванням глюкозою ферментативного механізму засвоєння ксилози [17]. Окрім цих проблем, дослідження були зосереджені на складанні ферментаційного середовища щодо високої концентрації ксилози та харчових добавок; використання вільних або іммобілізованих клітин у різних типах реакторів і режимах роботи, таких як періодичний або безперервний; масштабування всього процесу; і метаболічна інженерія мікроорганізмів.

1.2. Еритрол.

Серед поліолів, які можна використовувати як підсолоджувачі, еритритол виділяється низькою калорійністю, майже нульовою (0-0,2 ккал/г); охолоджуючий ефект і класифікація FDA як GRAS. Як і всі поліоли, може забезпечувати захист зубів і суттєву підтримку при зменшенні зубного нальоту в порожнині рота. Еритритол має антиоксидантні властивості, оскільки він є поглиначем вільних радикалів і може діяти, циркулюючи по всьому тілу, перш ніж виводиться з сечею, оскільки він не метаболізується. Крім того, цей підсолоджувач не викликає змін рівня інсуліну в крові, що робить його доречним для хворих на діабет. З іншого боку, еритритол має приблизно 70% відносної солодкості сахарози, що нижче, ніж інші поліоли, такі як ксиліт або сорбіт, і він має відносно високу ціну.

Еритритол може бути отриманий хімічним шляхом з діальдегідного крохмалю з використанням високих температур і нікелю як каталізатора,

однак цей процес не використовується в промисловості через його низьку ефективність[18]. В даний час еритритол виробляється ферментативними процесами в промислових масштабах з використанням нитчастих грибів і дріжджів, таких як *Moniliella pollinis*, *Trichosporonoides megachiliensis* і *Yarrowia lipolytica*, і в основному з глюкози як субстрату, отриманого з гідролізованої кукурудзи або пшениці [19]. Після ферментації еритритол відновлюють шляхом мембранної фільтрації ферментованого бульйону, концентрування, іонообмінної хроматографії, обробки активованим вугіллям і кристалізації. Подібно до інших поліолів, вартість процедур очищення робить біопроцес дорогим.

Еритритол синтезується бактеріями, нитчастими грибами та дріжджами. Бактерії синтезують цей поліол під час альтернативної регенерації НАД(Ф)Н через фосфокетотазний шлях в анаеробних умовах, як у випадку гетероферментативного *Oenococcus oeni* (колишній *Leuconostoc oenos*) та інших молочнокислих бактерій [20]. Дріжджі та нитчасті гриби виробляють еритритол за допомогою PPP, використовуючи переважно глюкозу як субстрат, незважаючи на те, що можуть також використовуватися інші сполуки, такі як фруктоза, сахароза, ксилітоза або гліцерин. PPP складається з окисної фази, в якій утворюються НАД(Ф)Н і рибулозо-5-фосфат, і неокисної фази з еритрозо-4-фосфатом як кінцевим продуктом. Еритрозо-4-фосфат дефосфорилується, а потім відновлюється до еритриту еритрозоредуктазою (ER), залежною від НАД(Ф)Н. Під час цього процесу інші поліколи можуть вироблятися як побічні продукти, такі як маніт, арабіт, рибіт і гліцерин, які впливають на вихід еритриту та очищення[19].

Біосинтез еритриту дріжджами пов'язане в основному з гіперосмотичним стресом, особливо під час стаціонарної фази. Необхідно ретельно встановити умови бродіння, особливо щодо наявності кисню, щоб уникнути утворення гліцерину на шкоду виробленню еритриту, оскільки гліцерин є основним осмопротектором у дріжджах [21]. Високі концентрації цукру (від 200 до 400 г/л) та/або солі сприяють і, в деяких випадках,

посилюють виробництво цього поліолу та зменшують утворення побічних продуктів. Однак виявлено, що ці умови також можуть знизити продуктивність або процес через подовження лаг-фази.

Останні дослідження, спрямовані на зниження витрат виробництва, зосереджені на використанні дешевих субстратів, підвищенні продуктивності та зменшенні утворення побічних продуктів. Щодо використання недорогих субстратів, сирий гліцерин, який є побічним продуктом біодизельної промисловості, вже використовувався для виробництва еритритолу дріжджами *Y. lipolytica* та *Moniliella megachiliensis* [22]. Цікавою особливістю бродіння гліцерину є зменшення утворення побічних продуктів порівняно з біопроцесами, які використовують цукри як субстрати, факт, який, отже, сприяє очищенню еритриту. Крім того, відомо, що виробництво еритриту сприяла наявність NaCl та інших мінеральних солей у сирому гліцерині. Ксиліоза також може бути використана як джерело вуглецю для виробництва еритриту, що продемонстровано на дріжджах *Aureobasidium pullulans*.

Підходом до підвищення продуктивності біопроцесу є ретельний контроль осмотичного тиску під час бродіння, який пов'язаний не лише з концентрацією джерела вуглецю, а й із способом додавання субстрату або солей. У зв'язку з цим у дослідженні [22] групою вчених було використано безперервну систему з двох послідовних хемостатів з різною швидкістю розведення, в якій осмотичний тиск, отриманий у результаті використання високої концентрації сирого гліцерину на першій стадії, зменшувався на другій. Ця система ферментації призвела до кінцевого титру еритритолу 199,4 г/л, виходу 0,6 г/л і продуктивності 0,8 г/л/год. Tomaszewska та Rywinska [23] вивчали поступове додавання солі, досягаючи найвищої концентрації еритритолу з NaCl 75 г/л, але після 215 годин бродіння. Тим не менш, додавання солі призвело також до необхідності знесолення ферментованого бульйону перед відновленням еритритолу.

Щодо метаболічної інженерії для покращення виробництва еритриту, підходи були зосереджені на збільшенні потоку вуглецю через PPP шляхом

надмірної експресії важливих генів цього шляху, таких як глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа (G6PDH), 6-фосфоглюконатдегідрогеназа (6GPDH), трансальдолаза, транскетолаза та ER; зниження асиміляції еритритолу шляхом делеції гена, що кодує еритрулозокіназу; та покращення поглинання субстратів, таких як гліцерин, шляхом надмірної експресії генів, що кодують гліцеринкіназу, і сахарози, шляхом гетерологічної експресії гена інвертази з *Saccharomyces cerevisiae* у *Yarrowia lipolytica* [22].

1.3. Арабітол.

D-арабіт — п'ятивуглецевий поліол, стереоізомер ксиліту, схожий на сахарозу за солодкістю, але з меншою калорійністю (0,2 ккал/г), використовується в харчовій та фармацевтичній промисловості [24]. Цей пентитол можна також використовувати як будівельний блок для виробництва кількох хімічних речовин, таких як арабінова та ксилонова кислоти, ксиліт, пропілен, етиленгліколь тощо. Арабіт, разом із ксилітом, вважається одним із найважливіших хімічних речовин із високою доданою вартістю, який можна безпосередньо виробляти з цукру, отриманого з лігноцелюлозної біомаси. В даний час цей поліол промислово виробляється шляхом каталітичного відновлення арабінової та ліксонової кислот, що вимагає високої температури та дорогого каталізатора [25].

Арабіт можна отримати біохімічним перетворенням арабінози, ксилози, глюкози або неочищеного гліцерину. Серед цих субстратів глюкоза та гліцерин можуть бути більш перспективними, оскільки глюкоза легко та переважно споживається мікроорганізмами, що виробляють арабітол, а також вона може бути у великій кількості на біопереробних заводах, як це також може бути у випадку з гліцерином. Крім того, різні дослідження показали, що коли суміш цукрів використовувалася як середовище для культивування, як у випадку геміцелюлозних гідролізатів, цукри споживалися послідовно таким чином: глюкоза > ксилоза > арабіноза [26].

Виробництво D-арабітолу з глюкози в дріжджах може відбуватися двома альтернативними біохімічними шляхами, які можна розрізнити після того, як

глюкозо-6-фосфат входить до PPP. У деяких мікроорганізмів глюкозо-6-фосфат може перетворюватися на D-рибулозо-5-фосфат, який дефосфорилується, а потім відновлюється до D-арабітолу НАДФН-залежною D-арабітолдегідрогеназою. Інший шлях полягає в утворенні D-ксилоулозо-5-фосфатного шляху з глюкозо-6-фосфату, пентози, яка дефосфорилується, а потім відновлюється до D-арабітолу НАДН-залежною D-арабітолдегідрогеназою. У випадку гліцерину очікується утворення глюкозо-6-фосфату з цього поліолу через глюконеогенний шлях, а потім D-арабіту, утвореного одним із згаданих шляхів [27].

L-арабіт може бути отриманий з L-арабінози шляхом відновлення цієї пентози НАД(Ф)Н-залежною L-арабінозоредуктазою. Накопичення цього поліолу сприяє обмежена доступність кисню через дисбаланс НАДФ/НАД⁺, який пригнічує окислення L-арабітолу до L-ксилоулози НАД-залежною L-арабітол-4-дегідрогеназою, а потім його інтеграцію до центральних метаболічних шляхів. У разі виробництва D-арабіту з ксилози ця пентоза спочатку відновлюється до ксиліту за допомогою НАД(Ф)Н-залежної редуктази, яка далі окислюється до D-ксилоулози за допомогою НАД⁺-залежної ксилітдегідрогенази, і, нарешті, ця пентоза відновлюється до D-арабіту за допомогою НАДН-залежної арабітолдегідрогенази [28].

KogantiraJu [29] досліджували синтез D-арабітолу з сирого гліцерину *Debaryomyces hansenii* залежно від співвідношення N:P, розчиненого кисню (DO) гліцерину для підтримки його концентрації близько 100 г/л. Найвище синтез D-арабітолу, що відповідає 40 г/л, продуктивність 0,33 г/л/год і ефективність 55%, було досягнуто при N:P = 9, 30°C, DO 5% насичення повітрям і рН 3,5. Yoshikawa та ін. [30] провели подібне дослідження, у якому *Candida quercitrusa* була відібрана за її здатністю виробляти арабітол із сирого гліцерину, а умови культивування були оптимізовані. Найвищий титр арабітолу, 85,1 г/л через 10 днів, що відповідає виходу 0,40 г/л, був досягнутий у баночному ферментері при 28°C і середовищі, що містило 250 г/л гліцерину, 6 г/л дріжджового екстракту та 2 г/л CaCl₂.

JagtapRao [28] вивчали біосинтез D-арабітолу з ксилози олійними дріжджами *Rhodospiridium toruloides* у багатому азотом середовищі. Ці автори досягли максимального виробництва арабітолу 49 г/л із 150 г/л ксилози після 168 год культивування в колбах Ерленмейєра на 250 мл з 50 мл середовища при 30 °C і 250 об/хв. Суміш ферментативних гідролізатів соєвого борошна та лушпиння використовували для виробництва арабіту *D. hansenii*. Ці автори [24] досліджували вплив співвідношення C:N, мінеральних поживних добавок, DO та контролю рН спочатку в колбах Ерленмейєра, а потім збільшили до 2,5 л ферментера. Виробництво арабітолу у ферментері становило 43 г/л з 80 г/л загального цукру за 48 год, у середовищі зі співвідношенням C:N 28,5, доповненим K_2HPO_4 (2,4 г/л), DO підтримувався на рівні 5% і без контролю рН.

Що стосується відділення та очищення арабітолу, ферментований бульйон необхідно обробити активованим вугіллям для освітлення, знесолити в іонообмінних смолах, а потім сконцентрувати шляхом вакуумного випарювання приблизно до 70% (мас./об.) арабітолу. Кристалізація арабітолу може бути досягнута повільним охолодженням від 70 до 4 °C, центрифугуванням, промиванням етанолом 95% і висушуванням, що призводить до отримання порошкоподібних кристалів приблизно 98% чистоти. Арабіт може бути не єдиним продуктом метаболізму дріжджів, залежно від процесу бродіння, а мікроорганізми та часто суміші поліолів містяться у ферментованих бульйонах, розділення яких є складним і ставить під загрозу процедури очищення [31].

1.4. Сорбітол.

Сорбіт застосовується не тільки як підсолоджувач, але також як харчовий стабілізатор, зволожувач, антикаріозний засіб, текстуратор і пом'якшувач. Цей поліол має відносну солодкість приблизно 60% сахарози та має в 20 разів більшу розчинність у воді, ніж маніт. Сорбітол є низькокалорійним поліолом, з 2,5 ккал/г, і він був визнаний FDA як загально безпечна (GRAS) сполука. Добова норма споживання сорбітолу може

перевищувати 50 г, але при перевищенні цього значення існує ризик виникнення проносного ефекту. Сорбітол має нижчу глікемічну відповідь у крові порівняно з сахарозою і може бути альтернативним підсолоджувачем для пацієнтів з діабетом, а також пригнічує ріст карієсогенних видів у слизовій оболонці порожнини рота, запобігаючи карієсу. Слинovidілення стимулюється після прийому цього підсолоджувача, який можна використовувати для лікування літніх людей, які страждають від проблем ротової порожнини, викликаних недостатнім слиновиділенням. Незважаючи на сприятливий вплив на здоров'я, існують дослідження на щурах, які показали, що споживання 0,15–150 мг/кг сорбітолу на добу вплинуло на склад молока щурів у період лактації та спричинило значні метаболічні зміни після 14 днів впливу цього поліолу, що призводить до збільшення ваги у дорослих щурів.

Сорбітол промислово виробляється з глюкозного сиропу (50% мас./об.) або сумішей глюкози та фруктози шляхом каталітичного гідрування з використанням нікелю Ренея як каталізатора, температури від 120 до 150°C і тиску 70 бар. Для відновлення сорбіту спочатку каталізатор відокремлюють осадженням і фільтрацією, потім сорбіт очищають іонообмінною хроматографією та обробкою активованим вугіллям і концентрують шляхом вакуумного випарювання до 70% розчину, який є найпоширенішим комерційним продуктом. На думку цих авторів [32], більшу перевагу надавали біотехнологічному процесу, ніж хімічному, через його меншу вартість.

Біотехнологічне виробництво сорбіту досліджено з використанням переважно *Zyomonas mobilis* та рекомбінантних штамів гетероферментативних молочнокислих бактерій. *Z. mobilis* синтезує сорбіт разом з етанолом або глюконовою кислотою, коли глюкоза та фруктоза використовуються як джерела вуглецю в анаеробних умовах [9, 33]. Цей процес заснований на активності периплазматичного конститутивного ферменту глюкозо-фруктозооксидоредуктази (GFOR), який використовує НАДФН і НАДФ⁺ для відновлення фруктози до сорбіту та окислення

глюкози до глюконової кислоти відповідно.Цікавою особливістю цього біопроцесу є те, що НАДФН і НАДФ⁺ достатньо регенеруються та переробляються. Діяльність GFOR, ймовірно, пов'язана з регуляцією осмотичного стресу шляхом виробництва або сорбіту, який діє як сумісна розчинена речовина. Крім того, було зазначено, що використання високих концентрацій субстрату сприяє виробленню сорбіту через пригнічення нормального метаболізму мікроорганізму та використання субстратів переважно GFOR.

Дослідження синтезу сорбітолу *Z. mobilis* були в основному зосереджені на використанні пермеабілізованих клітин для інгібування утворення етанолу без впливу на активність GFOR. Така стратегія дозволила отримати високі ККД (більше 95%) і продуктивності (більше 1,5 г/л/год).Незважаючи на переваги іммобілізації щодо функціонування процесу та повторного використання біокаталізаторів, вона також має недоліки, пов'язані зі стабільністю іммобілізаційної матриці, втратою активності ферменту та обмеженням масопереносу.Цікавий підхід до вибіркового інгібування ферментів шляху утворення етанолу шляхом Ентнера — Дудоровадодавання двовалентних іонів, головним чином Zn^{2+} , у рекомбінантний штам *Z. mobilis* із надлишковою експресією GFOR. Використовуючи цей підхід, після оптимізації умов культивування (концентрація глюкози 160 г/л і рН 6,0) і без іммобілізації вихід сорбітолу був майже 100%, а виробництво етанолу було значно знижено[33].

Сконструйовані штами гетероферментативних молочнокислих бактерій здатні виробляти сорбітол, змінюючи катаболічний шлях цього поліюлу [34]. Для цього вивченими стратегіями були надмірна експресія сорбітол-6-фосфатдегідрогенази (Stl6PDH), пригнічення манітолфосфатдегідрогенази (M1PDH) і лактатдегідрогенази (LDH) для зменшення утворення побічних продуктів і гліколітичного потоку, покращення окисно-відновного балансу, та інактивація транспортної та катаболічної системи сорбіту, щоб уникнути утилізації сорбіту.

Ladero та ін. [35] створили штам *Lactobacillus plantarum* для біосинтезу сорбітолу з глюкози або мальтози шляхом реверсування катаболічного шляху сорбітолу через надмірну експресію Stl6PDH і порушення LDH. Ці автори виявили, що 61%-65% потоку вуглецю з фруктозо-6-фосфату було перенаправлено на утворення сорбіту за допомогою спочиваючих клітин і контрольованого рН. DeVoesk вивчав синтез сорбіту з глюкози та лактози рекомбінантним штамом *Lactobacillus casei*, у якому Stl6PDH була надекспресована, LDH та M1PDH були порушені, а система фосфоенолпірувату (PTS) сорбіт-специфічної фосфотрансферази була інактивована. Реалізація цих стратегій призвела до виробництва сорбітолу без утворення маніту та без асиміляції виробленого сорбітолу навіть після повного використання глюкози у середовищі.

Відносно висока вартість субстратів, зокрема фруктози, є одним із основних вузьких місць для збільшення масштабів біотехнологічного виробництва сорбіту. Були проведені дослідження виробництва сорбіту з побічних продуктів, таких як патока, пермеат сироватки, кукурудзяний розчин. Іншим вузьким місцем є відділення та очищення сорбіту, оскільки процедури, які використовувалися в лабораторних масштабах, такі як основна аніонообмінна смола, селективне осадження органічними розчинниками та електродіаліз, можуть бути дорогими та неефективними для промислових масштабів.

РОЗДІЛ 2. ОСТАННІ ДОСЯГНЕННЯ В МІКРОБНОМУ БІОСИНТЕЗІ МАНІТУ

Манітол — це шестивуглецевий цукровий спирт із кількома чудовими властивостями, завдяки яким він широко використовується в тонкій хімії, фармацевтичній промисловості, а також у функціональних харчових продуктах. Крім того, маніт відіграє важливу роль у стресостійкості мікроорганізмів, лишайників і рослин завдяки своїй функції сумісної розчиненої речовини. Манітол є харчовою добавкою, дозволеною Управлінням з контролю за якістю харчових продуктів і медикаментів, оскільки він може зменшити підвищення рівня глюкози в крові та реакцію на інсулін через повільне засвоювання організмом[36].

Маніт стабільний і рідко реагує з іншими інгредієнтами, а його солодкий прохолодний смак може приховати неприємний смак ліків. Так, маніт використовується у виробництві жувальних гумок, таблетованих препаратів, гранульованих порошків, тощо. У фармацевтиці маніт також використовується як дегідратуючий засіб і як діуретик. Гіпертонічний маніт може збільшити проникність гематоенцефалічного бар'єру, дозволяючи водорозчинним препаратам і макромолекулам проходити через нього. Тим часом маніт є сильним поглиначем радикалів, який може зменшити шкоду для неврологічних функцій[37].

В даний час маніт в основному отримують хімічними методами. У цьому процесі маніт синтезується гідруванням сумішей d-глюкози/d-фруктози у водних розчинах при високій температурі (120–160 °C) з використанням ранейнікелю як каталізатора та газоподібного водню як відновника [36]. У цій реакції β-фруктоза перетворюється на маніт, тоді як α-фруктоза та глюкоза перетворюються на сорбіт як побічний продукт.

					НУХТ БТЕК 02.02.08 КР ПЗ			
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дат</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Чумак С.Ю.</i>			Розділ 2. Останні досягнення в мікробному біосинтезі	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акронів</i>
<i>Перевір.</i>		<i>Старовойтов</i>					21	12
<i>Консультант</i>								23
<i>Н. Контр.</i>						Кафедра БТМ		
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков</i>						

Гідрування глюкозо-фруктозної суміші (1:1) призвело до отримання змішаних продуктів, що містять лише 25% маніту, а інші знаходяться у формі сорбіту, що спричинено низькою селективністю нікелевого каталізатора. Хімічно синтезований маніт необхідно очистити хроматографією для видалення металевого каталізатора, а для видалення сорбіту необхідна низькотемпературна кристалізація. Основними недоліками є умови високої температури та тиску, велика кількість сорбіту, а також вимога до чистих субстратів. Отже, цей хімічний процес має високі витрати на виробництво та низький вихід. В останні роки дослідницькі зусилля були спрямовані на розробку біологічних процесів виробництва маніту завдяки його економічним перевагам[38].

Маніт можна ферментативно синтезувати з фруктози за допомогою каталізу манітолдегідрогенази (MDH) з використанням НАД(Ф)Н як відновлювальних кофакторів. НАДН-залежний MDH можна очистити з *Lactobacillus brevis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Pseudomonas fluorescens*, *Rhodobacter spaeroides*, *Saccharomyces cerevisiae* і *Torulaspora delbrückii*. НАДФН-залежний MDH можна очистити з *Aspergillus parasitius*, *Candida magnoliae*, *Zygomonas mobilis* і *Gluconobacter suboxydans*. Однак вартість кофакторів і залежність від чистих ферментів є основними обмеженнями. Кофактори можуть бути відновлені ферментативними, електрохімічними, хімічними, фотохімічними та біологічними методами для підтримки зменшення фруктози. Наприклад, НАДН, використаний у синтезі маніту *S. cerevisiae* MDH, був регенований під час виробництва глюконової кислоти глюкозодегідрогеназою *Bacillus megaterium*, тоді як велика кількість глюконової кислоти, збуджена в кінцевих продуктах, призвела до подальшого очищення маніту[39]. Ще одна двоферментна система була розроблена для регенерації кофактора шляхом одночасного перетворення двох субстратів. Форміатдегідрогеназа (FDH) перетворює форміат на CO_2 і відновлює НАД^+ до НАДН. Одночасно MDH використовує НАДН для перетворення фруктози на маніт і регенерації НАД^+ . У цій системі як

побічний продукт утворюється лише CO₂, що дозволяє легко відокремити його від маніту[40]. Через високу концентрацію субстрату може спричинити інгібування ферменту; оптимальна концентрація фруктози становила 50 мМ для системи біоконверсії, що спричинило б низьку концентрацію маніту. Крім того, низька стабільність ферменту та складна ферментна система ускладнюють контроль над цим процесом, що обмежує його застосування в промислових масштабах.

Мікробне виробництво маніту може здійснюватися при нормальному тиску та низькій температурі. Висока вартість чистого водню або кофакторів, що використовуються в хімічних або ферментативних процесах, може бути замінена дешевими субстратами під час мікробної ферментації. Тому мікробне виробництво маніту є перспективною альтернативою хімічним або ферментативним процесам. Мікроби, які здатні виробляти маніт, включають кілька дріжджів, грибів, молочнокислих бактерій (LAB) з різними шляхами біосинтезу. Для досягнення ефективного та конкурентоспроможного біотехнологічного процесу виробництва маніту необхідні недорогі культуральні середовища з різними субстратами та оптимізація умов культивування [41]. Одночасно для підвищення концентрації маніту та продуктивності було розроблено ряд рекомбінантних мікроорганізмів і стратегій регулювання.

2.1. Виробництво маніту з використанням дешевих субстратів.

Вартість фруктози, яка використовується для бродіння маніту, становить майже 50% від загальної вартості виробництва, тому використання недорогого субстрату для виробництва маніту має велике значення. Використання недорогого субстрату для заміни фруктози є способом зниження вартості субстрату. Глюкоза є широко використовуваним субстратом під час мікробної ферментації з прийнятною ціною, яка становить половину фруктози.

Виділений штам *Candida magnoliae* НН-01

для отримання маніту при вирощуванні в присутності 30% фруктози та 5%

(мас./об.)

глюкоз як джерело вуглецю,

що може частково знизити вартість субстрату. *C. magnoliae* NH-01 не підходить для високої ферментації субстрату, оскільки 200 г/л глюкози може спрямувати кінцевий продукт на гліцерин. Маніт вироблявся при 0,74 г/(л год) з виходом 0,5 г маніту/г спожитої фруктози та досягав 151 г/л маніту через 200 год. *Candida parapsilosis* SK 26.001 виділено для виробництва маніту [41]. Коли глюкоза використовується як єдине джерело вуглецю, найвища концентрація маніту досягає 68,5 г/л у струшуваній колбі. Під час періодичної ферментації штамп повністю вичерпав подавану глюкозу після 72 годин бродіння, виробляючи 80,3 г/л маніту. При періодичній ферментації з підживленням концентрація маніту досягла 97,1 г/л. При повній заміні фруктози виробництво маніту цим штамом може значно знизити вартість субстрату; однак виробництво маніту *C. parapsilosis* SK 26.001 вимагає великої кількості дріжджового екстракту (30 г/л), що сильно вплине на загальну вартість. Інший штамп дріжджів, *Candida azyma* NBRC10406, може виробляти 50,8 г/л маніту з сирого гліцерину, побічного продукту виробництва біодизеля; однак продуктивність маніту була значно нижчою, ніж при використанні фруктози як субстрату [42].

Крім того, недорогі субстрати, багаті на фруктозу, також мають великий потенціал для заміни фруктози. Яблучний сік кеш'ю містить значну кількість глюкози та фруктози, і при використанні для виробництва маніту спостерігалось виробництво 18 г/л маніту з 67% фруктози, перетвореної на маніт. Виробництво 22 г/л маніту з культуральним середовищем, що містить суміш яблучного соку кеш'ю та сахарози, збільшило вихід маніту до 85%. Завдяки низькому вмісту джерела азоту в яблучному соку кеш'ю, Fontes та ін. [43] використовували яблучний сік кеш'ю, доданий сульфатом амонію та манітом 19 г/л, з високим виходом 95%. Застосування сульфату амонію замість дріжджового екстракту для виробництва маніту виявилось прийнятною стратегією для виробництва маніту з яблучного соку кеш'ю. Меласа та фруктозний сироп є побічними продуктами цукрової

промисловості, які можна використовувати як багатий на фруктозу субстрат. Повідомлялося про виробництво 40,1 г/л маніту з меляси для виробництва маніту *L. intermedius* NNRL B-3693, у той час як цей процес також утворював велику кількість молочної кислоти та етанолу. Коли суміш патоки та сиропу фруктози (1:1) використовували як субстрат, спостерігалось посилене виробництво 104,8 г/л маніту через 22 години з додаванням соєвого пептону та кукурудзяного розчину як джерела азоту.

Інулін також є придатним субстратом для виробництва маніту. Виробництво високої кількості 207,4 г/л маніту було досягнуто з інуліном за 72 години шляхом одночасного оцукрювання та ферментації. При використанні в якості субстрату суміші фруктози та інуліну (3:5, сумарно 400 г/л) бактерія продукувала 227 г/л маніту протягом 110 год.

Крім того, кукурудзяний розчин можна використовувати для заміни дріжджового екстракту, що стане ефективним способом зниження виробничих витрат. Хоча використання дешевого субстрату зробить процес виробництва маніту більш економічним, їх продуктивність значно відрізняється. Серед усіх повідомлених недорогих субстратів сироп фруктози та інулін є найбільш перспективним субстратом для виробництва маніту завдяки їхнім чудовим перевагам у концентрації маніту, врожайності та продуктивності. Хоча патока також підходить для виробництва маніту, одночасний утворення глюкану може спричинити труднощі у відділенні маніту. Крім того, слід уникати високовартісної операції, такої як додавання ферментів для гідролізу інуліну. Використання генетичного підходу для експресії інулінази у виробниках маніту може бути економічно ефективним способом подальшого зниження витрат виробництва [44].

2.2. Посилення біосинтезу маніту за допомогою генетичного удосконалення штамів мікроорганізмів.

Було продемонстровано, що генна інженерія та хімічний мутагенез дріжджів, молочнокислих бактерій і навіть кишкової палички, що не продукує маніт, з високою ефективністю перетворюють цукор на маніт[45]. У

гетероферментативному LAB значна частина фруктози відновлюється до маніту манітолдегідрогеназою (MDH), тоді як частина фруктози одночасно ферментується за допомогою фосфокетолазного (PK) шляху з утворенням суміші CO₂, етанолу, ацетату та лактату. Спільний метаболізм фруктози призводить до зниження виходу маніту. Щоб зменшити метаболічний потік фруктози в PK-шлях і забезпечити покращений вихід маніту з фруктози, робота з модифікації фруктокінази, яка бере участь у фосфорилуванні фруктози до фруктозо-6-фосфату, була оброблена в гетероферментативному LAB. Хімічним мутагенезом отримано мутант *L. pseudomonsenteroides* ATCC 12291, який не здатний рости на фруктозі. Специфічна активність фруктокінази в мутанті була знижена приблизно до 10% активності вихідного штаму, і в результаті вихід маніту був покращений з 0,75 г/г до 0,87 г/г. Мутант із повною інактивацією фруктокінази в LAB досі не був отриманий, що може припустити, що асиміляція фруктози через PK шлях необхідна для росту клітин гетероферментативного LAB під час виробництва маніту [46].

У порівнянні з гетероферментативним LAB, перевагою виробництва маніту гомоферментативними LAB може бути можливість використовувати більше цукрових субстратів для синтезу маніту з дефіцитом лактатдегідрогенази (ЛДГ) [47]. У цих штаммах маніт-1-фосфатаза (M1Pase), що перетворює фруктозо-1-фосфат на маніт, і M1PDH для регенерації НАД⁺ для забезпечення окисно-відновного балансу є двома ключовими ферментами, задіяними в шляху біосинтезу маніту. Таким чином, специфічний ген M1Pase в *Eimeria tenella* і ген mtlD, що кодує M1PDH з *Lactobacillus plantarum*, були надмірно експресовані в *Lactobacillus lactis* для збільшення синтезу маніту. Було досягнуто високого рівня перетворення глюкози в маніт 50% *L. lactis*, що було близько до теоретичного виходу маніту 67%.

Escherichiacoli є найпоширенішим штамом, який генетично модифікується для d-маніту. Каур та ін. [48] повідомили про систему

біотрансформації цілої клітини в *E.coli* для виробництва маніту з фруктози шляхом побудови рекомбінантного циклу окиснення-відновлення. Ген *mdh*, що кодує манітдегідрогеназу, і ген *fdh*, що кодує форміатдегідрогеназу, були функціонально надмірно експресовані в клітинах *E.coli*. Щоб дозволити клітинам ефективно поглинати фруктозу без одночасного фосфорилування, ген *glf*, що кодує білок сприяння глюкозі *Zyotomonasmobilis*, був введений одночасно. Рекомбінантний штам продукував 363 мМ маніту за 8 год в умовах контролю рН. Крім того, додавання до цього штаму позаклітинної глюкозоізомерази призвело до виробництва 145,6 г/л маніту з 180 г/л глюкози.

Хоча гетероферментативні LAB виробляють велику кількість маніту з фруктози, вони також виробляють молочну кислоту та оцтову кислоту як супутні продукти, а наявні інструменти генної інженерії не дозволяють використовувати методи спрямованої інактивації штаму. У дослідженні [49] було отримано велику кількість 23,5 г/л d-молочної кислоти разом із 64,6 г/л маніту з оптичною чистотою 99,9 %.

З іншої точки зору, якби можна було відновити велику кількість d-молочної кислоти, було б вигідно покращити економію процесу. Крім того, виробництво маніту з глюкози гомоферментативним LAB є неефективним через дуже низьку концентрацію маніту. Тому було розроблено низку рекомбінантних мікроорганізмів для надмірного виробництва маніту та обмеження побічних продуктів. Щоб посилити виробництво маніту під час тривалої біотрансформації, *Corynebacterium glutamicum* також використовували для встановлення рекомбінантного циклу окиснення/відновлення для перетворення фруктози в маніт. Експресія генів *mdh*, *fdh* і *glf* у *C.glutamicum* призвела до виробництва 87 г/л маніту з 93,7 г/л d-фруктози. Під час повторюваної біотрансформації з підживленням було утворено 285 г/л d-маніту протягом 96 годин [50].

Виробники маніту, створені за допомогою генної інженерії, продемонстрували великий потенціал для виробництва маніту у високій

концентрації, що перевищує теоретичний вихід завдяки повній уникненню витоку фруктози порівняно з місцевими виробниками. Проте безпека маніту, виробленого генно-інженерними виробниками, може викликати занепокоєння, особливо при використанні в медицині та охороні здоров'я.

2.3. Стратегії регулювання процесу для ефективного виробництва маніту.

Вироблення маніту мікроорганізмами було широко вивчено за допомогою періодичної ферментації; однак періодичний режим страждає від відносно низької концентрації маніту та продуктивності через інгібування субстрату та маніту. Періодична ферментація може подолати обмеження, спричинені високими концентраціями субстрату. Tomaszewska та ін. [51] повідомили, що штам *Yarrowia lipolytica* A-15 виробляв 27,6 г/л маніту, а під час періодичної ферментації *Y. lipolytica* A-15 виробляв 41,4 г/л маніту, що на 50% вище, ніж при періодичній ферментації. Вплив періодичної ферментації з підживленням на виробництво маніту *Leuconostoc pseudomesenteroides* ATCC-12291 у культурах з періодичним підживленням, спостерігалася середня продуктивність манітолу 6,3 г/л/год з високим виходом маніту 0,95 г/г фруктози. Повідомлялося, що періодичне бродіння може запобігти споживанню виробленого маніту на пізніх стадіях бродіння, що сприятиме накопиченню маніту. Коли *C. magnoliae* використовували для виробництва маніту, концентрація маніту досягла 209 г/л після 200 годин бродіння.

Мембранний біореактор із переробкою клітин (MCRB) міг би задовільно вирішити ці проблеми. MCRB було продемонстровано в ряді попередніх досліджень високооб'ємної продуктивності молочної кислоти та етанолу. Мембранну техніку можна використовувати для запобігання втраті клітин під час безперервної ферментації, і, отже, поступово збільшує щільність клітин. *L. mesenteroides* ATCC-9135 досліджували в культурах мембранних клітин з високою щільністю клітин. Зрештою, об'ємна продуктивність маніту досягла 26,2 г/(л год).

Racine і Saha [52] використовували *L. intermedius* NRRLB-3693 для виробництва маніту в безперервному ферментаційному циклі клітин із мембранним модулем. Процес було розроблено з використанням розчину для замочування кукурудзи та глюкози як недорогих промислових джерел поживних речовин, і продуктивність маніту досягла значного високого рівня 40 г/(л год), чому в основному сприяла висока щільність клітин у безперервних процесах ферментації з повторним циклом клітин.

На вихід маніту в основному впливають аерація, рН, наявність іонів металів. У гетероферментативному LAB 1 моль глюкози або фруктози метаболізується до 1 моль молочної кислоти та 1 моль оцтової кислоти або етанолу. Утворені органічні кислоти знижують рН бродіння, що значно пригнічує ріст LAB і знижує виробництво маніту. Отже, стратегія контролю рН є багатообіцяючим підходом до покращення виробництва маніту за допомогою гетероферментативної LAB.

Saha та Racine [53] оптимізували рН бродіння для виробництва маніту з фруктози *L. intermedius* NRRL B-3693. В умовах оптимального рН вихід маніту був приблизно вдвічі більшим, ніж при неконтрольованому бродінні рН. Виробництво маніту тісно пов'язане з ростом клітин, тоді як бажаний рН для виробництва маніту не завжди може відповідати рН для росту клітин. Таким чином, для ефективного накопичення маніту може не підходити для підтримки постійного рН протягом усього процесу бродіння. Таким чином, ферментація зі стратегією поетапно контрольованого рН є дійсною стратегією для покращення виробництва маніту. Було виявлено, що *Lactobacillus brevis* 3-A5 ефективно виробляє маніт, регулюючи рН у періодичній ферментації та ферментації з підживленням. Значення рН контролювали на рівні 5,5 протягом перших 12 годин, щоб покращити ріст клітин, а потім зміщували до 4,5, щоб посилити накопичення маніту. Двоступеневе бродіння з підживленням із контрольованим рН збільшило виробництво маніту до 215 г/л після 98 годин бродіння, що було на 109% вище, ніж без контролю рН [54]. Вихід маніту *L. mesenteroides*

значно змінювався в залежності від застосованої стратегії аерації. В умовах аерації метаболізм фруктози відбувався двома різними шляхами: частина фруктози відновлювалась до маніту, пов'язаного з окисненням НАДН, тоді як решта фруктози метаболізувалась через РК шлях і перетворювалась на еквімолярну суміш молочної кислоти, ацетату та CO₂. При зростанні з обмеженим вмістом кисню було отримано більш високе виробництво маніту і не відбувалося виробництва етанолу. У присутності глюкози при регенерації коферменту зазвичай очікується утворення етанолу як кінцевого продукту, а не ацетату в анаеробних умовах. Коли підтримувалася адекватна аерація по всій культурі, значного виробництва етанолу не відбувалося. Використовуючи стратегію двоступеневої ферментації, виробництво маніту було збільшено з 60 до 240 г/л за допомогою *Candida magnoliae* R9. Крім того, вихід маніту та продуктивність були на високому рівні 0,81 г/г та 4,0 г/л/год. Двоступеневий процес бродіння складався з фази вирощування та фази виробництва. Під час фази росту додавали глюкозу та підтримували аеробні умови. Після цього фазу виробництва розпочали шляхом додавання фруктози та переходу на анаеробні умови шляхом припинення аерації та зменшення швидкості перемішування [55].

Теоретичний вихід маніту, що виробляється гетероферментативними молочнокислими бактеріями, становить 66,7 моль% через 33,3 моль% цукру, що використовується для регенерації кофактора. За оптимальних умов на моль збродженої глюкози 2 моль фруктози повністю відновлюються до маніту. Джерелами вуглеводів для ферментації маніту гетероферментативних молочнокислих бактерій були фруктоза та глюкоза у співвідношенні 2:1. Для деяких лактобактерій швидкість росту на фруктозі є вищою, ніж на глюкозі, і фруктоза фосфорилується у фруктозо-6-фосфат за допомогою фруктокінази (ФК). Тоді регенерація НАД⁺ повинна бути досягнута за допомогою альтернативного акцептора електронів. Тому фруктоза одночасно відновлюється до маніту манітолдегідрогеназою, і один моль фруктози каталізує чисте виробництво 1 моль НАД⁺. Таким чином, виробництво

високого виходу маніту вимагає достатньої кількості НАДН, щоб спрямувати потік фруктози на шлях синтезу маніту, тому нікотинову кислоту (НА) додають у ферментаційне середовище для маніпулювання внутрішньоклітинним пулом НАДН. Питома активність МДН постійно зростала разом із внутрішньоклітинним рівнем НАДН, а загальний вихід маніту збільшувався з 0,69 до 0,95 г [49].

Було продемонстровано, що іон марганцю відіграє центральну роль у виробництві відновлюючої сили НАДН і, отже, необхідний для клітинних функцій і більш важливий для транспортування та відновлення фруктози. Додавання слідової кількості 0,033 г/л сульфату марганцю в ферментаційне середовище призвело до виробництва 200,6 г маніту *Lactobacillus intermedius* NRRL B-3693, під час якого вихід маніту досяг свого теоретичного значення 0,67. Повідомлялося, що вихід маніту під час мікробної ферментації збільшується після додавання певних мінералів, таких як Ca^{2+} і Cu^{2+} . Іон Ca^{2+} може змінювати проникність клітин для маніту, а Cu^{2+} може підвищувати активність МДН, яка відповідає за біосинтез маніту. Остаточне виробництво маніту дріжджами *S. magnoliae* НН-01 досягло 223 г/л, коли фруктозно-глюкозне середовище було доповнено Ca^{2+} і Cu^{2+} [41].

Отже, мікробна ферментація є перспективним підходом для виробництва маніту з високим виходом, якого неможливо досягти хімічними чи ферментними методами. Дослідження щодо використання дешевих субстратів, розробки штамів і стратегій регулювання процесу роблять можливим економічне виробництво маніту. Однак при використанні дешевих субстратів концентрація маніту була значно нижчою, ніж при використанні фруктози, що могло бути викликано низькою ефективністю перетворення субстратів у попередник маніту. Тому слід розглянути подальшу роботу з покращення використання недорогого субстрату. Крім того, здається, що LAB є придатною клітинною фабрикою для виробництва маніту, тоді як відсутність технології в генах інактивації LAB обмежує подальше підвищення виходу маніту. Розробка генетичних інструментів для

маніпулювання метаболічним шляхом LAB, особливо метаболічним потоком відновлюючих кофакторів, також є потенційним способом отримання високого виходу маніту, тоді як безпека маніту, виробленого генно-інженерними виробниками, може викликати занепокоєння. Комбіновані стратегії використання недорогого субстрату, розвитку деформації та регулювання процесу слід використовувати для підвищення ефективності процесу.

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВА ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ (ЛЗ)

3.1. Аналіз фармакологічних властивостей маніту та галузей використання.

Манітол — це природний шестивуглецевий цукровий спирт або поліол. Це найпоширеніший поліол у природі, який зустрічається в бактеріях, дріжджах, грибах, водоростях, лишайниках і деяких рослинах, таких як гарбуз, селера, цибуля, трави, оливки та омела. Манітол є загальновідомою сумісною розчиненою речовиною, тобто компонентом, який захищає організми, які піддаються ряду стресових ситуацій. Було виявлено, що манітол захищає рослини, гриби, дріжджі та бактерії в умовах стресу [56, 57]. Повідомлялося, що манітол накопичується у відповідь на вплив зовнішнього середовища, наприклад осмотичний стрес [58, 59].

Управління з контролю за харчовими продуктами та ліками (FDA) дозволило манітол використовувати у чотири способи:

- Для зниження внутрішньочерепного тиску та маси мозку[60];
- Для зниження внутрішньоочного тиску, якщо цього неможливо досягти іншими способами [61];
- Манітол може сприяти діурезу при гострій нирковій недостатності для запобігання або лікування олігуричної фази перед незворотним пошкодженням[62];
- Манітол також може сприяти діурезу для сприяння виведенню токсичних речовин, матеріалів і метаболітів.

Механізм дії манітолу полягає в тому, що — це шестивуглецевий лінійний простий цукор, який лише помірно метаболізується організмом і переважно швидко виводиться нирками при внутрішньовенному введенні та

					НУХТ БТЕК 02.02.08 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ документа	Підпис	Дат				
Розроб.		Чумак С.Ю.			Розділ 3. Техніко- економічне обґрунтування виробництва	Літ.	Арк.	Акрюків
Перевір.		Старовойтов					33	20
Консультант								35
Н. Контр.						Кафедра БТМ		
Затверд.		Стабніков						

погано засвоюється при пероральному прийомі.

Манітол використовують для зниження внутрішньочерепного тиску. При цьому показанні маніт вводять внутрішньовенно. Потім він утворює нову розчинену речовину в плазмі, що підвищує тонус плазми. Оскільки маніт не може подолати непошкоджений гематоенцефалічний бар'єр, підвищений тонус маніту витягує воду з паренхіми мозку у внутрішньосудинний простір. Вода потім йде з манітом до нирок, де виводиться з сечею.

Для зниження внутрішньоочного тиску при внутрішньовенному введенні манітол є новою розчиненою речовиною у внутрішньосудинному просторі, яка підвищує тонус плазми крові. Підвищений тонус плазми крові виводить воду зі склоподібного тіла ока у внутрішньосудинний простір. Коли склоподібне тіло має менше води, після зневоднення манітом воно має меншу масу і, таким чином, створює менший тиск. Нижчий тиск менше ймовірно пошкодить сітківку. Потрапляючи у внутрішньосудинний простір, маніт і пов'язана з ним вода виводяться нирками [63].

Подібно до манітолу, який призначають при олігурії гострої ниркової недостатності, маніт можна призначати для посилення виведення токсичних матеріалів, речовин і ліків. Нирки виділяють маніт, який після виведення погано реабсорбується і, таким чином, втягує з собою додаткову воду в ниркові збірні протоки. Надлишок води в ниркових збірних протоках може допомогти збільшити виведення водорозчинних токсичних матеріалів, речовин і ліків.

Манітол також цікавий продукт з іншої точки зору. Манітол є цінним поживним підсолоджувачем, оскільки він нетоксичний, негіроскопічний у своїй кристалічній формі та не викликає карієсу. Він має солодкий, прохолодний смак і приблизно вдвічі солодший за сахарозу [64]. Манітол використовується як харчова добавка (E421) [65].

3.1.1. Обсяг ринку та очікувані темпи його розвитку.

Світовий ринок цукрових спиртів (поліолів) у 2000 році становив 1,3 мільярда доларів США [66]. Найбільшим цукровим спиртом за обсягом і доларами продажів був сорбіт. Сорбіт здебільшого продається у вигляді 70% (маса/об'єм) водного розчину. Більше мільйона тонн сорбіту (рідкого та кристалічного) було продано в 2015 році, в основному в США, Європі та Азії. Оптові ціни на рідкий і кристалічний сорбіт становлять близько 0,55-0,65 доларів США за кг і 1,61-2,26 доларів США за кг відповідно. Річний ринок маніту оцінювався приблизно в 30 000 тонн.

Для більшості цукрових спиртів ринок є зрілим, і очікується, що зростання обсягів буде відповідати тенденціям великомасштабних споживчих товарів, у яких використовуються цукрові спирти. У найближчі п'ять років щорічне зростання обсягів оцінюється в 2-3%, а ціноутворення знизиться на 1-2%.

Смертність від серцево-судинної патології становить 66,3% загального показника. Високий артеріальний тиск значно підвищує ризик захворіти на ішемічну хворобу серця, мозковий інсульт, а також на серцеву та ниркову недостатність, призводить до враження судин та очей.

У людей з високим тиском у 3-4 рази частіше розвивається ішемічна хвороба серця і в 7 разів — порушення мозкового кровообігу. Саме тому лікарі закликають громадян не займатись самолікуванням, а відвідувати лікаря не лише для контролю власного стану здоров'я, а й для можливості заощадити на лікуванні. Це, переконані фахівці, дозволяє знизити смертність від ускладнень гіпертонічної хвороби, зокрема, інсульту.

За даними ВООЗ [67], у 2019 проблема з тиском була 7-ю лідуючою причиною смерті у країнах з рівнем доходу вищим за середній і 9-й у країнах з високим рівнем доходів на душу населення (2000 р.) це була 18-та провідна причина смерті в цих країнах.

Уже декілька десятиріч поспіль серцево-судинні захворювання (ССЗ) залишаються основною причиною смерті населення в різних країнах світу, в тому числі в Україні. Вагоме місце серед патології серцево-судинної

системи займає артеріальна гіпертензія (АГ), яку по праву можна вважати неінфекційною епідемією, що охопила населення планети у XX ст. і продовжила його винищення у XXI ст.

Артеріальна гіпертонія (АГ), за визначенням Комітету експертів ВООЗ, — це постійно підвищений систолічний та/або діастолічний артеріальний тиск. Верхню межу норми вважають значення 140 мм рт. ст. — для систолічного артеріального тиску і 90 мм рт. ст. — для діастолічного. Близько 90-95% випадків АГ відносяться до категорії есенціальної (первинної) гіпертонії, або гіпертонічної хвороби, яка характеризується появою високого кров'яного тиску без будь-яких очевидних медичних причин. Решта 5-10% випадків мають назву «вторинна, симптоматична гіпертонія» і спричинені хворобами інших органів та систем (нирок, артерій, серця або ендокринної системи). Всього існує понад 50 захворювань та клінічних станів, що можуть призвести до розвитку вторинної АГ.

Найбільш розповсюджена АГ серед осіб похилого та старечого віку, однак розвиваючись у більш ранньому віці вона сильніше відображається на тривалості життя, зменшуючи її. Сьогодні відомо, що очікувана тривалість життя чоловіка, який у віці 35 років має рівень артеріального тиску (АТ) 120/80 мм рт. ст., становить в середньому 76 років, тоді як при рівні АТ 150/100 мм рт. ст. — лише 55 років [68].

Гіпертонічна хвороба є найпоширенішим захворюванням серед хвороб системи кровообігу. За статистичними даними МОЗ України гіпертонічна хвороба уражує 30% людей, що живуть у містах і 36% жителів сільської місцевості. Усього в нашій країні у 2015 році на обліку в закладах охорони здоров'я знаходилось 9,6 млн. хворих на артеріальну гіпертонію.

Протягом минулого року було виявлено вперше в житті 364010 випадків захворювання на гіпертонічну хворобу (у 2017 році — 314384). Ця хвороба частіше виникає у людей похилого віку, проте її розвиток нерідко починається ще в молодому, а інколи навіть і в дитячому віці [69].

Статистика серцево-судинних захворювань у світі невтішна — понад 17 мільйонів смертей, що становить третину загальної кількості померлих. За статистикою від серцево-судинних захворювань в Україні помирає мільйон людей на рік. У перерахунку на 100 тисяч населення українська статистика сумна — це у 2 рази вище, ніж у європейських країнах та у півтора рази більше, ніж у середньому по планеті. Держави вживають заходів боротьби з серцево-судинними захворюваннями, але багато залежить від самого хворого.

Історія становлення антигіпертензивної терапії стартує з діуретиків, які й досі відносять до препаратів першої лінії лікування АГ. Сьогодні можна з упевненістю казати про гіпотензивну ефективність діуретиків, яка проявляється тією чи іншою мірою в усіх представників групи.

Отже, згідно статистичних даних в Україні кількість хворих становить 466 300 осіб щороку [70]. З них ті, що потребують осмотичних діуретиків третина, тобто 155 500 на рік. Також візьмемо 5% потреби ринку при виході на зарубіжний ринок. При щорічному захворюванні в світі у кількості 17 млн. осіб матимемо потребу: $17\,000\,000/3 - 155\,500 = 5\,511\,166$. $5\,511\,166 * 5 / 100 = 275\,558$ на рік. В загальному обсязі маємо забезпечити препаратом 431 058 осіб на рік.

3.1.2. Перелік виробників Маніту і виробників (постачальників) манітолу.

Перелік виробників субстанції манітолу:

1. SingsinoGroupLimited, Китай;
2. SinowayInternational (Jiangsu) Co., Ltd., Китай;
3. Roquette Freres, Франція
4. ООО "Архангельский водорослевый комбинат", Росія.

Показання: набряк мозку; черепно-мозкова гіпертензія (при нирковій або нирково-печінковій недостатності); гострий напад глаукоми; епілептичний статус; олігурія при гострій нирковій або нирково-печінковій недостатності зі збереженою фільтраційною здатністю нирок (у складі

комбінованої терапії); посттранс фузійні ускладнення після введення несумісної крові; форсований діурез при отруєннях барбітуратами та саліцилатами та інших отруєннях; для профілактики гемолізу при операціях з екстракорпоральним кровообігом з метою попередження ішемії нирок і пов'язаної з нею гострою нирковою недостатністю [71].

Перелік виробників препарату:

1. МАНІТ, виробник: ТОВ "Юрія-Фарм", м. Київ, Україна;
2. МАНІТ, ПрАТ "Біофарма", м. Київ, Україна;
3. МАНІТ, ЗАТ "Інфузія", м. Київ, Україна;
4. МАНІТ, ВАТ "Красфарма", м. Красноярськ, Російська Федерація;
5. МАНІТ, ВАТ "Дніпрофарм", м. Дніпропетровськ, Україна;
6. МАНІТ, ТОВ фірма "Новофарм-Біосинтез", Житомирська обл., м. Новоград-Волинський, Україна;
7. МАНІТОЛ, Євролайф Хелткеар Пвт. Лтд., Індія;
8. МАНІТОЛ, ВАТ Науково- виробничий концерн "ЕСКОМ", м. Ставрополь, Російська Федерація [72];
9. Маннітол-Келун-Казфарм, фл. рег. №: ЛП-004739 от 13.03.18 Келун–Казфарм (Казахстан) [73].

3.2 Обґрунтування вибору форми випуску лікарського засобу (ЛЗ).

3.2.1. Обґрунтування форми випуску ЛЗ. Манітол — це природний шестивуглецевий цукровий спирт або поліол. Це найпоширеніший поліол у природі, який зустрічається в бактеріях, дріжджах, грибах, водоростях, лишайниках і деяких рослинах, таких як гарбуз, селера, цибуля, трави, оливки та омела. Манітол є загальновідомою сумісною розчиненою речовиною, тобто компонентом, який захищає організми, які піддаються ряду стресових ситуацій. Було виявлено, що манітол захищає рослини, гриби, дріжджі та бактерії в умовах стресу [74, 75]. Повідомлялося, що манітол накопичується у відповідь на вплив зовнішнього середовища, наприклад осмотичний стрес [76, 77].

Управління з контролю за харчовими продуктами та ліками (FDA) дозволило манітол використовувати у чотири способи:

- Для зниження внутрішньочерепного тиску та маси мозку[78];
- Для зниження внутрішньоочного тиску, якщо цього неможливо досягти іншими способами [79];
- Манітол може сприяти діурезу при гострій нирковій недостатності для запобігання або лікування олігуричної фази перед незворотним пошкодженням[80];
- Манітол також може сприяти діурезу для сприяння виведенню токсичних речовин, матеріалів і метаболітів.

Механізм дії манітолу полягає в тому, що — це шестивуглецевий лінійний простий цукор, який лише помірно метаболізується організмом і переважно швидко виводиться нирками при внутрішньовенному введенні та погано засвоюється при пероральному прийомі.

Манітол використовують для зниження внутрішньочерепного тиску. При цьому показанні маніт вводять внутрішньовенно. Потім він утворює нову розчинену речовину в плазмі, що підвищує тонус плазми. Оскільки маніт не може подолати непошкоджений гематоенцефалічний бар'єр, підвищений тонус маніту витягує воду з паренхіми мозку у внутрішньосудинний простір. Вода потім йде з манітом до нирок, де виводиться з сечею.


Для зниження внутрішньоочного тиску при внутрішньовенному введенні манітол є новою розчиненою речовиною у внутрішньосудинному просторі, яка підвищує тонус плазми крові. Підвищений тонус плазми крові виводить воду зі склоподібного тіла ока у внутрішньосудинний простір. Коли склоподібне тіло має менше води, після зневоднення манітом воно має меншу масу і, таким чином, створює менший тиск. Нижчий тиск менше ймовірно пошкодить сітківку. Потрапляючи у внутрішньосудинний простір, маніт і пов'язана з ним вода виводяться нирками [81].

Подібно до манітолу, який призначають при олігурії гострої ниркової недостатності, маніт можна призначати для посилення виведення токсичних матеріалів, речовин і ліків. Нирки виділяють маніт, який після виведення погано реабсорбується і, таким чином, втягує з собою додаткову воду в ниркові збірні протоки. Надлишок води в ниркових збірних протоках може допомогти збільшити виведення водорозчинних токсичних матеріалів, речовин і ліків.

Для виробництва лікарського засобу перш за все необхідним є розуміння подальшої її реалізації та потреб в даному ЛЗ.

Таблиця 3.1

Перелік та характеристика лз на основі манітолу

Торгова назва, виробник, країна	Субстанція	Застосування
<p>Маніт [12], Юрія-Фарм, Україна</p>  <p>Розчин для інфузій</p>	<p><i>Манітол</i></p>	<p>Набряк мозку, церебральна гіпертензія, інтенсивна терапія судомного стану, асцит; гостра печінкова та ниркова недостатність зі збереженою фільтраційною здатністю нирок та інші стани, які потребують посилення діурезу.</p>
<p>Бронхітол [13], Pharmaxis, Австралія</p>  <p>Порошок для інгаляцій</p>	<p><i>Манітол</i></p>	<p>лікування муковісцидозу.</p>

Згідно статистичних даних в Україні кількість захворювань серцево-судинної системи становить 466 300 осіб щороку[81]. З них ті, що потребують осмотичних діуретиків третина. Зважаючи на це в подальшому будемо розглядати маніт розчин для інфузій. Оптимальний спосіб введення Маніту внутрішньовенно – струминою повільно або крапельно.

3.2.2. Обґрунтування вибору первинної і вторинної упаковки ЛЗ.

Первинна - індивідуальна або споживча упаковка, в якій є безпосередній контакт лікарського засобу з матеріалом упаковки Вона призначена для створення необхідних умов, забезпечуючих тривалу цілісність укладеної в ній лікарської форми.

Отриманий препарат – це прозора безбарвна або злегка жовтуватого кольору рідина. Зазвичай, для розчинів для інфузій використовуються скляні флакони закупорені гумовими пробками.

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

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

Вторинна - упаковка, яка призначена для захисту первинних упаковок (їх цілісності) і для більш повних інформативних відомостей. [82]

Вторинна упаковка дозволяє здійснювати найбільш простий і зручний облік, а також контролювати лікарські препарати. Як вторинна упаковку застосовують картонні або полімерні пачки, коробки. У ряді випадків вторинна упаковка створює додаткову герметизацію і захист первинної упаковки від дії зовнішніх чинників. Вторинна упаковка також належить до споживчої [82].

Для подальшого опису було обрано виробництво Маніту в такому пакуванні.

Первинна упаковка: Флакони скляні типу П-100Б1-2 виробника ПрАТ "Біо мед скло", Україна закупорені гумовими пробками типу LK-28 виробника "SanokRubber", Польща і ковпачок алюмінієвий з пластиковою накладкою K-3-28ZB виробництва «МП Чернівецький завод медичних виробів», Україна.

Вторинна упаковка: Пачка з білого картону з нанесенням шрифту Брайля та всією необхідною інформацією.

3.3. Обґрунтування вибору біологічного агенту для отримання субстанції для інженерної частини роботи.

Мікробне виробництво маніту може здійснюватися при нормальному тиску та низькій температурі. Висока вартість чистого водню або кофакторів, що використовуються в хімічних або ферментативних процесах, може бути замінена дешевими субстратами під час мікробної ферментації. Тому мікробне виробництво маніту є перспективною альтернативою хімічним або ферментативним процесам. Мікроби, здатні виробляти маніт, включають кілька дріжджів, грибів, молочнокислих бактерій (LAB) з різними шляхами біосинтезу [1]. Для досягнення ефективного та конкурентоспроможного біотехнологічного процесу виробництва маніту необхідні недорогі культуральні середовища з різними субстратами та оптимізація умов культивування [83]. Одночасно для підвищення концентрації маніту, врожайності та продуктивності розроблено ряд рекомбінантних мікроорганізмів і стратегій регулювання. Цей огляд здебільшого зосереджений на нещодавніх досягненнях у підвищенні економічної ефективності мікробного виробництва маніту, включаючи використання недорогих субстратів, розвиток штаму для високого виходу маніту та стратегії регулювання процесу для високої продуктивності (Табл.3.2) [84].

Допоміжні речовини у всіх субстратах є однаковими (пептон, м'ясний екстракт, Tween 80 іт.д.), тому в таблицях наведені тільки компоненти зі змінним вмістом.

Характеристика процесів біологічного виробництва маніту

Біологічний агент	Метод ферментації	Субстрат	Концентрація манітолу (г/л)	Літ.
Бактерії				
<i>L. lactis, AldhΔmtlF</i>	Вилучно-доливні	Глюкоза 7,2 г/л	2,4	85
<i>L. lactisAldh, overexpressing MIPDH and MIPase</i>	Глибинна	Глюкоза 20 г/л	9	86
<i>L. pseudomesenteroides, fructokinase inactivation</i>	Глибинна	Глюкоза 10 г/л та фруктози 20 г/л	н/в	87
<i>L. mesenteroides</i>	Періодична	Глюкоза 50 г/л, фруктоза 100 г/л	90	
	Періодичні з підживленням субстрату	Глюкоза/фруктоза 1:2	150	
<i>L. mesenteroides M204</i>	Періодичні з підживленням субстрату	Глюкоза/фруктоза 1:2	165	

Закінчення таблиці 3.2

<i>L. mesenteroides</i>	Вилучно-доливні	Глюкоза 50 г/л, фруктоза 100 г/л	87	88
<i>L. mesenteroides</i>	Періодична	Сік яблука кеш'ю	18	89
<i>L. intermedius</i> <i>NRRLB-3693</i>	Періодичні з підживленням субстрату	Фруктоза 67 г/л та глюкоза 33,5 г/л	196	90
<i>L. fermentum</i>	Періодична	Глюкоза 50 г/л та фруктоза 100 г/л	83	91 , 92
Гриби				
<i>C. magnoliae</i> НН-01	Періодичні з підживленням субстрату	Фруктоза 250 г/л та глюкоза 50 г/л	213	93
<i>C. magnoliae</i> НН-01	Періодична	Фруктоза 250 г/л та глюкоза 30 г/л	223	94

Вартість фруктози, яка використовується для бродіння маніту, становить майже 50% від загальної вартості виробництва, тому використання дешевого субстрату для виробництва маніту має велике значення. Використання недорогого субстрату для заміни фруктози є способом зниження вартості субстрату (як показано в таблиці 3.3).

**Виробництво маніту з використанням недорогого субстрату для
заміни фруктози**

Біологічний агент	Метод ферментації	Субстрат	Концентрація манітолу (г/л)	Література
<i>Candida azyma</i> <i>NBRC10406</i>	Періодична	30% м/о гліцерин	50,8	95, 96
<i>Candida zeylanoides</i> <i>KY 6166 w</i>	Періодична	10% м/о n-алкану	63	97
<i>Candida parapsilosis</i> <i>SK 26.001</i>	Вилучно-доливні	20% м/о глюкози	68,5	83
	Періодична	28,4% м/о глюкози	80,3	
	Періодичні з підживленням субстрату	Глюкоза/фруктоза 1:2	97,1	

Глюкоза є широко використовуваним субстратом під час мікробної ферментації з прийнятною ціною, яка становить половину фруктози [95]. Також, кукурудзяний розчин можна використовувати для заміни дріжджового екстракту, що стане ефективним способом зниження виробничих витрат.

Крім того, недорогі субстрати, багаті на фруктозу, також мають великий потенціал для заміни фруктози (як показано в таблиці 3.4).

Патока та фруктозний сироп є побічними продуктами цукрової промисловості, які можна використовувати як багатий на фруктозу субстрат.

Виробництво маніту шляхом використання багатих на фруктозу субстратів замість чистої фруктози

Біологічний агент	Метод ферментації	Субстрат	Концентрація манітолу (г/л)	Література
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>B-512F</i>	Періодична	Сік яблука кеш'ю	18	90
		Сік яблука кеш'ю з $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	19	
<i>Lactobacillus intermedius</i> <i>NNRL B-3693</i>	Періодична	Патока	40,1	91
		Патока і фруктозний сироп (1:1)	104,8	
<i>Lactobacillus intermedius</i>	Періодична	Інулін 300 г/л	207	92
		Фруктоза 150 г/л і інулін 250 г/л	227	

Хоча використання дешевого субстрату зробить процес виробництва маніту більш економічним, їх продуктивність значно відрізняється. Серед усіх недорогих субстратів сироп фруктози та інулін є найбільш перспективним субстратом для виробництва маніту завдяки їхнім чудовим перевагам у концентрації маніту, врожайності та продуктивності. Хоча патока також підходить для виробництва маніту, одночасний утворення глюкану може спричинити труднощі у відділенні маніту. Крім того, слід уникати високовартісної операції, такої як додавання ферментів для гідролізу інуліну. Використання генетичного підходу для експресії інулінази у виробниках маніту може бути економічно ефективним способом подальшого зниження витрат виробництва [98].

На наступному етапі провели порівняння вартості поживних середовищ (з найвищим виходом манітолу) (табл. 3.5) з метою визначення їх рентабельності для культивування того чи іншого продуцента цільового продукту.

Порівняння вартості компонентів поживних середовищ

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Література
<i>L. mesenteroides</i> M204	Фруктоза - 60	115	6,9	99
	Глюкоза - 30	118	3,54	100
	Вартість 1 л середовища – 10,44 грн			
<i>Lactobacillus intermedius</i>	Фруктоза - 67	115	7,71	99
	Глюкоза – 33,5	118	3,95	100
	Вартість 1 л середовища – 11,66 грн			
<i>Lactobacillus intermedius</i>	Фруктоза – 150 г/л	115	17,25	99
	Інулін – 250 г/л	350	87,5	101
	Вартість 1 л середовища – 104,75 грн			
<i>Lactobacillus intermedius</i>	Інулін 300 г/л	350	105	101
	Вартість 1 л середовища – 105 грн			

З табл. 3.5 бачимо, що вартість середовища для культивування *L. mesenteroides* M204 є нижчою у порівнянні з іншими бактеріями, але все ж не враховано продуктивність. Щоб остаточно обрати найефективніший біологічний агент, розраховували умовну вартість 1 ОД цільового продукту (табл. 3.6).

Умовна вартість продукту

Біологічний агент	Компонент поживного середовища, г/л	Вартість 1 л середовища, грн	Вихід манітолу (г/л)	Умовна собівартість цільового продукту, грн/вихід
<i>L. mesenteroides</i> M204	Фруктоза - 60 Глюкоза - 30	10,44	165	0,063
<i>Lactobacillus intermedius</i>	Фруктоза - 67 Глюкоза – 33,5	11,66	196	0,059
<i>Lactobacillus intermedius</i>	Фруктоза – 150 г/л Інулін – 250 г/л	104,75	207	0,506
<i>Lactobacillus intermedius</i>	Інулін 300 г/л	105	227	0,463

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

Беручи до уваги дані з попередньої таблиці можна зробити висновок, що найбільш економічним середовищем для культивування є розчин фруктози та глюкози, в поєднанні з біологічним агентом *Lactobacillusintermedius*, адже умовна собівартість становить 0,059.

Незважаючи на високі виходи манітолу, його синтез завжди залежав від присутності фруктози, що є серйозним економічним обмеженням. Інші альтернативи потребують використання менш дорогих цукрових субстратів з бактеріями або використання генно-інженерних мікроорганізмів. Використання сконструйованих мікроорганізмів для синтезу цукрових спиртів повністю залежить від їхнього метаболічного потенціалу: вони повинні мати можливість накопичувати попередники альдози (прості цукри), а потім відновлювати їх до цукрових спиртів. Загалом,

Lactobacillus intermedius особливо підходять для цього завдання через їх ферментативний метаболізм і результуючі окисно-відновні переходи [102].

3.4. Розрахунок потреби у субстанції для випуску ЛЗ та розрахунок річної потреби у культуральній рідині для одержання розрахованої кількості субстанції.

Маніт вводять внутрішньовенно – струминно повільно або крапельно.

Дорослим з профілактичною метою вводять у разовій дозі 0,5 г/кг маси тіла, із терапевтичною – 1–1,5 г/кг. Добова дозана може бути вище 140 – 180 г.

Дорослим вводити 50-100 г препарату зі швидкістю, яка забезпечує рівень діурезу не менше 30-50 мл/год

Повторно Маніт вводять тільки під контролем водно-сольового балансу; щоб запобігти дегідратації, необхідно вводити в організм рідину.

При операціях із екстракорпоральним кровообігом в апарат безпосередньо перед початком перфузії вводять 20 – 40 г маніту.

В 100 мл маніта міститься 15 г манітолу[82].

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

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

Для забезпечення хворих осмотичним діуретиком Маніт необхідно 49 600 440 г манітолу в рік.

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

Зі статті [83] було виявлено, що *Lactobacillus brevis* 3-A5 ефективно виробляє маніт, регулюючи рН під час періодичного бродіння та ферментації з підживленням. Це подвійне етапне бродіння з підживленням з

контрольованим рН збільшило виробництво маніту до 215 г/л після 98 годин бродіння, що було на 109% вище, ніж виробництво без контролю рН. Вміст сухих речовин в готовому продукті $СР_{ГП}$ складає частку 0,95.

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

$$T_{ЦФ} = T_{Ф} + T_{ПО} = 98 + 10 = 108 \text{ год},$$

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

K_1 – коефіцієнт запасу (втрати культуральної рідини або посівного матеріалу від нестерильних операцій 1,1 – 1,5) приймемо $K_1 = 1,1$. Сумарні втрати при виділенні готового продукту (сума всіх втрат на стадіях виділення готового продукту), частка $E_{СВ} = 0,15$.

Мінімально можлива кількість робочих днів, які можуть бути використані для виробництва продукції, становить 30 днів, максимальна – 330 днів. Приймаємо кількість робочих днів 320 ($T_{РД}$). Інші дні у році використовуємо для технічної діагностики обладнання, а також для продовження синтезу ферменту, лише для використання у якості біологічної добавки або як (inbulk).

При кількості робочих днів - 320, кількість продукту на добу ($G_{НТД}$) становитиме:

$$G_{НТД} = \frac{G_{НТ}}{T_{РД}} = \frac{49\,600\,440}{320} = 155\,002 \text{ г/добу}$$

Кількість продукту на добу з урахуванням втрат за виробничий цикл ($E_{В} = 15\%$):

$$G_{ПД} = \frac{G_{НТД}}{1 - E_{СВ}} = \frac{155\,002}{1 - 0,15} = 182\,356 \text{ г/добу}$$

Кількість біомаси за цикл:

$$G_{\text{цк}} = \frac{G_{\text{пд}} \times T_{\text{цф}}}{24} = \frac{182\,356 \times 108}{24} = 820\,602 \text{ г/цикл}$$

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

$$V_{\text{кр}} = \frac{K_1 \times G_{\text{цк}} \times \text{CP}_{\text{ГП}}}{P_{\text{кр}}} = \frac{1,1 \times 820\,602 \times 0,95}{215} = 3989 \text{ л/цикл}$$

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

Визначаємо кількість ферментацій (циклів) на рік:

$$K_{\text{ц}} = \frac{G_{\text{нт}}}{G_{\text{цк}}} = \frac{49\,600\,440}{820\,602} = 60,4 \text{ циклів}$$

Приймаємо 61 цикл.

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

$$V_{\text{ф}} = \frac{V_{\text{кр}}}{1 - E_{\text{ф}}} = \frac{3989}{1 - 0,01} = 4030 \text{ л}$$

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

$$V_{\text{Гф}} = \frac{V_{\text{ф}}}{K_{\text{зф}}} = \frac{4030}{0,6} = 6715,5 \text{ л}$$

Знаходимо найближчий за номінальним об'ємом ферментер $V_{\text{Нф}} = 7000$ л. Уточнюємо коефіцієнт заповнення ферментера:

$$K_{\text{зф}} = \frac{V_{\text{ф}}}{V_{\text{Нф}}} = \frac{4030}{7000} = 0,58$$

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

3.4.1.1. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері з робочим об'ємом $V_{\text{ф}} = 4030$ л. Найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{Нф}} = 7000$ л.

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить 5% від об'єму поживного середовища [88].

Тоді кількість поживного середовища в ферментері буде становити:

$$V_{\text{пс}} = \frac{V_{\text{ф}}}{1 + X_{\text{ф}}} = \frac{4030}{1 + 0,05} = 3838 \text{ л}$$

де $X_{\text{ф}}$ – доза посівного матеріалу для ферментера (0,05).

Кількість посівного матеріалу становить

$$V_{\text{пмф}} = V_{\text{ф}} - V_{\text{пс}} = 4030 - 3838 = 192 \text{ л.}$$

Таку кількість інокуляту можна одержати культивуванням у бункерах. Для цього використовують бункери об'ємом $V_{\text{бунк}} = 350 \text{ л}$ та коефіцієнтом заповнення $K_{\text{зк}} = 0,6$.

Тоді кількість бункерів для отримання посівного матеріалу становитиме

$$N_{\text{колб}} = \frac{V_{\text{пм2}}}{V_{\text{колб}} \times K_{\text{зк}}} = \frac{192}{500 \times 0,6} = 0,64$$

Таким чином, для одержання посівного матеріалу необхідно 1 бункер.

Процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого мікробного синтезу підсолоджувача - манітолу у ферментері об'ємом 5000 л з коефіцієнтом заповнення 0,6 буде проходити у 2 етапи.

РОЗДІЛ 4. ПІДБІР ТЕХНОЛОГІЧНОГО ОБЛАДНАННЯ З ВРАХУВАННЯМ МАТЕРІАЛЬНИХ ПОТОКІВ ПО СТАДІЯХ ОТРИМАННЯ СУБСТАНЦІЇ

1. Стадія відокремлення біомаси.

Після процесу біосинтезу отримана культуральна рідина складається із залишків компонентів поживного середовища, метаболітів та біомаси молочнокислих бактерій. Для відокремлення біомаси на сьогоднішній день застосовуються такі методи:

- фільтрація;
- флотація;
- центрифугування;
- сепарація.

Фільтрування – це процес відділення твердої фази від рідкої шляхом проходження суспензії через фільтруючий матеріал або через полімерну сітку з відповідним діаметром отворів.

Принципова схема роботи фільтру проста: суспензія потрапляє на фільтруючу перегородку, при цьому рідка фаза проходить фільтруючий матеріал, а тверда фаза затримується на фільтруючому матеріалі у вигляді шару осаду. Для фільтрування використовують фільтр-преси різної конструкції: барабанні вакуум фільтри, стрічкові фільтр-преси, та інші конструкції.

Процес фільтрування є менш енергоємний, проте одночасно і менш ефективний порівняно з іншими методами.

Недоліки процесу фільтрування полягають у великих втратах біомаси за рахунок проходження частини клітин через пори фільтруючого матеріалу, через що пори засмічуються та потребують заміни чи

					НУХТ БТЕК 02.02.08 КР ПЗ			
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дат</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Чумак С.Ю.</i>			<i>Розділ 4. Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних</i>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрюшів</i>
<i>Перевір.</i>		<i>Старовойтов</i>					53	18
<i>Консультант</i>						55		
<i>Н. Контр.</i>						Кафедра БТМ		
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков</i>						

регенерації [103].

Флотація – виділення з рідких середовищ твердих часток або часток іншої рідини за допомогою продування крізь неї газу. Флотація заснована на прилипанні часток, які треба виділити до пухирців газу. Флотація поділяється на :

- механічну – у рідину занурюється пристрій, який дозволяє всмоктувати повітря з атмосфери за рахунок обертового руху рідини;
- пневматичну – продування повітря крізь дрібнопористі тканини;
- вакуумну – пухирці повітря утворюються з розчинених у воді газів при створенні розрідження;
- електролітичну – в камері флотатора розташовуються 2 електроди, в результаті електролізу води утворюються газова фаза і відбувається процес флотації.

Перевагами методу є його економічність, висока продуктивність і можливість використання в безперервних процесах.

Недоліком флотації являються низька ефективність відділення біомаси бактерій [104].

Центрифугування – процес зневоднення і розділення суспензій на рідку і тверду фази під дією відцентрових сил. Машини для здійснення таких операцій називаються центрифугами, які підрозділяються на фільтруючі), осаджувальні комбіновані (осаджувально-фільтруючі).

Метод центрифугування заснований на дії відцентрової сили на неоднорідної системи, що складається з двох та більше фаз. В промислових установках розділення під дією відцентрових сил застосовують для розділення часточок розміром від 0,5мкм до 25 мм. При розділенні суспензії у фільтруючих центрифугах в роторі під дією відцентрових сил відбувається фільтрація рідини через фільтрувальну тканину або через металеву сітку з одночасним затриманням твердої фази; рідка фаза проходить через сито і

потім через отвори в роторі викидається в кожух центрифуги, а осад відвантажується або під час обертання ротору, або після його зупинки.

Недоліки процесу центрифугування полягають в:

- меншій ефективності у порівнянні з сепаруванням[105].

Сепарація –процес відділення твердої фази від рідкої, оснований на відділенні часточок з різними характеристиками. Рушійною силою процесу являється відцентрова сила.

Ефективність сепарування пропорційна частоті обертів барабану, діаметру барабану, розміру часток, різниці густин твердої та рідкої фаз.

По технологічному призначенню сепаратори поділяються на такі типи:

- фільтруючі для розділення двох взаємно нерозчинних розчинів з одночасним виділенням твердої фази;
- осаджувальні для відділення твердої фази від рідкої;
- фільтруючо-саджувальні можуть налаштовуватися як фільтруючі або як очисні в залежності від положення ротору;
- згущуючі для підвищення концентрації зважених чи колоїдних компонентів суспензії з одночасним розділенням у випадку емульсії;
- розподільчі для розподілення зважених компонентів суспензії по розміру або густині часток [106, 107].

Переваги:

- висока ефективність відділення біомаси порівняно з фільтруванням та флотацією;
- можливість автоматизувати процес;
- більша ефективність порівняно з центрифугуванням.

Отже, проаналізувавши всі способи відокремлення біомаси від культуральної рідини доцільним буде обрати метод сепарування. За його

використання ефективність відділення біомаси найвища, а також є можливість автоматизувати процес.

Для проведення процесу відокремлення біомаси від культуральної рідини обираємо сепаратор Clara 20 компанії «AlfaLavalGroup» (Польща) (рис. 4.1).



Рис. 4.1. Загальний вигляд сепаратора Clara 20 [108].

Технічні характеристики:

- ✓ Пропускна здатність, низький/високий потік – макс. 1 м³/год / 4 м³/год;
- ✓ Частота обертів - 9512 об/хв;
- ✓ Відцентрова сила, всередині чаші - макс. 11,130 г;
- ✓ Об'єм чаші для рідини - 2.2 л;
- ✓ Об'єм простору для шламу – прибіл. 1.1 л;
- ✓ Встановлена потужність двигуна - 3,7 кВт [108].

2. Стадія концентрування супернатанту.

Після процесу відділення біомаси від культуральної рідини, утворений супернатант, що містить манітол, піддається концентруванню.

Для проведення процесу концентрування на сьогодні застосовують наступні методи:

- мембранне розділення:
 - ультрафільтрація;
 - мікрофільтрація;
- випарювання.

До мембранних процесів розділення розчинів відносять зворотний осмос, ультрафільтрацію, мікрофільтрацію, діаліз, електродіаліз. Ці процеси одночасно очищують та концентрують розчин. Ступінь концентрування від 50 % до 250 % сухих речовин. Мембранні установки прості, невеликі за габаритами, економічні та легко автоматизуються. При ультрафільтрації затримуються молекули розмірами 5-50 нм, зворотного осмосу - 2-5 нм [109].

Ультрафільтрацією називають процес очищення та концентрування розчинів високомолекулярних з'єднань (наприклад, ферментів) з одночасним очищенням їх від низькомолекулярних домішок шляхом пропускання розчину через мембрану з порами розміром від 0,01 до 0,1 мкм. На відміну від мікрофільтрації або звичайної фільтрації при ультрафільтрації затримуються окремі молекули розчиненої високомолекулярної речовини; при ультрафільтрації відбувається не розділення фаз, а перерозподіл розчинених в рідкій фазі речовин. Тим часом проблема забивання пор фільтруючого матеріалу, характерна для звичайної фільтрації, має не менше, а можливо, і більше значення.

Важливою характеристикою будь-якої ультрафільтраційної мембрани є її селективність, що визначає ступінь затримання розчиненої речовини.

Селективність мембрани залежить від розмірів і форми молекул розчиненої речовини. Слід мати на увазі, що практично у всіх випадках існують молекули, що затримуються мембраною лише частково.

Мікрофільтрація - це процес, близький до звичайної фільтрації. Мікрофільтрація через пористі мембрани з діаметром пір від 0,1 до 10 мкм застосовується для відділення дрібних частинок твердої фази, зокрема мікроорганізмів (в цьому випадку її називають стерилізуючою фільтрацією). Завдяки великому числу пір на одиниці поверхні мембрани (кількість пір досягає 70—80% загального об'єму мембрани) процес мікрофільтрації протікає з достатньо високою швидкістю. Процес мікрофільтрації зазвичай ведуть при різниці тиску 0,1—0,2 МПа [110].

Недоліки мембранного методів концентрування: ретельна підготовка та очищення розчину, виникнення концентраційної поляризації— підвищення концентрації розчиненої речовини біля поверхні мембрани та утворення значної кількості пермеатів, що вимагають очищення перед скиданням у каналізацію [109].

Випарювання – процес утворення парової фази, який відбувається в усій масі рідини і, головним чином, на межі між паровою бульбашкою і рідиною. Випарювання настає при температурі кипіння, при якій тиск насиченої пари рідини дорівнює зовнішньому тиску. Процес пароутворення до настання моменту кипіння називають випаровуванням.

Випарювання є тепловим процесом і його використовують для зневоднення розчинів, суспензій з метою концентрації твердої фази або розчиненої речовини. Процес випарювання проводять у випарних апаратах різної конструкції.

У мікробіологічній промисловості найбільш широко використовуються процеси випарювання у вакуумних установках (апаратах) як найбільш економічний спосіб попереднього концентрування продуктів. Для кожного продукту біосинтезу, що концентрується, час перебування у випарному апараті при відповідній температурі визначається дослідним шляхом. На підставі дослідних даних вибирається відповідна конструкція випарного апарата, що забезпечує оптимальний час перебування середовища в апараті при заданій продуктивності при мінімальних витратах енергії [109, 110].

Отже, з метою концентрування супернатанту обрано метод випарювання, адже, по-перше, даний метод є найбільш економічнішим, що в свою чергу кардинально не вплине на собівартість готового продукту, по-друге, культуральна рідина не потребує додаткової підготовки перед процесом концентрування.

Для проведення процесу концентрування обираємо вакуум-випарну установку фірми НПП "Агрофермтехника" (Україна) (рис. 4.2). Установка за погодженням може бути одно-, дво- і трьохкорпусною. Забезпечені системою управління з автоматичним рефрактометром. У комплект поставки входять барометричний конденсатор і система оборотного водопостачання [111].



Рис. 4.2. Загальний вигляд вакуум-випарної установки.

3. Стадія кристалізації манітолу.

При виділенні продуктів мікробного синтезу з нативного розчину в промислових умовах вибір методів обмежений і визначається фізико-хімічними властивостями цих продуктів.

Одне з провідних місць в технології виділення речовин з нативних розчинів займають процеси екстрагування. Екстракція — процес добування однієї або кількох речовин (компонентів) зі складних систем (рідких або твердих) селективним розчинником, який називається екстрагентом. Розчинник, рН середовища, співвідношення фаз і інші умови підбирають так, щоб концентрувати цільовий продукт не менше чим в 2—5 разів, а також забезпечити високу вибірковість процесу [112].

Іонообмінна сорбція являє собою обмін катіонів або аніонів між сорбентом і розчином. Іонообмінну сорбцію доцільно застосовувати для виділення продуктів біосинтезу лише при чималій обмінній місткості сорбенту по цільовому продукту (близько 10 мг-екв на 1 г сорбенту) [113].

Метод осадження або кристалізації з нативних розчинів застосовується для виділення речовин, здатних утворювати з деякими реагентами нерозчинні з'єднання або кристалізуватися за певних умов з водного середовища. Кристалізація — процес виділення твердої фази у вигляді кристалів, головним чином з розчинів і розплавів. Для того щоб кристалізація проходила із заданою швидкістю, систему необхідно значно переохолоджувати або перенасичувати розчиною речовиною. У такій системі протягом деякого періоду (інкубаційного або індукційного) не виникає помітних змін, але формуються центри (зародки) кристалізації. Після досягнення зародками критичних розмірів (критичний радіус, $r_{кр} = 0,5-5$ нм) починається спонтанний ріст кристалів, у результаті якого виникають кристали різного розміру, форми та дефектності. На наступній стадії малі кристали розчиняються, а великі зростають (Освальдове дозрівання), форма кристалів наближається до рівноважної, а нерівноважні дефекти, які збільшують енергію Гіббса кристалічної системи, ліквідуються [114].

Отже, для виділення манітолу з супернатанту обрано метод кристалізації, адже за визначених умов манітол здатний кристалізуватись з водного середовища (супернатанту), а також за використання даного методу виключається застосування дороговартісних та, в більшості випадків,

шкідливих для навколишнього середовища екстрагентів. У дослідженні [115] кристалізація манітолу відбувалась за рахунок лінійного знижування температури від 35°C до 5°C протягом 15 годин, що і буде використано у проєктованому виробництві.

Кристалізатор обрано з дослідження [115], який складався із закритої вертикальної змішувальної ємності з нержавіючої сталі з водяною сорочкою для контролю температури. Максимальний об'єм посудини становив 25 л, а перемішування було встановлено на 3 об/хв за допомогою зовнішнього контролера (OPM2, Siemens, Німеччина). Похилі дискові робочі колеса були приєднані до змішувального валу на трьох різних рівнях. Водяна сорочка була підключена до кріостата K40 (Haake, Німеччина), який отримував сигнал температури від зонда, розташованого всередині реактора. Цей кріостат контролювався ПК із програмним забезпеченням ThermStar 95 plus (версія 2.0, Haake, Німеччина).

4. Стадія відокремлення кристалів манітолу від маткового розчину.

У результаті процесу кристалізації утворюються кристали манітолу та матковий розчин, від якого необхідно позбутись.

Для відділення кристалів манітолу може бути застосоване:

- ✓ фільтрування;
- ✓ центрифугування.

Фільтрування—процес розділення з допомогою пористої перегородки, здатної пропускати рідину або газ, але затримувати завислі в середовищі тверді частинки. Воно здійснюється під дією сил тиску або відцентрових сил і застосовується для більш тонкого розділення суспензій і пилу, ніж шляхом осадження.

Фільтрування з утворенням осаду найбільш поширене. У більшості випадків тверді частинки в початкові моменти з початку фільтрування проходять через пори фільтрувальної перегородки, але скоро накопичуються на ній, і через фільтр починає протікати тільки освітлена рідина—фільтрат.

Таким чином, у цьому процесі утворений шар осаду грає роль основного фільтруючого середовища.

Для фільтрування можуть бути застосовані:

- нутч-фільтри (закритого та відкритого типу);
- стрічкові вакуум-фільтри.

Перевагами застосування даного обладнання є:

- ✓ можливість ретельної промивки осадів, легкість захисту від корозії, простота і надійність конструкції (відкритий нутч-фільтр);
- ✓ значна швидкість фільтрування, можливість розділення важко фільтруючих осадів, можна розділяти суспензії, які виділяють вогнебезпечні або токсичні пари (закритий нутч-фільтр);
- ✓ співпадання напрямків фільтрування і осадження, простота конструкції, зокрема відсутність розподільчої головки, добре розділення фільтрату і промивних вод, достатня промивка і зневоднення осаду, можливість обробки важко фільтруючих матеріалів дякуючи досконалому способу знімання осаду і регенерації тканини (стрічкові вакуум-фільтри).

Недоліками застосування даного обладнання є:

- ✓ мала швидкість фільтрування, громіздкість установки, ручна вигрузка осаду (відкритий нутч-фільтр);
- ✓ обмежена продуктивність, обумовлена тим, що виготовлення їх з великою фільтруючою поверхнею утруднене, оскільки апарати працюють під надлишковим тиском, громіздкість установки, ручна вигрузка осаду (закритий нутч-фільтр);
- ✓ невелика поверхня фільтрування і неповне використання фільтрувальної тканини, велика виробнича площа, яку займає фільтр, зношування стрічки (стрічкові вакуум-фільтри).

Проаналізувавши інформацію видно, що спільними недоліками установок, що застосовують метод фільтрації, є громіздкість обладнання та мала продуктивність.

Центрифугування—процес розділення суспензій і емульсій в полі відцентрових сил. Під дією цих сил осадження поєднується з ущільненням утвореного осаду, а фільтрування—з ущільненням і механічною сушкою осаду.

Розрізняють наступні процеси розділення суспензій в центрифугах: відцентрове фільтрування та відцентрове відстоювання.

Відцентрове фільтрування представляє собою процес розділення суспензій в центрифугах з дірчастими барабанами. Внутрішня поверхня такого барабану покрита фільтрувальною тканиною. Суспензія відцентровою силою відкидається до стінок барабану, при цьому тверда фаза залишається на поверхні тканини, а рідина під дією відцентрової сили проходить через шар осаду і тканини і видаляється назовні через отвори у барабані.

При допомозі відцентрового фільтрування може досягатися висока степінь зневоднення осаду.

Відцентрове відстоювання представляє собою процес розділення суспензій в центрифугах, які мають барабан з суцільними стінками. Суспензія вводиться в нижню частину барабану і під дією відцентрової сили відкидається до стінок. Безпосередньо біля стінок утворюється шар осаду, а рідина утворює внутрішній шар і витісняється з барабану поступаючою на розділення суспензією. Піднімаючись вгору, рідина переливається через край барабану і видаляється назовні.

Відцентрове освітлення також проводиться в суцільних барабанах і служить для очистки рідин, які містять незначну кількість твердої фази. Цей процес застосовується для розділення тонких суспензій і колоїдних розчинів.

Головна перевага використання центрифуг - висока продуктивність і компактність обладнання [116].

Отже, виходячи з вище представленої інформації, доцільно для процесу відділення кристалів від маткового розчину використати саме центрифугування. Вибір пояснюється тим, що загалом центрифуги

характеризуються високою продуктивністю та ефективністю розділення, а також компактністю обладнання.

У виробництві планується використовувати саме горизонтальну центрифугу зі шнековим вивантаженням Alfa Laval Foodec 100 виробництва компанії «Alfa Laval» (Польща) (рис. 4.3) [117], адже вони вважаються найбільш досконалими по конструкції, та призначені для розділення суспензій з об'ємною концентрацією твердої фази від 5 до 75% і розмірами часток від 5 до 500 мкм.

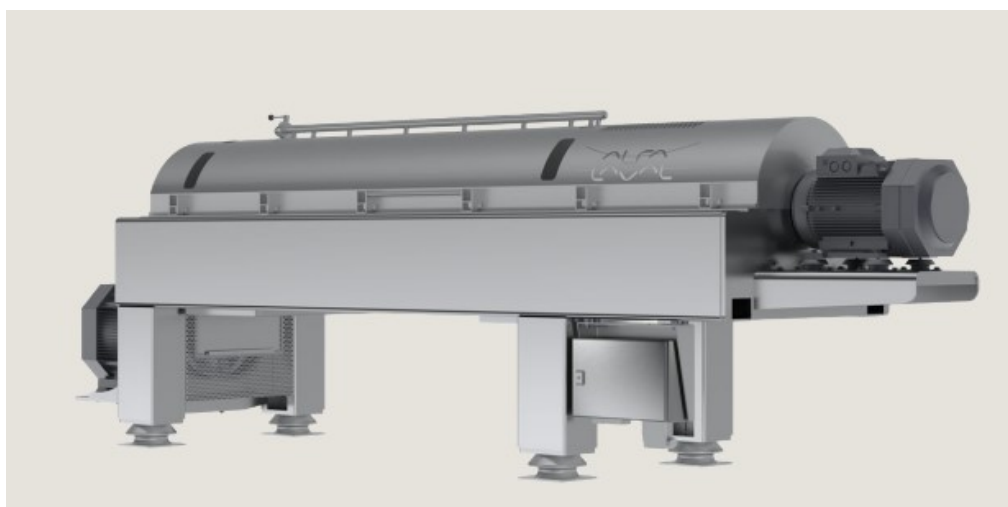


Рис. 4.3. Загальний вигляд центрифуги Alfa Laval Foodec 100.

Технічні характеристики [117]:

- ✓ Діаметр чаші: 200 мм;
- ✓ Швидкість чаші (максимальна): 5300 об/хв;
- ✓ Вага: 375 кг;
- ✓ Довжина: 2150 мм;
- ✓ Ширина: 580 мм;
- ✓ Висота: 762 мм.

5. Стадія сушіння кристалів манітолу.

Отримані на попередньому етапі кристали манітолу далі піддаються процесу сушіння.

Процес сушіння кристалів манітолу може здійснюватись у:

- ✓ розпилувальній сушарці;
- ✓ вакуумній сушарці;
- ✓ сушарці з псевдорозрідженим шаром.

Сушіння за допомогою розпилувальної сушарки – це достатньо швидкий метод сушіння, за допомогою якого можна отримати сухі частинки порошку з бажаними властивостями, такими як хороша текучість, питомий вміст залишкової вологи та рівномірний розподіл форми та розміру. Цей процес можна розділити на чотири етапи. По-перше, рідкий продукт за допомогою механічних форсунок або дисків диспергується на дрібні краплі. Потім дрібні краплі стикаються з нагрітим газом в сушильній камері. Третя фаза процесу сушіння розпиленням включає висушування крапель та утворення частинок. Після цього тверді частинки відокремлюються від сушильного повітря. В основному важкі частинки відокремлюються внаслідок гравітаційної сили, а дрібні частинки – за допомогою циклонів [118].

Перевагами цього методу сушіння є швидкість, безперервність процесу, та відносна легкість організації.

Недоліком розпилувальної сушарки є її складність у будові за рахунок пилоуловлювачів, а також значна витрата електроенергії на її роботу.

Наступним способом висушування є вакуумна сушка. При її використанні зразки сушать шляхом випаровування рідини. Сушіння відбувається періодично, тобто у сушильну шафу на полиці закладають вологий матеріал, створюють вакуум, і починають обігрівання шафи парою через порожнини в плитах або електричним струмом. Процес закінчують коли матеріал матиме потрібну вологість, і після чого готовий сухий матеріал вивантажують [119].

Перевагами даного способу є сушіння матеріалів при невисоких температурах, як наслідок менша витрата тепла.

Недоліками є:

- 1) низька продуктивність;

- 2) необхідність застосування ручної праці;
- 3) витрата часу на завантаження й вивантаження матеріалу, наслідок – тривалість процесу.

У сушарці з киплячим шаром матеріал покладений на ґрати, через які продувається сушильний агент зі швидкістю, необхідною для створення киплячого шару.

Вологий матеріал шнековим живильником, подається в шар продукту, що «кипить» на газорозподільній решітці в апараті з киплячим шаром. Атмосферне повітря подається газодувкою в калорифер, де нагрівається за рахунок конденсації гріючої пари до визначеної температури, а потім поступає під решітку. Повітря виходить з великою швидкістю з отворів газорозподільної решітки. Нагріте повітря змушує перейти матеріал в псевдозріджений стан та висушує його. Сухий продукт безперервно вивантажується дозатором на стрічковий транспортер. Відпрацьоване повітря очищується в циклоні. Пил вивантажується з циклону та разом з сухим матеріалом, як готовий продукт, подається стрічковим транспортером на склад або на подальшу переробку.

Основною перевагою киплячого шару є збільшення поверхні контакту фаз і за рахунок цього - скорочення витрати палива. Тепловтрати від стінок в апаратах киплячого шару обмежені зоною киплячого шару, висота якої 1000-1500 мм, температура стінок в зоні дорівнює температурі киплячого шару. Завдяки теплоізоляції стінок втрати тепла в навколишнє середовище складають не більше 3-5%. Слід також відмітити, що максимальна одинична потужність установок киплячого шару в 1,2-1,5 разів більша, ніж в барабанних сушарках. До переваг установок киплячого шару слід також віднести суттєве зниження металоємності і вартості апаратів, зменшення виробничої площі, простота автоматизації та регулювання [120].

Отже, проаналізувавши переваги та недоліки різних методів сушіння та відповідних їм типів сушарок, обрано сушарки з псевдорозрідженим станом адже вони забезпечують інтенсивне сушіння термолабільних продуктів при

високих температурах за рахунок короткочасного зіткнення продукту з сушильним агентом, та характеризуються високим ступенем використання тепла сушильного агента. Позитивним в її конструкції є можливість автоматичного регулювання параметрів процесу.

На виробництві буде використовуватись горизонтальна вібраційна сушарка з псевдозрідженим шаром виробництва компанії «Griffin Machinery» (Китай) (рис. 4.4) [121].

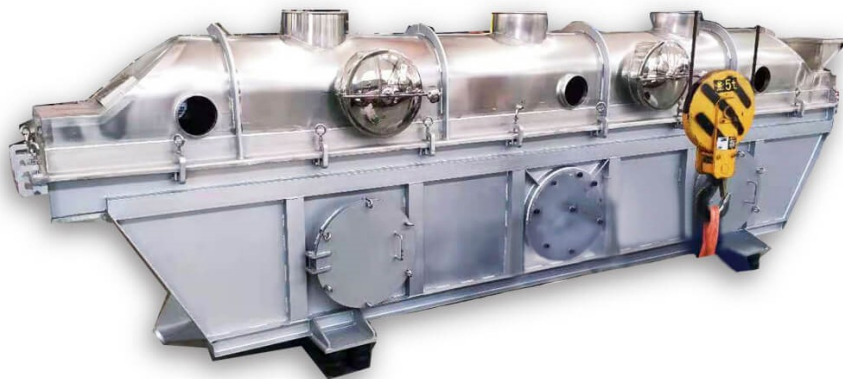


Рис. 4.4. Загальний вигляд горизонтальної вібраційної сушарки з псевдозрідженим шаром.

Технічні характеристики (модель ZLG4.5×0.3):

- ✓ Площа псевдозрідженого шару (м²) – 1,35;
- ✓ Температура повітря на вході (°C) – 70-140;
- ✓ Температура повітря на виході (°C) – 40-70;
- ✓ Суха міцність,(кг Н₂О/год) –45-75.

6. Стадія фасування, пакування та маркування субстанції манітолу.

При складанні програми для операцій з пакування особливу увагу слід приділити зведенню до мінімуму ризику перехресної контамінації, плутанини або підміни. Різну продукцію не слід пакувати в безпосередній близькості одна від одної, за винятком випадків, що передбачають фізичний розподіл.

Перед початком операцій з пакування мають бути вжиті заходи, які гарантують, що робоча зона, пакувальні лінії, друкарські машини й інше обладнання є чистими та вільними від будь-яких препаратів, матеріалів або документів, що раніше використовувалися, якщо вони не потрібні для запланованої операції. Очищення лінії слід здійснювати згідно з відповідним контрольним переліком.

Пакування, приготовлені для фасування, мають бути чистими. Необхідно приділити увагу запобіганню та усуненню будь-якої контамінації, такої як осколки скла та шматочки металу [122].

Наступний рівень гігієни містить у собі технологію Ultraclean, оснащений ламінарним потоком для запобігання забрудненню продукту шляхом відокремлення блоку дозування та формування від навколишнього середовища. Гігієнічна пропозиція поширюється також і на упаковку: лампи для захисту від забруднення та для стерилізації забезпечують найвищий гігієнічний рівень упаковки [123].



Рис. 4.5. Пакувальне обладнання компанії «Universal Pack»

Обґрунтування вибору товарної форми випуску продукту мікробного синтезу (упаковки). Основне призначення упаковки при здійсненні торгових контрактів, в тому числі і міжнародних - запобігання пошкодженню товару

при транспортуванні. Крім того, вона повинна створювати оптимальні одиниці для складування, транспортування, завантаження і розвантаження товарів.

Вид упаковки визначається в першу чергу характером матеріалу, який в неї поміщений, зовнішніми впливами, яким може бути підданий матеріал, а також часом, протягом якого товар повинен перебувати в упаковці. Очевидно, що останні чинники залежать від шляху перевезення і застосовуваних транспортних і вантажно-розвантажувальних засобів [124].

Зважаючи на те, що манітол відноситься до гігроскопічної сировини, необхідною умовою при виборі упаковки є забезпечення герметичності з метою запобігання потрапляння вологи [125].

Для субстанції манітолу може бути застосована наступна тара:

- ящики;
- мішки;
- бочки.

Ящики - закрита з усіх боків транспортна тара з корпусом, що має в перетині, паралельному дну, переважно форму прямокутника, з дном, двома торцевими і боковими стінками, з кришкою або без неї, виготовлена з дощок, фанери, пластмаси, металу або комбінації пакувальних матеріалів.

Мішки економічно доцільні при транспортуванні насипних вантажів. Їх головна перевага полягає в порівняно малій масі в порівнянні з вмістом і пов'язана з гнучкістю, зручністю заповнення і вивантаження, мінімально необхідними габаритами для зберігання і малою собівартістю виготовлення.

Основні марки мішків, які наразі випускаються [124]:

- ✓ НМ (Непросочені мішки з усіма шарами з непросоченого мішкового паперу);
- ✓ БМ (Бітумовані мішки з двома або трьома шарами бітумованого мішкового паперу і іншими шарами з непросоченого мішкового паперу);

- ✓ БМП (Комбіновані мішки з одним шаром бітумованого мішкового паперу, одним шаром з ламінованого мішкового паперу і іншими шарами з непросоченого мішкового паперу).

Бочки придатні для різних вантажів. Наприклад, в таку тару можна поміщати рідини різної в'язкості, порошки, або зернисті хімічні речовини. Бочки забезпечують хороший захист вантажів, їх широко застосовують для перевезення горючих та корозійних вантажів. Дана тара захищає вантаж від розпорошення і проникнення вологи і може бути стійкою по відношенню до водяної пари, створює перешкоду для розкрадань вантажів [124].

Отже, у ролі упаковки для зберігання та транспортування субстанції манітолу обрано мішки, так як вони, у порівнянні з ящиками та бочками, мають меншу вартість, характеризуються зручністю заповнення і вивантаження та мінімально необхідними габаритами для зберігання. Обраною маркою є БМП (об'ємом 50 кг), адже дана марка мішків використовується саме для пакування гігроскопічної сировини.

РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ (ЕТАПИ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИСТКИ СУБСТАНЦІЇ)

Специфікація обладнання, зображеного на апаратурній схемі, наведена в табл. 5.1.

Таблиця 5.1

Специфікація ділянки допоміжних робіт, виділення та очищення манітолу

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
1	2	3	4
3-1	Збірник для культуральної рідини	1	<p>Реактор об'ємом 5 м³ фірми «Промвіт» (Україна).</p> <p>Корпус реактора, являє собою вертикальну циліндричну ємність з псевдоеліптичним днищем і кришкою. Поточна температура в корпусі реактора, виводяться на дисплей терморегулятора в цифровому вигляді.</p> <p>Мішалка має регулятор для плавної зміни швидкості обертів обертання мішалки за допомогою частотного інвертора. Швидкість перемішування 50 об/хв [1].</p>
Н-2, Н-5, Н-7	Насос відцентровий	1	<p>Відцентровий насос DAB KPF 30/16 M (Україна).</p> <p>Потужність двигуна – 0,370 кВт; Продуктивність – 2,16 м³/год; Висота подачі – 32,5 м [2].</p>
С-3	Сепаратор	1	<p>Сепаратор Clara 20 компанії «AlfaLavalGroup» (Польща).</p> <p>Технічні характеристики:</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Пропускна здатність, низький/високий потік – макс. 1 м³/год / 4 м³/год; ✓ Частота обертів - 9512 об/хв; ✓ Об'єм чаші для рідини - 2.2 л; ✓ Об'єм простору для шламу – прибіл. 1.1 л; ✓ Встановлена потужність двигуна - 3,7 кВт [3].

					НУХТ БТЕК 02.02.08 КР ПЗ		
Змн.	Арк.	№ документа	Підпис	Дат			
Розроб.		Чумак С.Ю.			Літ.	Арк.	Акронів
Перевір.		Старовойтов				71	3
Консультант					73		
Н. Контр.					Кафедра БТМ		
Затверд.		Стабніков					
Розділ 5. Специфікація обладнання (етапи виділення та очистки)							

ВВУ-4	Вакуум-випарна установка	1	Вакуум-випарна установка фірми НПП "Агрофермтехника" (Україна). Установка за погодженням може бути одно-, дво- і трьохкорпусною. Забезпечені системою управління з автоматичним рефрактометром. У комплект поставки входять барометричний конденсатор і система оборотного водопостачання [4].
К-6	Кристалізатор	1	Кристалізатор обрано з дослідження [13], який складався із закритої вертикальної змішувальної ємності з нержавіючої сталі з водяною сорочкою для контролю температури. Максимальний об'єм посудини становив 25 л, а перемішування було встановлено на 3 об/хв за допомогою зовнішнього контролера (OPM2, Siemens, Німеччина). Похилі дискові робочі колеса були приєднані до змішувального валу на трьох різних рівнях. Водяна сорочка була підключена до кріостата К40 (Haake, Німеччина), який отримував сигнал температури від зонда, розташованого всередині реактора. Цей кріостат контролювався ПК із програмним забезпеченням ThermStar 95 plus (версія 2.0, Haake, Німеччина).
Ц-8	Центрифуга	1	<p>Горизонтальна центрифуга зі шнековим вивантаженням Alfa Laval Foodec 100 виробництва компанії «Alfa Laval» (Польща).</p> <p>Технічні характеристики:</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Діаметр чаші: 200 мм; ✓ Швидкість чаші (максимальна): 5300 об/хв; ✓ Вага: 375 кг; ✓ Довжина: 2150 мм; ✓ Ширина: 580 мм; ✓ Висота: 762 мм [5].

Закінчення табл. 5.1

С-9	Сушарка з псевдозрідженим шаром	1	<p>Горизонтальна вібраційна сушарка з псевдозрідженим шаром виробництва компанії «Griffin Machinery» (Китай).</p> <p>Технічні характеристики (модель ZLG4.5×0.3):</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Площа псевдозрідженого шару (м²) – 1,35; ✓ Температура повітря на вході (°С) – 70-140; ✓ Температура повітря на виході (°С) – 40-70; ✓ Суха міцність, (кг Н₂О/год) – 45-75 [6].
ФПМ-10	Фасувально-пакувальна машина	1	<p>Фасувальний автомат з ваговим дозатором АФ-50 (8) -В. Автомат фасувально-пакувальний, з стрічковим (вібраційним) ваговим дозатором, призначений для створення автоматичного процесу фасування (дозування) харчових і нехарчових сипучих продуктів, і упаковки їх в полімерні упаковки, що формуються пакувальним автоматом з рулонної плівки, в формі великої «подушки» або «стоячого пакета» [7].</p>

Примітка:

1. <https://promvit.com.ua/> (Збірник для культуральної рідини);
2. <https://ovk.ua> (Відцентровий насос);
3. <https://www.alfalaval.com> (Сепаратор);
4. <https://prom.ua/> (Вакуум-випарна установка);
5. <https://www.alfalaval.com>(Центрифуга);
6. <https://www.griffinmachinery.com>(Сушарка з псевдозрідженим шаром);
7. <https://promoboz.com> (Фасувально-пакувальна машина).

РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНОГО ВИДІЛЕННЯ І ОЧИЩЕННЯ СУБСТАНЦІЇ ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ ЛЗ

Технологічна схема виділення та очищення манітолу включає наступні технологічні процеси: відокремлення біомаси, концентрування супернатанту, кристалізації манітолу, стадія відокремлення кристалів манітолу від маткового розчину, сушіння кристалів манітолу, а також фасування, пакування та маркування субстанції манітолу.

Технологічну схему виділення та очищення наведено у графічній частині проекту.

ТП 1. Відділення біомаси.

ТП 1.1. Сепарування культуральної рідини.

Отримана на попередніх етапах виробництва культуральна рідина по трубопроводах направляється за допомогою насосу (дана позиція зображена на апаратурній схемі доферментаційних етапів виробництва) в попередньо простерилізований збірник (З-1) об'ємом 5 м³, де вона додатково охолоджується за рахунок подачі холодної води в сорочку збірника до кімнатної температури, адже після культивування її температура становить 37±1 °С. Зі збірника культуральна рідина за допомогою насосу (Н-2) направляється до сепаратора (С-3) для процесу її розділення на біомасу (відправляються на знешкодження) та супернатант, який містить манітол. Процес сепарування здійснюється за таких параметрів: швидкість обертання ротора 6000 об./хв, процес відділення триває протягом 30 хв, за температури 4°С. Отриманий супернатант направляється самоплином по трубопроводах до вакуум-випарної установки (ВВУ-4) для здійснення процесу концентрування.

ТП 2. Концентрування.

					НУХТ БТЕК 02.02.08 КР ПЗ		
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дат</i>			
<i>Розроб.</i>		Чумак С.Ю.			<i>Літ.</i>	<i>Анк.</i>	<i>Активів</i>
<i>Перевір.</i>		Старовойтов				74	4
<i>Консультан</i>					76		
<i>Н. Контр.</i>					Кафедра БТМ		
<i>Затверд.</i>		Стабніков					

ТП 2.1. Випарювання супернатанту.

Отриманий на попередньому етапі супернатант по трубопроводах направляється самоплином до вакуум-випарної установки (ВВУ-4) з метою її концентрування. Процес концентрування супернатанту здійснюється за таких параметрів: розчин подається в конус випарника зі швидкістю 0,7 л/хв, первинна і вторинна температури становлять 95°C і 61°C відповідно, а вторинний тиск становив 0,25 бар[115]. Концентрування відбувається до значення кінцевої концентрації в 392 г/л (при початковому 196 г/л, тобто в 2 рази). Далі отриманий сконцентрований супернатант направляється за допомогою насосу (Н-5) до кристалізатора, для здійснення процесу кристалізації (К-6).

ТП 3. Кристалізація.

ТП 3.1. Кристалізація манітолу.

Перенасичений розчин маніту (концентрація манітолу 392 г/л), температурою 35°C направляється за допомогою насосу (Н-5) до охолоджувального кристалізатора (К-6), для здійснення процесу кристалізації. Для того щоб кристалізація проходила із заданою швидкістю, систему необхідно поступово переохолоджувати. Для цього в кристалізаторі (К-6) температуру розчину лінійно знижують від 35 до 5°C протягом 15 годин [115]. Дана температура контролюється датчиками температури, яким оснащений кристалізатор. У такій системі протягом деякого періоду не виникає помітних змін, але формуються центри (зародки) кристалізації. Після досягнення зародками критичних розмірів (критичний радіус, $r_{кр} = 0,5-5$ нм) починається спонтанний ріст кристалів, у результаті якого виникають кристали різного розміру, форми та дефектності. Далі малі кристали розчиняються, а великі зростають (Освальдове дозрівання), форма кристалів наближається до рівноважної, а нерівноважні дефекти, які збільшують енергію Гіббса кристалічної системи, ліквідуються.

ТП 4. Відділення кристалів.

ТП 4.1. Відокремлення кристалів манітолу від маткового розчину.

Отриману на попередньому етапі суспензію, яка складається з кристалів манітолу та маткового розчину, відправляють за допомогою насосу (Н-7) по трубопроводу на розділення до горизонтальної центрифуги (Ц-8).

Сепарація відбувається по всій довжині циліндричної частини чаші, яка оснащена концентричним шнековим конвеєром. Продукт подається в чашу через нерухому вхідну трубу і плавно прискорюється зоною подачі на конвеєрі. Відцентрові сили викликають миттєве осідання твердих частинок на стінках чаші. Просвітлена рідина виходить із чаші, течучи природним шляхом під дією сили тяжіння, через регульовану водозливну перегородку (пластину) і потрапляє в корпус. Також доступний злив рідини під тиском (за допомогою різального диска), що дає змогу передавати рідину безпосередньо без будь-якого контакту з навколишнім середовищем.

Конвеєр обертається в тому ж напрямку всередині чаші, але з дещо іншою швидкістю. Цю різницю між чашею та конвеєром можна регулювати вручну або автоматично. Ця різниця у швидкості переміщує тверді тіла до кінцевого кінця, де вони піднімаються з рідини. Тверді речовини (в даному випадку кристали манітолу), які збираються у кінчній частині центрифуги, випускаються з машини через випускний отвір для твердих речовин, і за допомогою шнекового живильника направляються до обладнання для сушіння (С-8). Параметри проведення процесу: швидкість обертання - 1480 об./хв, процес відділення триває протягом 30 хв.

Отримана на даному етапі волога маса кристалів манітолу (значення вологості становить 30%) відправляється на етап сушіння.

ТП 5. Сушіння кристалів.

ТП 5.1. Сушіння кристалів манітолу в сушарці з псевдозрідженим шаром.

Волога маса, яка складається з кристалів манітолу проходить процес сушіння у сушарці з псевдозрідженим шаром (С-8).

Вологий матеріал шнековим живильником, подається в шар продукту, що «кипить» на газорозподільній решітці в апараті з киплячим шаром.

Атмосферне повітря подається газодувкою в калорифер, де нагрівається за рахунок конденсації граючої пари, а потім поступає під решітку. Повітря виходить з великою швидкістю з отворів газорозподільної решітки. Нагріте повітря змушує перейти матеріал в псевдозріджений стан та висушує його. Сухий продукт безперервно вивантажується дозатором на стрічковий транспортер. Відпрацьоване повітря очищується в циклоні. Параметри проведення процесу: температура повітря в сушарці становила 45°C, і потік повітря використовують на повній швидкості протягом 45 хвилин, кінцева вологість $W =$ до 5%, діаметр кристалів $d = 0.2 - 0.5$ мм.

Сухий матеріал (кристали манітолу) у кількості 781,8 кг (кількість за один цикл виробництва), подається стрічковим транспортером на наступний етап фасування, пакування та маркування.

ПМВ 6. Фасування та маркування субстанції манітолу.

ПМВ 6.1. Фасування та маркування субстанції манітолу в мішки.

Фасування та маркування субстанції манітолу у кількості 813,12 кг в упаковку (у виробництві використовуються мішки марки БМП об'ємом 50 кг) здійснюється автоматично за допомогою фасувально-пакувальної машини (ФМП-9). Вкладання наповнених та герметичного запакованих мішків з субстанцією манітолу на піддони для зручності подальшого переміщення здійснюється персоналом. У кінці процесу піддони з 16 мішками транспортують до складу.

ЗВ 7. Знешкодження відходів

ЗВ 7.1. Знешкодження рідких відходів

Матковий розчин від ТП 4.1 йде на очисні споруди.

ЗВ 7.2. Знешкодження газоподібних відходів

Відпрацьоване повітря від ТП 5.1, що надходить з сушарки відправляють у системи знешкодження повітряних відходів.

ЗВ 7.3. Знешкодження твердих відходів

Біомаса молочнокислих бактерій від ТП 1.1, що надходить з сепаратора відправляють у системи знешкодження твердих відходів.

РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА СУБСТАНЦІЇ ДЛЯ ЛЗ

Основні показники, які контролюються упродовж виробничого процесу виділення та очищення манітолу є:

- ✓ розмір кристалів манітолу;
- ✓ вміст вологи у кристалах манітолу;
- ✓ ідентифікація субстанції манітолу.

Визначення розмірів кристалів манітолу. Аналіз розміру кристалів манітолу визначали за допомогою аналізу зображень за допомогою PharmaVision System 830 (PVS 830) від Malvern Instruments. Тиск дисперсії частинок встановлювали на рівні 6 бар [126].

Для проведення аналізу відбирають пробу субстанції манітолу (кількість проби визначаються експериментально) та поміщають її на предметне скло обладнання PharmaVision System 830. Частинки у необробленому відеозображенні спочатку відокремлюються від фону (поріг), а потім алгоритм обладнання розділяє будь-які частинки, що торкаються (сегментація). Цей процес є автоматичним і виконується багато разів на секунду. Потім розмір зображень змінюється, і програмне забезпечення виконує прямі вимірювання попередньо визначених морфологічних параметрів (середній діаметр, еквівалентний діаметр кола, контур/площа, округлість, опуклість, довжина, максимальна довжина, ширина, об'єм, площа). Вони відображаються на екрані як гістограми в реальному часі як чисельні чи об'ємні розподіли. PharmaVision 830 зазвичай аналізує приблизно 20 000 частинок приблизно за 10 хвилин. Загальну кількість проаналізованих частинок визначає користувач [126].

					НУХТ БТЕК 02.02.08 КР ПЗ			
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дат.</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Чумаков С Ю</i>			Розділ 7. Контроль виробництва субстанції для ЛЗ	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрюшів</i>
<i>Перевір.</i>		<i>Старовойтов</i>					78	6
<i>Консультант</i>								80
<i>Н. Контр.</i>								Кафедра БТМ
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков</i>						

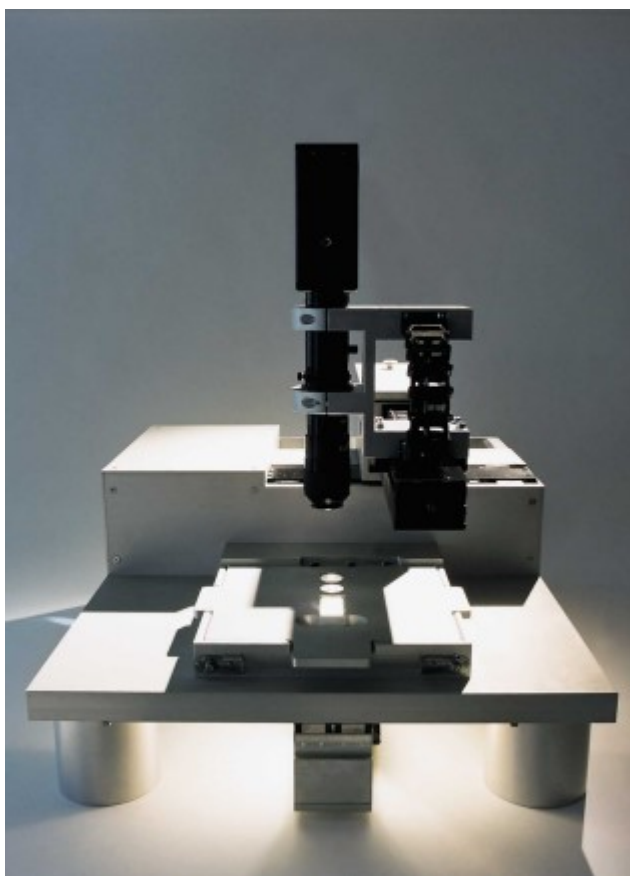


Рис. 7.1. PharmaVision 830.

Визначення вмісту вологи у субстанції манітолу. Визначення масової частки вологи проводять за використання приладу Чижової.

Для швидкого видалення вологи використовують сушіння в інфрачервоних променях, які сприймаються не тільки поверхнею, але й проникають в продукт на глибину до 2...3 мм, що зумовлює його інтенсивне прогрівання. Одним з джерел інфрачервоних променів можуть бути нагріті металеві поверхні, які дають опромінення в діапазоні довжин хвиль 0,76...343 нм. На цьому принципі працює прилад Чижової (рис. 7.2), що складається із двох масивних металевих плит (сплав алюмінію і чавуну) круглої форми, між якими розміщується тонкий шар матеріалу, що висушується. Плити з'єднані між собою шарніром і нагріваються електричними елементами, розміщеними зовні сторін приладу, що забезпечує швидке зневоднення продукту. Під час роботи відстань між плитами складає 2 мм, температура контролюється двома ртутними термометрами. Нагрівання плит може бути сильним і слабим. Сильне нагрівання використовується у

випадку першопочаткового нагрівання, а слабке – для підтримання необхідної температури (для перемикання режиму нагрівання є спеціальний перемикач). Контактний термометр забезпечує сталість заданої температури в межах $\pm 1^{\circ}\text{C}$ [127].

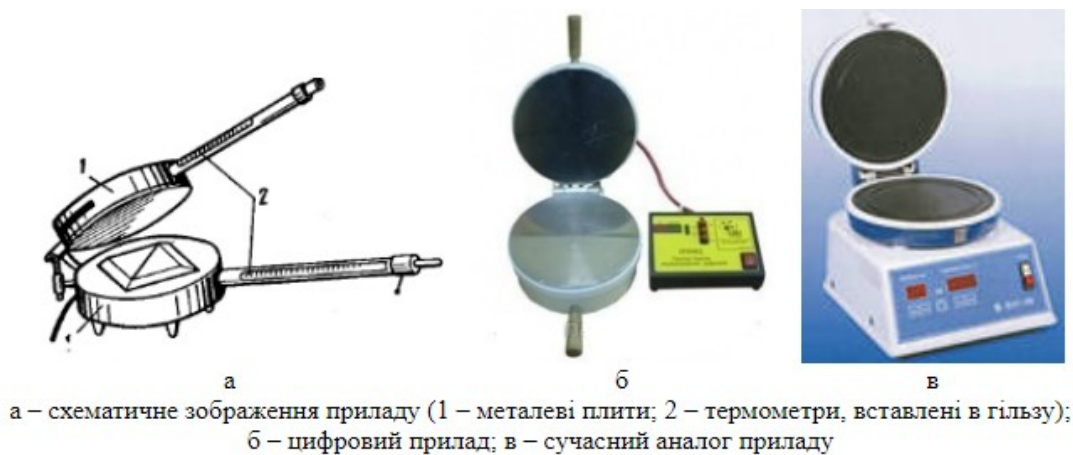


Рис. 7.2. Прилад Чижової

Висушують об'єкт в пакетах трикутної (для приладу круглої форми) або прямокутної форми (для приладу прямокутної форми). Для приладів Чижової старого зразку паперові пакети необхідно виготовити самостійно. Для виготовлення пакетів прямокутної форми лист паперу (газетного) форматом 20×14 згинають навпіл, а відкриті з трьох боків краї пакету загинають на 1,5 см (рис. 7.3). Розмір готових пакетів $8,5 \times 11$ см. Для виготовлення пакетів трикутної форми папір форматом 15×15 см згинають по діагоналі і відкриті краї загинають на 1,5 см [127].

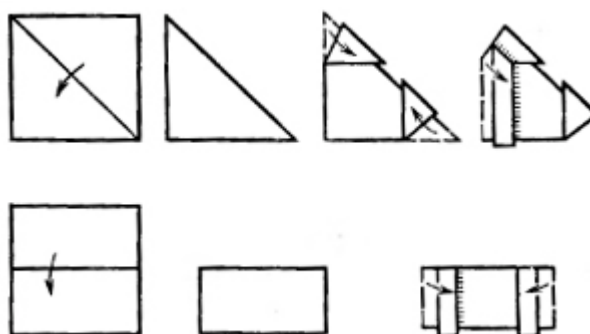


Рис. 7.3. Виготовлення паперових пакетів для приладу Чижової.

Для визначення масової частки вологи в продукті за допомогою експрес методу попередньо виготовляють 2 паперові пакети, які просушують у

приладі Чижової за температури 160 °С протягом 3 хв., охолоджують в ексикаторі 3 хв. та зважують. Далі їх розкривають та поміщають в них наважки субстанції манітолу (проводять два паралельних визначення). Пакети закривають та розміщують у приладі для висушування за температури 160 °С на 4 хв. Після висушування пакети охолоджують в ексикаторі, зважують і за різницею мас наважки до та після висушування розраховують масову частку вологи [127].

Ідентифікація субстанції манітолу. Суть методу полягає у визначенні манітолу методом газорідинної хроматографії з використанням тріс-н-бутилдиборонатних ефірів.

Обладнання. Використовується газовий хроматограф, оснащений полум'яно-іонізаційним детектором. Сигнал детектора подається на комп'ютер для пікової інтеграції та на реєстратор зі швидкістю діаграми 15 дюймів/год і повномасштабним відгуком 1 секунда. Зразки вводять 10-мкл шприцом.

Як газ-носій використовується гелій, а в детекторі – електролітичний водень і кисень. Нерухому фазу, 2% OV-17 на 80-100-mesh Chromosorb G5, заповнюють в колонки з боросилікатного скла, 1,22 м x 0,64 см.

Робочі умови. Колонка працює ізотермічно при 220°C з блоком детектора та портом ін'єкції при 240°C. Швидкість потоку гелію становила 55 мл/хв при вхідному тиску 40 psi. Діапазон електрометра становив 100 з ослабленням 8. Були зроблені ін'єкції зразків від 1 до 5 мл.

Як внутрішній стандарт використовують внутрішній стандарт-м-дифенілбензол, 2,5 мг/мл, у піридині.

Аналіз гекситолу. Розчини (2,5 мг/мл) еталонного стандартного манітолу готують в деіонізованій воді. Розчин зразка розбавляють об'ємно для забезпечення приблизно однакової концентрації. Аліквоти по 1,00 мл відбирають та доставляють піпеткою у флакон із кришкою, що загвинчується, і поміщають у вакуумний ексикатор над гранулами гідроксиду натрію або іншим відповідним осушувачем. Після ретельного

відкачування, щоб уникнути втрати зразка через бульбашки, зразки залишили в ексікаторі на ніч.

До висушених зразків додавали приблизно 10 мг н-бутилборної кислоти і рівно 1,00 мл розчину внутрішнього стандарту. Реакція завершується майже відразу, і порції по 1 мкл вводяться в колонку [128].

Далі наведена карта постадійного контролю (табл. 7.1).

Таблиця 7.1

Карта постадійного контролю виробництва субстанції манітолу

<i>Номер контрольної точки та назва стадії</i>	<i>Об'єкт контролю та показник, що визначається</i>	<i>Засоби та методи контролю</i>	<i>Періодичність перевірки та відбору проб</i>	<i>Нормативні значення показника</i>
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>
Кт 1.1 <i>Сепарування культуральної рідини</i>	Обладнання Тривалість сепарування, частота обертання ротора, температура процесу	Годинник, термометр технічний, технічний тахометр	Частота обертання, температура визначається безперервно під час сепарування	$\tau = 30$ хв, $t = 4^{\circ}\text{C}$, $n=6000$ об/хв
Кт, Кх 2.1 <i>Випарювання супернатанту</i>	Супернатант Температура, тиск, концентрація манітолу	Термометр, манометр, хроматографічний метод аналізу	Температура та тиск визначається безперервно під час процесу випарювання, концентрація манітолу вимірюється у кінці процесу	$t_1=95^{\circ}\text{C}$, $t_2 = 61^{\circ}\text{C}$, $P = 0,25$ бар, $C_{\text{маніт}} = 392$ г/л
Кт 3.1 <i>Кристалізація манітолу</i>	Сконцентрований супернатант Температура, час, частота обертання мішалки	Годинник, термометр технічний, технічний тахометр	Частота обертання, температура визначається безперервно під час кристалізації	$t_{\text{поч}}=35^{\circ}\text{C}$, $t_{\text{кінц}} = 5^{\circ}\text{C}$, $T = 15$ год, $n = 3$ об/хв

<p>Кт 4.1</p> <p><i>Відокремлення кристалів манітолу від маткового розчину</i></p>	<p>Обладнання</p> <p>Тривалість центрифугування, частота обертання ротора</p>	<p>Годинник, технічний тахометр</p>	<p>Частота обертання визначається безперервно під час центрифугування</p>	<p>$\tau = 30$ хв, $n=1480$ об/хв</p>
<p>Кт 5.1</p> <p><i>Сушіння кристалів манітолу в сушарці з псевдозрідженим шаром</i></p>	<p>Обладнання</p> <p>Тривалість сушіння, температура сушіння</p> <p>Кристали манітолу</p> <p>Вміст вологи, розмір кристалів</p>	<p>Годинник, термометр технічний</p> <p>Методи контролю кристалів манітолу</p>	<p>Температура визначається безперервно під час сушіння</p> <p>Контроль кристалів манітолу здійснюється у кінці процесу сушіння</p>	<p>$t= 45$ °С, $\tau = 45$ год, $W=$до 5%, $d = 0.2 - 0.5$ мм</p>
<p>Кт 6.1</p> <p><i>Фасування та маркування субстанції манітолу в мішки</i></p>	<p>Мішок з субстанцією</p> <p>Вага одного мішка</p>	<p>Ваги</p>	<p>Вага мішків визначається періодично під час пакування субстанції</p>	<p>$m=50$ кг</p> <p>(загальна маса мішків з субстанцією за цикл виробництва 781,8 кг)</p>

РОЗДІЛ 8. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОДЕРЖАННЯ ЛЗ

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

Річна потужність біосинтезу манітолу складає **49600,44** кг (49 600 440 г).

Вміст манітолу в 1 мл препарату дорівнює 150 мг. Тоді:

$$1 \text{ мл} - 150 \text{ мг}$$

$$\times \text{мл} - 49600440000 \text{ мг}$$

Отже, на рік необхідно виготовити $x = (49600440000 \text{ мг} * 1 \text{ мл}) / 150 \text{ мг} = 330669600$ мл розчину для інфузій.

Планується випускати флакони з вмістом у ньому розчину для інфузій 200 мл. Продуктивність наповнювальної машини складає 3000 флаконів на годину. Прийемо час роботи машини 8 годин. Отже, за один цикл наповнюється $3000 * 8 = 24000$ флаконів або у перерахунку на об'єм розчину для інфузій у флаконі: $24000 \text{ флаконів} * 200 \text{ мл} = 4800000$ мл розчину.

Тоді кількість серій на рік складає $330669600 / 4800000 = \approx 69$ серій.

8.2. Обґрунтування вибору класів чистоти виробничих приміщень.

До виробництва стерильної продукції пред'являють особливі вимоги, щоб звести до мінімуму ризик контамінації мікроорганізмами, частками та пірогенами. При цьому багато чого залежить від кваліфікації, навчання та виробничої дисципліни працюючого персоналу. Особливо важливе значення має забезпечення якості; при цьому типі виробництва необхідно ретельно дотримуватися способів приготування та методик, які чітко встановлені та пройшли валідацію. Ніяка кінцева стадія процесу або випробування готової продукції не можуть розглядатися як єдиний чинник, що засвідчує

					НУХТ БТЕК 02.02.08 КР ПЗ					
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дат</i>	Розділ 8. Обґрунтування вибору технологічної схеми од					
<i>Розроб.</i>		<i>Чумак С.Ю.</i>						<i>Літ.</i>	<i>Анк.</i>	<i>Архівів</i>
<i>Перевір.</i>		<i>Старовойтов</i>							84	13
<i>Консультант</i>								86		
<i>Н. Контр.</i>								Кафедра БТМ		
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков</i>								

стерильність або інші сторони якості.

Стерильну продукцію необхідно виробляти в чистих зонах, доступ у які персоналу та/або надходження обладнання та матеріалів має здійснюватися через повітряні шлюзи. Чисті зони слід обслуговувати таким чином, щоб вони відповідали стандарту чистоти; в них необхідно постачати повітря, що пройшло через фільтри відповідної ефективності.

Різні операції з підготовки компонентів, приготування продукції та наповнення слід здійснювати в окремих зонах усередині чистої зони. Виробничі операції діляться на дві категорії: по-перше, коли продукцію піддають кінцевій стерилізації (в остаточному первинному пакуванні), і, по-друге, коли операції на декількох або всіх стадіях виконують в асептичних умовах.

Чисті зони для виробництва стерильної продукції класифікують відповідно до необхідних характеристик навколишнього середовища. Кожна виробнича операція вимагає відповідного рівня чистоти навколишнього середовища в експлуатованому стані для зведення до мінімуму ризику контамінації частками або мікроорганізмами продукції чи оброблюваних матеріалів.

Для відповідності вимогам в умовах «експлуатації» ці зони мають бути спроектовані так, щоб забезпечити точно визначений рівень чистоти повітря в «оснащеному» стані. «Оснащений» стан – це умова, за якої система чистого приміщення цілком підготовлена, виробниче обладнання цілком встановлене і готове до роботи, але персонал відсутній. «Експлуатований» стан – це умова, за якої система чистого приміщення й обладнання функціонують у встановленому режимі з визначеною кількістю працюючого персоналу.

«Експлуатований» стан та «оснащений» стан мають бути встановлені для кожного чистого приміщення або комплексу чистих приміщень.

Для виробництва стерильних лікарських засобів виділяють чотири класи.

Клас А: Локальна зона для операцій, що становлять високий ризик для якості продукції, наприклад: зони дозування, закупорювання ємностей, відкривання ампул і флаконів, змішування в асептичних умовах. Як правило, такі умови забезпечуються ламінарним потоком повітря на робочому місці. Системи ламінарного потоку повітря мають забезпечувати рівномірну швидкість повітря в діапазоні 0,36-0,54 м/с (керівний норматив), що застосовне до відкритого робочого місця в чистій кімнаті. Підтримування ламінарності має бути доказаним та валідованим. У закритих ізоляторах та боксах із рукавичками можна використовувати односпрямований потік повітря із меншими швидкостями.

Клас В: Навколишнє середовище для зони класу А у разі виготовлення і наповнення в асептичних умовах.

Класи С і D: Чисті зони для здійснення менш критичних стадій виробництва стерильної продукції [129].

8.3. Обґрунтування вибору підготовки первинної упаковки.

Підготовка матеріалів для первинного пакування включає порядок їх звільнення від тари, перегляду та відбракування (при необхідності).

Персонал, що здійснює підготовку матеріалів для первинного пакування, має бути ознайомлений зі стандартними робочими процедурами щодо підготовки матеріалів для первинного пакування.

Контроль мікробіологічної чистоти матеріалів для первинного пакування проводять відповідно з Методичними рекомендаціями щодо контролю мікробіологічної чистоти матеріалів для первинного пакування, затвердженими наказом МОЗ України 14.12.01 N 502.

Звільнення від тари рекомендується проводити з використанням напівавтомату, що забезпечує підняття її на рівень транспортуючого пристрою, пошарове зсування та накопичення на стіл і подання на перегляд.

Перегляд може здійснюватися візуально, наприклад, на переглядових столах, обладнаних пристроєм для перевертання, та

лампами денного світла. Відбракуванню підлягають матеріали для первинного пакування, що мають відхилення на зовнішній вигляд від вимог діючої нормативної документації [130].

Процес підготовки флаконів починається із замочування, миття зовнішньої і внутрішньої поверхонь і стерилізації. Під час замочування мийний розчин поверхнево-активних речовин піддає деструкції частинки забруднень, що веде до їх відшаровування з поверхні скла і видалення. Першим етапом миття, як правило, є миття внутрішньої поверхні флаконів, при якому відбувається механічне очищення забруднень.

Миття зовнішньої і внутрішньої поверхонь флаконів здійснюється із застосуванням шприцевого (струминного), ультразвукового або контактнo-ультразвукового методів або їх комбінації.

Останнє обполіскування флаконів здійснюють водою для ін'єкцій, профільтрованою через мембранний фільтр із порами розміром не більше 5,0 мкм.

Після миття флакони надходять на стерилізацію. Для цього використовують сушильно-стерилізаційні установки тунельного типу, де флакони проходять три зони: нагрівання до температури стерилізації (315 ± 35 °С), видержку при заданій температурі протягом певного часу (5—30хв) і охолодження профільтрованим через фільтр тонкого очищення стерильним повітрям.

Для підготовки пробок і ковпачків у виробничих умовах необхідно використовувати поліфункціональне устаткування з програмним управлінням, що дозволяє здійснювати всі операції в одному апараті.

Миття пробок і ковпачків містить у собі декілька операцій обробки, що чергуються між собою, і обполіскувань. Після кожної операції проводять обполіскування пробок проточною водопровідною водою, а потім водою очищеною. Останнє обполіскування проводять водою для ін'єкцій, профільтрованою через фільтр із порами розміром не більше 5,0 мкм.

Стерилізацію пробок і ковпачків проводять насиченою парою у стерилізаторах із подальшим висушуванням стерильним повітрям.

Стерильні флакони, пробки і ковпачки вивантажують у стерильні ємкості з кришками і зберігають у чистій зоні з навколишнім середовищем щонайменше класу D не більше 24 год [130, 131].

8.4. Обґрунтування вибору підготовки води.

Вода для ін'єкцій (ДФУ) – вода, яка використовується як розчинник при приготуванні ЛП для парентерального застосування (вода для ін'єкцій in bulk) або для розчинення чи розведення діючих речовин безпосередньо перед парентеральним застосуванням (вода для ін'єкцій стерильна). За органолептичними показниками вона являє собою прозору, безбарвну рідину без смаку та запаху. Згідно з ДФУ вода для ін'єкцій повинна відповідати вимогам, що висуваються до води дистильованої, й бути апірогенною. Вода для ін'єкцій in bulk одержують із води питної або води очищеної шляхом дистиляції згідно з валідованими методиками та процедурами при регулярному контролі її питомої електропровідності та мікробіологічної чистоти в процесі виробництва. Одержання води для ін'єкцій здійснюється в асептичних приміщеннях, де категорично забороняється виконувати будь-які роботи, не пов'язані з процесом дистиляції, перегонкою питної або знесолоної води. Для цього використовують термокомпресійні аквадистилятори, частини яких, що контактують із водою, виготовлені з нейтрального скла, кварцу або підходячого металу. Проблемою при одержанні води для ін'єкцій є забруднення дистилату пірогенними речовинами, що відбувається шляхом перенесення дрібних крапель води або винесення їх потоком пари в конденсатор. Тому обладнання має бути забезпечене ефективним пристроєм для запобігання захопленню крапель, а також належне утримування й технічне обслуговування обладнання. Першу порцію води, одержану на початку роботи, відкидають, потім дистилат збирають.

Під час виробництва води для ін'єкцій і подальшого її зберігання контролюють і відстежують загальну кількість життєздатних аеробних

мікроорганізмів. Для простежування несприятливих тенденцій установлюють відповідну попереджувальну межу і відповідну межу, яка вимагає вживання заходів (10 життєздатних аеробних мікроорганізмів у 100 мл). При необхідності можуть бути встановлені більш жорсткі попереджувальні межі. Крім того, вода для ін'єкцій in bulk має витримувати випробування на нітрати — не більше 0,00002% (0,2 мм рт. ст.), важкі метали — не більше 0,00001% (0,1 мм рт. ст.) та бактеріальні ендотоксини — менше 0,25 МО/мл. Воду для ін'єкцій in bulk зберігають і використовують в умовах, що дозволяють запобігти росту мікроорганізмів й уникнути будь-яких інших забруднень. Надійність гарантується в спеціальних системах з інертного матеріалу, де вода знаходиться при високій температурі та в постійному русі. Система складається з двох ємностей з паровим підігрівом та стерилізуючим повітряним фільтром і насоса, який перекачує воду з однієї ємності в другу з постійною швидкістю 1–3 м/с. Температура циркулюючої води підтримується теплообмінниками в межах 80–95 °С. З'єднуючі труби мають нахил 2–3° для забезпечення можливості повного змиву води при промиванні системи. Резервуари для зберігання води, трубопроводи та арматуру виготовляють із стійких до хімічної дії матеріалів спеціальних марок нержавіючої сталі, титану або скла. Максимальний термін зберігання — 24 год в асептичних умовах [132].

8.5. Вибір технологічних стадій та операцій, обладнання.

1. Отримання води для ін'єкцій.

Найбільш поширеним методом отримання води для ін'єкцій є дистиляція, тобто процес випаровування з подальшою конденсацією пари. При цьому відбувається фазове перетворення рідини на пару, а потім знову в рідину при конденсації.

У виробництві планується використовувати дистилятор DITES TECNinox [133] (рис. 8.1) виробничою потужністю 4 м³/год, за тиску 0,8 МПа.



Рис. 8.1. Дистилятор DITEC TECNinox.

Дистилятори DITEC від TECNinox поєднують у собі безпеку стандартного обладнання та універсальність налаштування з високим рівнем якості, стабільною та ефективною продуктивністю.

Особливості:

- ✓ Вбудований змійовик попереднього нагрівання, новий дизайн, результат тривалих досліджень і досвіду;
- ✓ Система подачі спадаючої плівки з миттєвим ефектом швидкого випаровування для підвищення ефективності випаровування;
- ✓ Розділення крапель води на основі поєднання багатьох фізичних факторів;
- ✓ Автоматика та контроль: системою керує промисловий PLC на основі інтерфейсу НМІ [133].

2. Миття та стерилізація скляних флаконів.

На даному етапі виробництва планується використовуватись лінія миття та стерилізації флаконів Bosch з мийною машиною RRU 3040 і стерилізаційним тунелем HQL 2240 [134] (рис. 8.2).



Рис. 8.2. Лінія миття та стерилізації флаконів Bosch з мийною машиною RRU 3040 і стерилізаційним тунелем HQL 2240

Мийна машина RRU 3040 має 40 станцій, продуктивність до 12 000 флаконів на годину та підходить для флаконів діаметром від 8 мм до 52 мм x 128 мм у висоту. Включає ультразвукове очищення.

Тунель HQL 2240 має 2875 мм в довжину x 1300 мм в ширину x 2330 мм у висоту [134].

3. Змішування компонентів препарату.

Для процесу приготування розчину для інфузій на виробництві планується використовувати реактори-змішувачі від компанії «Тесніох» [135] (рис. 8.3).



Рис. 8.2. Реактори-змішувачі компанії «Тесніох»

Матеріали, які використовуються для виробництва реакторів є нержавіюча сталь 316L для деталей, які безпосередньо контактують із продуктом, і нержавіюча сталь 304 для інших.

Реактори вертикальної та горизонтальної орієнтації можуть бути встановлені як стаціонарний блок або бути рухомими. Вони можуть бути виконані в одно-, дво- або тристінних варіантах; конусоподібне, плоске або торосферичне дно реактора.

Реактор використовується при атмосферному тиску; бак під тиском (від -1 до 10 бар) виготовляється відповідно до Директиви PED 2014/68/EU, стандарту AD Merkblatt або EN 13445, Asme, Selo [135].

4. Фільтрація розчину для інфузій та його розлив у флакони

Процес фільтрації розчину для інфузій та одночасно процес його розливу у флакони ємністю 200 мл буде здійснюватися за використання обладнання BOSCH MLF 3002 [136] (рис. 8.4).



Рис. 8.4. Загальний вигляд BOSCHMLF 3002

Обладнання Bosch MLF 3002 для наповнення та закриття флаконів з періодичним рухом включає поворотний стіл для порожніх флаконів, 4 поворотні поршневі наповнювальні головки, вставку для пробки з дозатором чаші та систему закривання ковпачків ALU з дозатором чаші.

Підходить для контейнерів діаметром до 55 мм і висотою до 185 мм (подвійний індекс), вставок і кришок діаметром до 36 мм. Продуктивність до 2000 флаконів на годину [136].

5. Стерилізація розчину для інфузій у первинному пакуванні (флаконі).

На даному етапі проводять стерилізацію розчину в первинній упаковці за використання автоклаву Zirbusсерії 10Н об'ємом камери 2 м³[137] (рис. 8.5).



Рис. 8.5. Загальний вигляд автоклаву Zirbusceprii 10H

Особливості обладнання:

- ✓ Власне пароутворення за допомогою вбудованого електричного генератора чистої пари;
- ✓ Варіант прямокової установки для наземного завантаження автоклава;
- ✓ Версія з подвійними дверима з газонепроникним розділенням для чистих приміщень;
- ✓ Конструкція, що відповідає стандартам GMP, відповідно до DIN 58950 і правил FDA;
- ✓ Підключення до власної кільцевої системи охолодження для економії води. Теплообмін відбувається через пластинчастий теплообмінник і економить до 80% води;
- ✓ Рециркуляційний вентилятор ще більше скорочує час охолодження та забезпечує можливість стерилізації в пароповітряній суміші;
- ✓ Спринклерний процес з гарячою водою (HWSP) для швидкої та дбайливої стерилізації рідин у закритих ємностях [137].

6. Пакування флаконів у вторинну упаковку.

На етапі пакування флаконів у вторинну упаковку (картонну коробку) планується використовувати картонажну машину Horizontal Cartoner SC 5 IWK TL [138] (рис. 8.6).



Рис. 8.6. Загальний вигляд устаткування HorizontalCartonerSC 5 IWKTL

Ця компактна картонажна машина серії SC 5 була спеціально розроблена для застосування у фармацевтичній та косметичній промисловості з низьким і середнім діапазоном продуктивності до 200 коробок/хв.

Модульна структура цієї картонної машини дає можливість пізніше встановити додаткові функції, що гарантує легку адаптацію до мінливих процесів пакування. Переривчастий або безперервний принцип роботи. Позитивне відкриття коробки з контрприсосками та кінематикою монтажу.

Переваги використання:

- ✓ Дизайн і функції, що відповідають стандартам фармацевтичної промисловості;
- ✓ Короткий, компактний розмір конструкції;

- ✓ Центральний сенсорний екран з 3D візуалізацією;
- ✓ Оптимальна доступність для чищення та обслуговування;
- ✓ Можливе підключення до системи керування лініями SCADA [138].

РОЗДІЛ 9. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ (ЕТАПИ ОТРИМАННЯ ЛЗ)

Специфікація обладнання, яке зображене на апаратурній схемі, наведена в табл. 9.1.

Таблиця 9.1

Специфікація обладнання ділянки виготовлення ЛЗ

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
ПЗ-1	Повірозабірник	1	Пристрій забірний, обладнаний металевою сіткою для видалення механічних забруднень. Фірма: ООО «НПЦ Вектор-Кондвент». Виробник: Україна[1].
Ф-2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтр першого ступеня очистки типу ФЯП, Фільтруючий матеріал – мати зі скловолокна, Е = 80 %, продуктивність – 1530 м ³ /год[2].
В-3	Вентилятор	1	Відцентровий вентилятор Ostberg TKS 300 А, Швеція [3].
Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Теплообмінник-охолоджувач серії Swegon фірми «Parasob», (Німеччина) продуктивність 63 м ³ /год [4].
Т-5	Теплообмінник-нагрівач	1	Теплообмінник нагрівач серії NP70 фірми "DEFRO NP ", потік повітря 8268 м ³ /год, потужність 500 Вт, виготовлений з високоякісної котлової сталі [5].
Ф-6	Головний фільтр очистки повітря	1	Модель фільтра FMW. Ступінь очищення повітря 99%. Продуктивність фільтра складає 3400 м ³ /год.[6].

НУХТ БТЕК 02.02.08 КР ПЗ				
Змн.	Арк.	№ документа	Підпис	Дат
Розроб.		Чумак С.Ю.		
Перевір.		Старовойтов		
Консультант				
Н. Контр.				
Затверд.		Стабніков		
Розділ 9. Специфікація обладнання (етапи отримання ЛЗ)			Літ.	Арк.
				97
			99	
			Кафедра БТМ	

Продовження табл. 9.1

Ф-7	Фільтр типу HEPA	1	Фільтр високоєфективної очистки H12 фірми VOLZ Luftfilter, Німеччина. Фільтруючий матеріал: скловолокно. Робоча температура до +65°C. Ступінь очищення 99,999% [7].
Н-8, Н-20	Насос відцентровий	2	Насос відцентровий DAB KPF (Україна). Потужність двигуна – 0,370 кВт; Продуктивність – 0,06 м ³ /год; Висота подачі – 25 м [8].
УФ-9	Ультрафіолетова установка	1	В установці Electro Steriliser UV-C E-PP-55 використовується далекий короткохвильовий ультрафіолет типу С (УФ-С). із довжиною хвилі 254 нм [9].
ГФ-10	Грубий фільтр для очищення води	1	Raifil HMS-10B - магістральний фільтр Slim 10" з нержавіючої сталі для холодної води. Використовуються для видалення забруднень (мул, пісок, окислене залізо, суспензії) [10].
ПВ-11	Промислова система пом'якшення води	1	Продуктивність одного фільтру Ecosoft FU 2472CE15 складає 11,7 м ³ очищеної води за годину. Система працює в автоматичному режимі, а її обслуговування полягає лише в своєчасному додаванні таблетованої солі в ємність [11].
УФУ-12	Ультрафільтраційна установка	1	Система ультрафільтрації Toray UFS 1672T-S. <ul style="list-style-type: none"> ✓ Продуктивність: до 96 м³/год ✓ Кількість та типорозмір мембран: 16 x HFU - 2020N ✓ Площа фільтрації: 1152 м² ✓ Споживання води при зворотному промиванні: 1,28 м³ ✓ Піковий скидання води при зворотному промиванні: 106 м³/год ✓ Вихідний тиск: 1,0 - 7,0 атм [12].

ЗВО-13	Система зворотнього осмосу	1	Система зворотнього осмосу Aquarum AMRO-18K. Базова комплектація установки наступна: <ul style="list-style-type: none"> ✓ сталева рама, покрита емаллю; ✓ мембраноутримувачі з нержавіючої сталі AISI304; ✓ префільтр тонкої очистки з фільтроелементом 5 мкм; ✓ трубна обв'язка PPR (FV-plast, Чехія); ✓ електрична шафа управління з промисловим контролером і ручним режимом управління [13].
СЕ-14	Система електродеіонізації	1	Наша лінійка EDI включає 14 стандартних модулів з продуктивністю до 60 м ³ /год. кожна серія розроблена з використанням високоякісних компонентів, що забезпечують максимальну надійність і простоту обслуговування [14].
З-15	Збірник	1	Збірник об'ємом 1 м ³ , виготовлений із нержавіючої сталі AISI 304. Виробник: ТОВ «Метал сервіс груп», Україна [15].
ШД-16	Шестиколонний дистилятор	1	Дистилятор DITEC TECNiнох виробничою потужністю 4 м ³ /год, за тиску 0,8 МПа.
МСФ-17	Лінія миття та стерилізації флаконів	1	На даному етапі виробництва планується використовуватись лінія миття та стерилізації флаконів Bosch з мийною машиною RRU 3040 і стерилізаційним тунелем HQL 2240.
Д-18	Дозатор об'ємно-ваговий	1	Дозатор VD1-V8 (Україна). Обсяг дозуючої речовини - 0,2-400 кг [16].
РЗ-19	Реактор-змішувач для приготування розчину для ін'єкцій	1	Реактор об'ємом 400 л фірми «Діоніс» (Україна), оснащений перемішувачем. Загальна швидкість перемішування 100 об/хв [17].

ФРІ-21	Установка для розливу у флакони	1	Процес фільтрації розчину для інфузій та одночасно процес його розливу у флакони ємністю 200 мл буде здійснюватися за використання обладнання BOSCH MLF 3002.
АФ-22	Автоклав для стерилізації флаконів	1	Автоклав Zirusserії 10Н об'ємом камери 2 м ³ .
КМ-23	Картонажна машина	1	Картонажна машина Horizontal Cartoner SC 5 IWK TL до 200 пач/хв.

Примітка:

1. <https://www.c-o-k.ru> (Пристрій забірний).
2. <http://www.airpol.com.ua> (Фільтр першого ступеня очистки).
3. <https://bioclimat.com.ua> (Вентилятор).
4. <https://promvit.com.ua> (Теплообмінник-охолоджувач серії Swegon фірми «Parasol»).
5. <http://de fro.ua> (Теплообмінник нагрівач).
6. <http://www.airpol.com.ua> (Модель фільтра FMW).
7. <https://volzfilters.com> (Фільтр типу HEPA).
8. <http://www.dabpump.com.ua> (Відцентровий насос).
9. <https://aquapolis.ua> (Ультрафіолетова установка).
10. <https://aquapure.com.ua> (Грубий фільтр).
11. <https://prom.ua> (Промислова система пом'якшення води).
12. <https://prom.ua> (Ультрафільтраційна установка).
13. <https://www.aqua-room.com.ua> (Система зворотного осмосу).
14. <https://www.eurowater.com> (Система електродеіонізації).
15. <https://odessa.flagma.ua/> (Збірник).
16. <https://prom.ua> (Дозатор об'ємно-ваговий).
17. <https://odessa.flagma.ua> (Реактор-змішувач для приготування розчину).

РОЗДІЛ 10. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ (ОТРИМАННЯ ЛЗ)

Технологічна схема виготовлення розчину для інфузій, що містить манітол, включає допоміжні роботи (підготовка вентиляційного повітря, підготовка води для ін'єкцій та підготовка первинного пакування) та технологічний процес (приготування розчину для інфузій, фільтрація розчину та розлив у флакони, стерилізація розчину у первинному пакуванні, а також пакування та маркування у вторинну упаковку).

Технологічну схему наведено у графічній частині.

ДР 1. Підготовка вентиляційного повітря.

ДР 1.1. Забір атмосферного повітря

Залежно від пори року, місця забору, повітря міститиме різну кількість аерозольного забруднення, тому забір атмосферного повітря здійснюють через пристрій забірний (ПЗ-1) у найвищій точці на висоті 10 м.

ДР 1.2. Грубе очищення повітря

Повітря потрапляє у фільтр грубої очистки (Ф-2), в якому звільняється від пилу і механічних частинок, та забезпечує ступінь очистки 80%. Повітря після грубого очищення проходить через вентилятор (В-3) та потрапляє до кожухотрубного теплообмінника (Т-4), охолоджується за допомогою хладагенту фреону або підігрівається до 21–23⁰С за допомогою теплообмінника-нагрівача (Т-5) в залежності від пори року, коли проводиться забір повітря. Вологість повітря повинна перебувати в межах 30-60%.

ДР 1.3. Тонке очищення повітря

Далі повітря потрапляє у фільтр тонкого очищення (Ф-6), на якому забезпечується ступінь очистки 99%.

ДР 1.4. Надтонке очищення повітря

					НУХТ БТЕК 02.02.08 КР ПЗ		
Змн.	Арк.	№ документа	Підпис	Дат			
Розроб.		Чумак С.Ю.			Літ.	Арк.	Акронів
Перевір.		Старовойтов				101	6
Консультант					103		
Н. Контр.					Кафедра БТМ		
Затверд.		Стабніков					

На четвертому етапі очищення повітря очищається до ступеню очищення 99,999 % за допомогою фільтру типу HEPA (Ф-7). Повітря береться на аналіз через пробовідбірний пристрій. Очищене вентиляційне повітря по трубопроводу направляється у приміщення класів чистоти D, C, B.

ДР 2. Отримання води для ін'єкцій.

ДР 2.1. Обробка в установці UV-знезараження.

Вода з міського водопроводу за допомогою відцентрового насосу (Н-8) подається до установки UV-знезараження (УФ-9). Руйнування органічних елементів відбувається на клітинному рівні завдяки УФ-С-опроміненню з довжиною хвилі 254 нм. Вплив ультрафіолету такої сили запобігає росту та розвитку мікробів.

ДР 2.2. Очищення на грубому фільтрі.

Після установки UV-знезараження (УФ-9) вода поступає на фільтр грубої очистки (ГФ-10). Даний етап забезпечує видалення з води таких забруднень, як мул, пісок, окислене залізо, зависі.

ДР 2.3. Пом'якшення води.

Вода після фільтр грубої очистки (ГФ-10) поступає в установу для пом'якшення води (ВП-11). Система складається всього з двох модулів — балону з іонообмінною смолою та бака-солерозчинника. Пом'якшення води здійснюється в один етап. Попередньо очищена від механічних домішок вода подається в корпус фільтру, заповненості іонообмінною смолою. Вода пропускається через шар смоли, при цьому йони жорсткості затримуються на смолі, а очищена вода через центральну трубу корпусу подається споживачеві.

Завдяки здатності іонообмінної смоли до регенерації, термін її експлуатації може складати до 5 років. Відновлення робочих характеристик матеріалу здійснюється шляхом промивки розчином таблетованої солі, який готується в окремому баці-солерозчиннику. Як і очищення води, процес регенерації фільтруючого матеріалу здійснюється в автоматичному режимі.

ДР 2.4. Очищення в ультрафільтраційній установці.

Після установки для пом'якшення води (ПВ-11) вода поступає до ультрафільтраційної установки (УФУ-12). Дана система мембранної очистки води дає змогу відділити частинки розміром до 0,01 мкм.

ДР 2.5. Очищення в системі зворотного осмосу.

Вода, яка пройшла процес ультрафільтрації, далі надходить до системи зворотного осмосу (ЗВО-13). Зворотний осмос видаляє забруднення і небажані молекули з води коли тиск проштовхує її через напівпроникну мембрану. В результаті цього розчинена речовина залишається на боці мембрани, а чистий розчинник може переходити на іншу сторону. Фільтр для води зі зворотним осмосом видаляє шкідливі домішки, солі важких металів, включаючи мідь, цинк, кадмій, нікель, залізо, а також хлор, пестициди і гербіциди, суспензії, фтор, миш'як. Ступінь очищення води на даному етапі складає 99%.

ДР 2.6. Електродеіонізація води.

Після системи зворотного осмосу (ЗВО-13) вода направляється до наступної системи очищення, а саме системи електродеіонізації (СЕ-14). Електродеіонізація (EDI) використовується після зворотного осмосу для доочищення демінералізованої води з метою отримання низьких рівнів електропровідності і діоксиду кремнію. Чистота води на даному етапі вже дорівнює 99,99999991 %, а питомий опір становить 18 МОм·см. Після процесу електродеіонізації вода очищена поступає в збірник (З-15) для подальшої її очищення.

ДР 2.7. Дистиляція води.

Зі збірника для води очищеної (З-15) вода поступає до шестиколонного дистилятора (ШД-16) для здійснення власне процесу дистиляції.

ДР 3. Підготовка первинної упаковки

ДР 3.1. Підготовка скляних флаконів

ДР 3.1.1 Миття зовнішньої та внутрішньої поверхні

На складі у груповій упаковці отримують необхідну кількість первинної упаковки (флакони). Після зняття зовнішньої упаковки, флакони оглядають

зовнішньо і відбраковують ті, що мають невідповідності (сколи, посічення, тріщини).

Зовнішню і внутрішню мийку флаконів проводять на автоматі мийки RRU 3040 флаконів (МСФ-17). Воду очищену (від ДР 2.6), що рухається по трубопроводу, подають до RRU 3040, де вода нагрівається до температури вище 70 °С та подається подають під тиском 0,1 МПа.

ДР 3.1.2 Стерилізація флаконів

Підготовлені флакони надходять в стерилізаційний тунель (МСФ-17), де відбувається їх стерилізація та депірогенізація за допомогою гарячого очищеного повітря при температурі 310 °С зі швидкістю руху конвеєрної стрічки не більше 100 мм/хв, що відповідає тривалості процесу не менше 2 хв.

ДР 3.1.3 Охолодження флаконів

Охолодження відбувається на виході зі стерилізаційного тунелю (МСФ-17). Флакони охолоджуються очищеним повітрям (від ДР 1.4), що рухається по трубопроводу, до температури 20-25 °С. Стерильні та охолоджені флакони по транспортеру надходять до ТП 5.2.

ДР 3.2 Підготовка гумових пробок

ДР 3.2.1 Перегляд пробок та їх відбракування

На складі у груповій упаковці отримують необхідну кількість гумових пробок. Після оброблення/зняття зовнішньої упаковки, пробки оглядають і відбраковують ті, що мають невідповідності (тріщини, деформацію).

ДР 3.2.2 Миття гумових пробок

Мийку пробок проводять вручну в гарячому 55 ± 5 °С розчині мийного засобу, після чого пробки промивають гарячою очищеною водою до повного змиття мийного розчину.

ДР 3.2.3 Стерилізація гумових пробок

Після миття пробки поміщають в пакети для стерилізації, вкладають їх у корзини та завантажують у автоклав. Пробки стерилізують за допомогою

насиченої водяної пари, що рухається по трубопроводах при температурі 121 °С протягом 20 хвилин. Стерильні пробки передають до ТП 5.2.

ДР 3.3 Підготовка алюмінієвих ковпачків

ДР 3.3.1 Перегляд ковпачків та їх відбракування

На складі у груповій упаковці отримують необхідну кількість ковпачків. Після оброблення/зняття зовнішньої упаковки, ковпачки оглядають і відбраковують ті, що мають невідповідності (деформацію, вкраплення).

ДР 3.3.2 Миття ковпачків

Алюмінієві ковпачки вкладають у ємність, наповнюють розчином мийного засобу підігрітого до температури 75±5 °С та витримують 15 хв. Після чого ковпачки промивають водою очищеною до повного змиття мийного розчину.

ДР 3.3.3 Стерилізація ковпачків

Чисті ковпачки розфасовують у пакети для стерилізації, які запаюють на ламінації. Підготовлені пакети з ковпачками завантажують до автоклаву та проводять їх стерилізацію за допомогою насиченої водяної пари, що рухається по трубопроводу, при температурі 121 °С протягом 20 хвилин. Стерильні ковпачки в пакетах для стерилізації передають до ТП 5.2.

ТП 4. Приготування розчину для інфузій.

ТП 4.1. Змішування компонентів препарату.

У реактор-змішувач (РЗ-19) завантажують воду для ін'єкцій (від ДР 2.7), вносять за допомогою дозатора (Д-18) субстанцію манітолу та натрію хлорид, перемішують до повного розчинення. Для інтенсифікації процесу розчин підігрівають до температури 40–50 °С.

ТП 5. Фільтрація розчину та розлив у флакони.

ТП 5.1. Фільтрація розчину для інфузій.

Отриманий на попередньому етапі розчин за допомогою насоса (Н-20) направляється до установки для розливу у флакони BOSCH MLF 3002 (ФРІ-21). Розчин спочатку потрапляє в бак-накопичувач даного устаткування, а потім з нього вже надходить на лінію розливу. На вході в лінію розчин

стерилізується за допомогою фільтрації, після чого потрапляє в систему розливу, яка розташована в чистій зоні, яке відповідає асептичним умовам класу чистоти А для зони наповнення.

ТП 5.2. Розлив за закупорювання профільтованого розчину у флакони.

Далі (від ТП 5.1) подається розчин для інфузій, яким наповнюють флакони (від ДР 3.1.3) по 200 мл на машині BOSCHMLF 3002 (ФРІ-21). Флакони накриваються гумовими пробками (від ДР 3.2.3), а потім закупорюються. Далі стерильні ковпачки (від ДР 3.3.3) завантажують до приймального бункеру для ковпачків автомату BOSCHMLF 3002 (ФРІ-21). Флакони з розчином надходять до ділянки обтиснення флаконів, де під ламінарним потоком накриваються та одночасно обтиснюються стерильними ковпачками.

ТП 6. Стерилізація.

ТП 6.1. Стерилізація розчину у первинному пакуванні.

Отримані на попередньому етапі флакони з розчином для інфузій персоналом виробництва вкладаються в спеціальні касети, які потім поміщають до автоклаву Zirbus серії 10Н (АФ-22). У автоклаві розчин у флаконах стерилізується за температури 121°C протягом 15 хв. Простерилізовані флакони з розчином далі направляються на стадію пакування у вторинну упаковку.

ПМВ 7. Пакування та маркування флаконів.

ПМВ 7.1. Пакування та маркування флаконів у вторинну упаковку.

Флакони з розчином для інфузій, які пройшли стерилізацію, надходять до картонажної машини (КМ-23) де відбувається пакування флаконів у вторинну упаковку. Під час даного процесу 1 флакон вкладається в картонну коробку. Також відбувається маркування упаковки, шляхом нанесення номеру серії, а також термін придатності. Правильність пакування та маркування контролюється безпосередньо в процесі виробництва.

РОЗДІЛ 11. ОПИС ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ЗГІДНО АНД (ПРОЕКТ АНД)

Маніт розчин д/інф. 15 % по 200 мл у флаконі.

Склад: *діюча речовина*: маніт; 1 мл розчину містить маніту 150,0 мг.;
допоміжні речовини: натрію хлорид, вода для ін'єкцій.

Фармакологічні властивості. Фармакодинаміка. Маніт чинить виражену діуретичну дію за рахунок підвищення осмотичного тиску плазми і фільтрації без наступної канальцевої реабсорбції, приводить до утримання води в канальцях і збільшення об'єму сечі, підвищуючи осмолярність плазми, спричиняє переміщення рідини з тканин у судинне русло. Він сприяє швидкому виведенню рідини із судинного русла, підвищує нирковий кровотік, завдяки чому зменшується гіпоксія ниркової тканини. Не впливає на клубочкову фільтрацію. Діурез супроводжується виведенням значної кількості натрію без помітного впливу на виведення калію. Діуретичний ефект визначається кількістю і швидкістю введеного і профільтрованого нирками препарату, тому він неефективний при порушенні фільтраційної функції нирок, а також при азотемії у хворих на цироз печінки та з асцитом. Спричиняє підвищення об'єму циркулюючої крові (через зростання осмотичного тиску у судинному руслі). Після внутрішньовенного введення маніт знижує реабсорбцію води, збільшує об'єм циркулюючої крові, чинить сечогінну дію, знижує внутрішньочерепний тиск [139].

Фармакокінетика.

Фільтрується нирками без наступної канальцевої реабсорбції. Період напіввиведення – приблизно 100 хв (при гострій нирковій недостатності може зрости до 36 годин). Діуретичний ефект проявляється через 1–3 години після введення, зниження тиску спинномозкової рідини і внутрішньоочного

					НУХТ БТЕК 02.02.08 КР ПЗ			
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дат</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Чумак С.Ю.</i>			Розділ 11. Опис лікарського засобу згідно АНД (проект)	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акронів</i>
<i>Перевір.</i>		<i>Старовойтов</i>					107	9
<i>Консультант</i>						109		
<i>Н. Контр.</i>						Кафедра БТМ		
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков</i>						

тиску – протягом 15 хв після початку інфузії. Максимальне зниження внутрішньоочного тиску відзначається через 30–60 хв після початку введення. Зниження тиску спинномозкової рідини зберігається протягом 3–8 годин, зниження внутрішньоочного тиску – протягом 4–8 годин після закінчення інфузії. Маніт незначною мірою метаболізується у печінці з утворенням глікогену. Приблизно 80 % введеної дози виводиться із сечею протягом 3 годин. При нирковій недостатності період напіввиведення може зростати до 36 годин [140, 141].

СПЕЦИФІКАЦІЯ

Маніт розчин д/інф. 15 % по 200 мл. у флаконі

НАЗВА ПОКАЗНИКА	ВИМОГИ НД	МЕТОДИ КОНТРОЛЮ за НД
<u>Опис</u>	Прозора безбарвна або злегка жовтуватого кольору рідина	Візуально п.1
<u>Ідентифікація</u>	Іфрачервоний спектр поглинання субстанції, одержаний у дисках з калію броміду Р має відповідати спектру EP CRS маніту	п. 2 ДФУ*, 2.2.24
<u>Прозорість</u>	Має бути прозорим	п. 3 ДФУ*, 2.2.1
<u>Кольоровість</u>	Має бути безбарвним або його забарвлення має бути не інтенсивнішим за еталон ВУ ₆	п. 4 ДФУ*, 2.2.2 (метод II)
<u>pH</u>	Від 5,00 до 6,50	п. 5, ДФУ*, 2.2.3
<u>Осмоляльність</u>	1382±22 мосмоль/л.	п. 6, ДФУ*, 2.2.35
<u>Механічні включення</u> видимі частки	Мають бути відсутні	п. 7 п. 7.1, ДФУ*, ЄФ* 2.9.20
невидимі частки	Часток з розміром ≥ 10 мкм має бути не більше 25 у 1 мл, Часток з розміром розміром ≥ 25 мкм має бути не більше 3у 1 мл	 п. 7.2, ДФУ*, ЄФ* 2.9.19, метод 1

<u>Об'єм, що витягається</u>	Не менше 200 мл	п. 8, ДФУ*, 2.9.17
<u>Супровідні домішки</u> домішки А сума домішок В, С будь-якої домішки сума домішок	Не більше 2,0 %, не більше 2,0 %, не більше 0,10 %, не більше 2,0 %	п. 9,ДФУ*, 2.2.27, 2.2.46
<u>Стерильність</u>	Препарат має бути стерильним	п. 10, ДФУ*, ЄФ*,2.6.1
<u>Бактеріальні ендотоксини</u>	Не більше 0,5 МО/мл	п. 11,ДФУ*, ЄФ*,2.6.14, метод А
<u>Кількісне визначення</u>	Від 97,0 % до 102,0 % у перерахунку на сухуречовину	п.12ДФУ*, 2.2.29, 2.2.46 (метод РХ)
<u>Герметичність флаконів</u>	Повинні бути герметичними	п. 14
<u>Упаковка</u>	Флакони скляні типу П-100Б1-2 виробника ПрАТ "Біо мед скло", Україна закупорені гумовими пробками типу LK-28 виробника "SanokRubber", Польща і ковпачок алюмінієвий з пластиковою накладкою К-3-28ZВ виробництва «МП Чернівецький завод медичних виробів», Україна.	
<u>Умови зберігання</u>	Зберігати в оригінальній упаковці при температурі не вище 25 °С. Не заморожувати.	

Аналітичні методи контролю

- 1. Опис.** Прозора безбарвна або злегка жовтуватого кольору рідина.
- 2. Ідентифікація.** Визначення проводять методом абсорбційної спектрофотометрії в інфрачервоній області (ДФУ*, 2.2.24). Інфрачервоний

спектр поглинання, одержаний у дисках з калію броміду Р має відповідати спектру EP CRS маніту.

У разі різниці одержаних спектрів окремо у 2 скляних віалах наливають 0,25 мл випробувального лз та 0,25 мл EP CRS маніту.

Упарюють насухо нагріванням у мікрохвильовій печі із потужністю (600-700) Вт протягом 20 хв або у вакуумній шафі при температурі 100 °С протягом 1 год, не допускаючи пригорання; утворюється білий або злегка жовтуватий порошок. Повторно записують спектри одержаних залишків.

3. Прозорість (ДФУ*, 2.2.1). Має бути прозорим.

4. Кольоровість (ДФУ*, 2.2.2, Метод II). Має бути безбарвним або його забарвлення має бути не інтенсивнішим за еталон ВУ₆.

5. pH (ДФУ*, 2.2.3). Від 5,00 до 6,50.

6. Осмоляльність (ДФУ*, 2.2.35). 1382±22 мосмоль/л.

7. Механічні включення.

7.1 Видимі частки (ДФУ*, ЄФ* 2.9.20). Мають бути відсутні.

7.2 Невидимі частки. Вимірювання невидимих часток проводять згідно ДФУ*, ЄФ*, 2.9.19 методом світлоблокування на лічильнику ШАСRoусо 9703, 9703+або аналогічному.

Згідно ДФУ*, ЄФ* 2.9.19 препарат витримує випробування, якщо середня кількість часток у випробовуваних одиницях не перевищує 25 в 1 мл. для часток розміром 10 мкм або більше і не перевищує 3 в 1 мл. для часток розміром 25 мкм або більше.

8. Об'єм, що витягається (ДФУ*, 2.9.17). Не менше 200 мл.

9. Супутні домішки.

Визначення проводять методом рідинної хроматографії (ДФУ*, 2.2.29, 2.2.46).

Випробовуваний розчин. 2,5 мл манігудоводят об'єм розчину розчинником води Р до 10,0 мл.

Розчин порівняння (а). 2,5 мл маніту EP CRS доводять об'єм розчину розчинником води Р до 10,0 мл..

Розчин порівняння (b). 2,0 мл випробовуваного розчину доводять водою Р до об'єму 100,0 мл.

Розчин порівняння (c). 0,5 мл розчину порівняння (b) доводять водою Р до об'єму 20,0 мл.

Розчин порівняння (d). По 0,25 г маніту Р і сорбіту Р (домішка А) розчиняють у 5 мл води Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10,0 мл.

Розчин порівняння (e). 0,5 г малтітолу Р (домішка В) («Sigma», кат. № М8892) і 0,5 г ізомалту Р (домішка С) (USP, кат. № 1349626) розчиняють у 5 мл води Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 100,0 мл. 2 мл одержаного розчину доводять водою Р до об'єму 10 мл.

Хроматографування проводять на рідинному хроматографі з рефрактометричним детектором з термостатуванням за таких умов:

- колонка Bio-Rad Laboratories Aminex HPLX-87C розміром 0,3 м x 7,8 мм або SugarPac розміром 300 мм x 6,5 мм;

- нерухома фаза: катіонообмінна смола сильна (кальцієва форма) Р із розміром часток 9 мкм або аналогічна;

- температура $(85 \pm 2) ^\circ\text{C}$;

- рухома фаза: дегазована вода для хроматографії Р;

- швидкість рухомої фази: 0,5 мл/хв.

Хроматографують по 20 мкл випробовуваного розчину та розчинів порівняння (b), (c), (d) та (e). Час хроматографування випробовуваного розчину має бути в 1,5 рази більше часу утримування маніту.

Ідентифікація домішок: Використовують хроматограму отриману з розчину порівняння (d) для ідентифікації піку домішки А і хроматограму розчину порівняння (e) для ідентифікації піків домішок В і С.

Відносні часи утримування: до маніту (час утримування маніту близько 20 хв): домішки С (перший пік) - близько 0,6; домішки В – близько 0,7; домішки С (другий пік) – близько 0,73; домішки А – близько 1,2.

Домішка С єюлюється двома піками. Може спостерігатись нерозділення домішки В і другого піку домішки С.

Хроматографічна система вважається придатною, якщо на хроматограмі розчину порівняння (d) коефіцієнт розділення для піків маніту та домішки А не менше 2.

Нормування:

- домішка А: не більша ніж площа основного піку на хроматограмі отриманій з розчину порівняння (b) (2,0 %);

- сума домішок В і С: не більша ніж площа основного піку на хроматограмі отриманій з розчину порівняння (b) (2,0 %);

- будь-яка домішка: площа піка кожної домішки не має перевищувати дві площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (c) (0,10 %);

- сума домішок: не більша ніж площа основного піку на хроматограмі отриманій з розчину порівняння (b) (2,0 %)

- не враховують піки, площа яких становить менше площі основного піку на хроматограмі отриманій з розчину порівняння (c) (0,05 %)

10. Стерильність(ДФУ*, ЄФ*, 2.6.1.) Препарат має бути стерильним.

Посів препарату на живильні середовища проводять методом мембранної фільтрації з використанням стерильних одноразових фільтруючих систем TZNA LV2 10.

Готують об'єднану пробу для фільтрації: відбирають по 40мл з кожного з 20 флаконів з препаратом у два стерильні флакони місткістю 500 мл.

Вміст двох флаконів з об'єднаною пробєю пропускають через два стерильних мембранних фільтри, попередньо зволожених стерильним розчином 1 г/л пептону казеїнового.

Після закінчення фільтрації одну каністру заповнюють тіогліколевим середовищем, другу – середовищем соєво-казеїновим.

Посіви в середовищі тіогліколевому інкубують при температурі (30 – 35)°С.

Посіви в середовищі соєво-казеїновому інкубують при температурі (20 – 25) °С.

Усі посіви інкубують не менше 14 діб.

При візуальному обліку не повинно спостерігатися зростання мікроорганізмів.

11. Бактеріальні ендотоксини (ДФУ*, ЄФ*, 2.6.14, метод А). Не більше 0,5 МО/мл.

Для випробувань використовують лізат амебоцитів з чутливістю 0,03 ЕО/мл («Associates of Cape Cod Incorp.», США, # GP5003), який розводять на буфері на основі 0,2 М трис(гідроксиметил)амінометангідрохлориду. У разі використання ЛАЛ-реактивів інших виробників або іншої чутливості, обов'язково проводять їх валідацію на здатність виявляти активність до різних концентрацій ендотоксину у розчині препарату у максимально допустимому розведенні.

12. Кількісне визначення

Визначення проводять методом рідинної хроматографії (ДФУ*, 2.2.29, 2.2.46) в умовах тесту “Супровідні домішки”.

Хроматографують по 20 мкл випробовуваного розчину і розчину порівняння (а).

Вміст D-маніту (X), у відсотках, обчислюють за формулою:

$$X = \frac{S_1 \cdot m_0 \cdot 10 \cdot P \cdot 100}{S_0 \cdot 10 \cdot m_1 \cdot 100} = \frac{S_1 \cdot m_0 \cdot P}{S_0 \cdot m_1},$$

де: S_1 – площа піка маніту, обчислена з хроматограми випробовуваного розчину;

S_0 – площа піка СЗ маніту, обчислена з хроматограми розчину порівняння (а);

m_0 – маса наважки СЗ маніту, взятого для приготування розчину порівняння (а), в грамах;

m_1 – маса наважки маніту, в грамах;

P – вміст основної речовини у СЗ маніту в перерахуванні на безводну речовину, взятого для приготування розчину порівняння (а), у відсотках;

Вміст D-маніту має бути не менше 97,0 % і не більше 102,0 % у перерахунку на суху речовину.

13. Мікробне навантаження.

Визначення мікробного навантаження проводять методом мембранної фільтрації на колекторі фірми «Міліпор» з використанням мембранних фільтрів EZPак з розміром пор 0,45 мкм.

Випробування проводять в чистому приміщенні класу D в ламінарній шафі (зона А).

Відібрану пробу приготованого розчину в об'ємі 100 мл фільтрують через мембранний фільтр, попередньо зволожений невеликою кількістю розчину промивної рідини (буферним розчином з натрію хлоридом і пептоном рН7.0).

Після завершення фільтрації фільтр поміщають на поверхню середовища соєво-казеїновий агар в чашку Петрі. Інкують протягом 5-ти діб при температурі від 30°C до 35°C.

Негативний контрольний дослід.

Пропускають 100 мл промивної рідини через мембранний фільтр. Після закінчення фільтрації фільтр поміщають на поверхню середовища соєво-казеїновий агар в чашку Петрі. Інкують протягом 5-ти діб при температурі від 30°C до 35°C.

Після закінчення терміну інкубації проводять підрахунок колоній на мембранних фільтрах.

В негативному контролі ріст мікроорганізмів повинен бути відсутній.

Результати випробування занести в протоколи.

Максимально допустиме мікробне навантаження – не більше 10 КУО в 100 мл розчину.

14. Герметичність флаконів.

10 флаконів з лікарським засобом після стерилізації занурюють в вертикальному положенні в 0,1 % розчин *метиленового синього Р* і знижують зовнішній тиск на 27 кПа протягом 10 хв.

Підвищують тиск до атмосферного і залишають флакони в розчині протягом 30 хв. Промивають флакони ззовні. Жоден з флаконів не повинен мати будь-яких слідів забарвленого розчину.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Wisselink H. W. et al. Mannitol production by lactic acid bacteria: a review //International Dairy Journal. – 2002. – Т. 12. – №. 2-3. – С. 151-161.
2. Grobgen G. J. et al. Spontaneous formation of a mannitol-producing variant of *Leuconostoc pseudomesenteroides* grown in the presence of fructose //Applied and Environmental Microbiology. – 2001. – Т. 67. – №. 6. – С. 2867-2870.
3. Efiuvwevwere B. J. O. et al. Mannitol-enhanced survival of *Lactococcus lactis* subjected to drying //Applied microbiology and biotechnology. – 1999. – Т. 51. – №. 1. – С. 100-104.
4. Ghoreishi S. M., Shahrestani R. G. Innovative strategies for engineering mannitol production //Trends in food science & technology. – 2009. – Т. 20. – №. 6-7. – С. 263-270.
5. De Cock P. Erythritol. In: O' Donnell, K., Kearsley, M.W. Sweeteners and Sugar Alternatives in Food Technology. *Wiley-Blackwell*. 2012; 213-241.
6. Deis R.C., Kearsley M.W. Sorbitol and mannitol. In: O' Donnell, K., Kearsley, M.W. (Eds.), Sweeteners and Sugar Alternatives in Food Technology. *Wiley-Blackwell*. 2012; 331-346.
7. Sentko A., Willibald-Ettle I. Isomalt. In: O' Donnell, K., Kearsley, M.W. (Eds.), Sweeteners and Sugar Alternatives in Food Technology. *Wiley-Blackwell*. 2012; 242-274.
8. Zacharis C. Lactitol. In: O' Donnell, K., Kearsley, M.W. (Eds.), Sweeteners and Sugar Alternatives in Food Technology. *Wiley-Blackwell*. 2012; 275-293.
9. Park Y.C., Oh E.J., Jo J.H., Jin Y.S., Seo J.H. 2016. Recent advances in biological production of sugar alcohols. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2016; 37: 105-113.
10. Chakraborty R., Das A. Artificial sweeteners. *Ency. Food Chem.* 2019; 1: 30-34.

11. Schallmey M., Frunzke J., Eggeling L., Marienhagen J. Looking for the pick of the bunch: high-throughput screening of producing microorganisms with biosensors. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2014; 26: 148-154.
12. Arcan˜o Y.D., Garcı’a O.D.V., Mandelli D., Carvalho W.A. Xylitol: a review on the progress and challenges of its production by chemical route. 2018.
13. Dasgupta D., Bandhu S., Adhikari D.K., Ghosh D. Challenges and prospects of xylitol production with whole cell bio-catalysis: a review. *Microbiol. Res.* 2017;197: 9-21.
14. Chandel A.K., Silva S.S., Carvalho W., Singh O.V. Sugarcane bagasse and leaves: foreseeable biomass of biofuel and bioproducts. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2012; 87: 11-20.
15. Rao L.V., Goli J.K., Gentela J., Koti S. Bioconversion of lignocellulosic biomass to xylitol: an overview. *Bioresour. Technol.* 2016; 213: 299-310.
16. Mpabanga T.P., Chandel A.K., Silva S.S., Singh O.V. 2012. Detoxification strategies applied to lignocellulosic hydrolysates for improved xylitol production. In: Silva, S.S., Chandel, A.K. (Eds.), D-xylitol. Fermentative Production, Application and Commercialization. Springer-Verlag, Germany, pp. 63-82.
17. Hou J., Qiu C., Shen Y., Li H., Bao X. Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the efficient co-utilization of glucose and xylose. *FEMS Yeast Res.* 2017; 17 (4): 1-11.
18. Carly F., Fickers P. Erythritol production by yeasts: a snapshot of current knowledge. *Yeast.* 2018; 35: 455-463.
19. Rzechonek D.A., Dobrowolski A., Rymowicz W. Mironczuk A.M. Recent advances in biological production of erythritol. *Curr. Rev. Biotechnol.* 2018;38 (4): 620-633.
20. Tyler C.A., Kopit L., Doyle C., Yu A.O., Hugenholtz J., Marco M.,L., Polyol production during heterofermentative growth of the plant isolate *Lactobacillus florum* 2F. *J. Appl. Microbiol.* 2016; 120: 1336-1345.

21. Regnat K., Mach R.L., Mach-Aigner A.R. Erythritol as sweetener e wherefrom and whereto? *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2018; 102: 578-595.
22. Rakicka M., Rywinska A., Lazar Z., Rymowicz W. Two-stage continuous culture e technology boosting erythritol production. *J. Clean. Prod.* 2017; 168: 420-427.
23. Tomaszewska L., Rywinska A. Erythritol biosynthesis from glycerol by *Yarrowia lipolytica* yeast: effect of osmotic pressure. *Chem. Pap.* 2016; 70: 272-283.
24. Loman A.A., Islam S.M.M., Ju L.K. 2018. Production of arabitol from enzymatic hydrolysate of soybean flour by *Debaryomyces hansenii* fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2018; 102: 641-653.
25. Kordowska-Wiater M. Production of arabitol by yeasts: current status and future prospects. *J. Appl. Microbiol.* 2015; 119: 303-314.
26. Fonseca C., Romã o R., Souza H.R., Hahn-Ha ģerdal B., Spencer-Martins I. L-Arabinose transport and catabolism in yeasts. *FEBS J.* 2007; 274: 3589-3600.
27. Zhang G., Lin Y., He P., Li L., Wang Q., Ma Y. Characterization of the sugar alcohol-producing yeast *Pichia anomala*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2014; 41: 41-48.
28. Jagtap S.S., Rao C.V. Production of D-arabitol from D-xylose by the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* IFO0880. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2018; 102: 143-151.
29. Koganti S., Ju L.K. *Debaryomyces hansenii* fermentation for arabitol production. *Biochem. Eng. J.* 2013; 79: 112-119.
30. Yoshikawa J., Habe H., Morita T., Fukuoka T., Imura T., Iwabuchi H., et al. Production of d-arabitol from raw glycerol by *Candida quercitrusa*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2014; 98 (7): 2947-2953.
31. Mingguo J., Wang B., Yang L., Lin S., Cheng H. Microbiological purification of L-arabitol from xylitol mother liquor. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2011; 21: 43-49.

32. Silveira M.M., Jonas R. The biotechnological production of sorbitol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2002; 59: 400-408.
33. Liu C., Dong H., Zhong J., Ryu D.D.Y., Bao J. Sorbitol production using recombinant *Zymomonas mobilis* strain. *J. Biotechnol.* 2010;148: 105-112.
34. Hatti-Kaul R., Chen L., Dishisha T., Enshasy H.E. Lactic acid bacteria: from starter cultures to producers of chemicals. *FEMS Microbiol. Lett.* 2018; 365: 1-20.
35. Ladero, V., Ramos, A., Wiersma, A., et al. High-level production of the low-calorie sugarsorbitol by *Lactobacillus plantarum* through metabolic engineering. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007; 73: 1864-1872.
36. Dai Y.W., Meng Q., Mu W., Zhang T. Recent advances in the applications and biotechnological production of mannitol. *J Funct Foods.*2017; 6:404–409.
37. André P., Villain F. Free radical scavenging properties of mannitol and its role as a constituent of hyaluronic acid fillers: a literature review. *Int J Cosmet Sci.* 2017; 39(4):355–360.
38. Song S.H., Vieille C. Recent advances in the biological production of mannitol. *Appl Microbiol Biot.* 2009; 84(1):55–62.
39. Kulbe K.D., Schwab U., Gudernatsch W. Enzyme-catalyzed production of mannitol and gluconic acid. Product recovery by various procedures. *Ann N Y Acad.* 2010; 506(1):552–568.
40. Parmentier S., Arnaut F., Soetaert W., Vandamme E.J. Enzymatic production of D-mannitol with *Leuconostoc pseudomesenteroides* mannitol dehydrogenase coupled to a coenzyme regeneration system. *Biocatal Biotransformation.* 2005; 23(1):1–7.
41. Meng Q., Zhang T., Wei W.T., Mu W.M., Miao M. Production of mannitol from a High concentration of glucose by *Candida parapsilosis* SK26.001. *Appl Biochem Biotechnol.* 2017; 181:391–406.

42. Yoshikawa J., Habe H., Morita T., Fukuoka T., et al. Production of mannitol from raw glycerol by *Candida azyma*. *J Biosci Bioeng.* 2014; 117(6):725–729.
43. Fontes CPML., Silveira M.S., Guilherme A., Fernandes F.A.N., Rodrigues S. Substitution of yeast extract by ammonium sulfate for mannitol production in cashew apple juice. *Biocatal Agric Biotechnol.* 2013; 2(1):69–75.
44. Wang P., Ma J., Zhang Y., Zhang M., Wu M., Dai Z., Jiang M. Efficient secretory overexpression of Endoinulinase in *Escherichia coli* and the production of inulooligosaccharides. *Appl Biochem Biotechnol.* 2016; 179(5):880–894.
45. Saha B.C., Racine F.M. Biotechnological production of mannitol and its applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011; 89(4):879–891.
46. Helantola M., Aarnikunnasb J., Weymarna N.V., Airaksinen U., Palvab A., Matti L. Improved mannitol production by a random mutant of *Leuconostoc pseudomesenteroides*. *J Biotechnol.* 2005; 116(3):283–294.
47. Gaspar P., Neves A.R., Ramos A., Gasson M.J., Shearman C.A., Santos H. Engineering *Lactococcus lactis* for production of mannitol: High yields from food-grade strains deficient in lactate dehydrogenase and the mannitol transport system. *Appl Environ Microbiol.* 2014; 70(3):1466–1474.
48. Kaup B., Bringer M.S., Sahn H. D-Mannitol formation from D-glucose in a whole-cell biotransformation with recombinant *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biot.* 2005; 69(4):397–403.
49. Zhang M., Gu L., Cheng C., Zhu J.R., et al. High-yield production of mannitol by *Leuconostoc pseudomesenteroides* CTCC G123 from chicory-derived inulin hydrolysate. *J Ind Microbiol Biot.* 2017; 44(8):1237–1244.
50. Bäumchen C., Roth A.H.F.J., Biedendieck R., Malten M., Follmann M., Sahn H., Bringer-Meyer S., Jahn D. D-Mannitol production by resting state whole cell biotransformation of D-fructose by heterologous mannitol and formate dehydrogenase gene expression in *Bacillus megenterium*. *Biotechnol J.* 2007; 2:1408–1416.

51. Tomaszewska L., Rywin S.A., Gładkowski W. Production of erythritol and mannitol by *Yarrowia lipolytica* yeast in media containing glycerol. *J Ind Microbiol Biot.* 2012; 39(9):1333–1343.
52. Racine F.M., Saha B.C. Production of mannitol by *Lactobacillus intermedius* NRRL B-3693 in fed-batch and continuous cell-recycle fermentations. *Process Biochem.* 2007; 42 (12):1609–1613.
53. Saha B.C., Racine F.M. Effects of pH and corn steep liquor variability on mannitol production by *Lactobacillus intermedius* NRRL B-3693. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2010; 87(2):553–560.
54. Yue M., Cao H.L., Zhang J.P., Li S.G., Meng Y.Y., Chen W., Huang L.S., Du Y.G. Improvement of mannitol production by *Lactobacillus brevis* mutant 3-A5 based on dual-stage pH control and fed-batch fermentations. *World J Microbiol Biot.* 2013; 29(10):1923–1930.
55. Laxman S., Savergave R.V., Gadre B.K., Jogdand V.V. Two-stage fermentation process for enhanced mannitol production using *Candida magnoliae* mutant R9. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2012; 36(2):193–203.
56. Stoop J. M. H., Williamson J. D., Pharr D. M. Mannitol metabolism in plants: a method for coping with stress //Trends in Plant Science. – 1996. – T. 1. – №. 5. – C. 139-144.
57. Chaturvedi V., Bartiss A. N. N., Wong B. Expression of bacterial mtlD in *Saccharomyces cerevisiae* results in mannitol synthesis and protects a glycerol-defective mutant from high-salt and oxidative stress //Journal of Bacteriology. – 1997. – T. 179. – №. 1. – C. 157-162.
58. Kets E. P. W., de Bont J. A. M., Heipieper H. J. Physiological response of *Pseudomonas putida* S12 subjected to reduced water activity //FEMS microbiology letters. – 1996. – T. 139. – №. 2-3. – C. 133-137.
59. Stoop J. M. H., Pharr D. M. Mannitol metabolism in celery stressed by excess macronutrients //Plant Physiology. – 1994. – T. 106. – №. 2. – C. 503-511.

60. Mesghali E. et al. Safety of peripheral line administration of 3% hypertonic saline and mannitol in the emergency department //The Journal of Emergency Medicine. – 2019. – Т. 56. – №. 4. – С. 431-436.
61. Alnemari A. M. et al. A comparison of pharmacologic therapeutic agents used for the reduction of intracranial pressure after traumatic brain injury //World neurosurgery. – 2017. – Т. 106. – С. 509-528.
62. Pasarikovski C. R. et al. Hypertonic saline for increased intracranial pressure after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a systematic review //World neurosurgery. – 2017. – Т. 105. – С. 1-6.
63. Weber A. C. et al. Effect of mannitol on globe and orbital volumes in humans //European Journal of Ophthalmology. – 2018. – Т. 28. – №. 2. – С. 163-167.
64. Debord B. et al. Study of different crystalline forms of mannitol: comparative behaviour under compression //Drug Development and Industrial Pharmacy. – 1987. – Т. 13. – №. 9-11. – С. 1533-1546.
65. Soetaert W. Synthesis of D-mannitol and L-sorbose by microbial hydrogenation and dehydrogenation of monosaccharides : дис. – Ghent University, 1992.
66. Weymarn N. et al. Process development for mannitol production by lactic acid bacteria. – 2002.
67. WorldHealthOrganizationetal. Worldhealthstatistics 2020. – 2020.
68. Смірнова І. П., Горбась І. М., Кваша О. О. Артеріальна гіпертензія: епідеміологія та статистика //Укр. кардіол. журн. – 1998. – Т. 6. – С. 3-8.
69. Смертність в Україні – Оpendатабот. Оpendатабот. URL: <https://opendatabot.ua/open/death-statistics> (дата звернення: 19.09.2022).
70. 8 травня 2021 року – Всесвітній день боротьби з артеріальною гіпертонією | КНП ХОР Обласний центр громадського здоров'я. *КНП ХОР Обласний центр громадського здоров'я* | "КНП ХОР Обласний центр громадського здоров'я". URL: <http://khocz.com.ua/8-travnja-2021-roku-vsivesvitnij-den-borotbi-z-arterialnoju-gipertoniieju/> (дата звернення: 19.09.2022).

71. Маніт: аналоги та замітники препарата в Україні, ціни на них; де придбати замітник Маніт. *Пошук ліків в аптеках - medbrowse.com.ua*. URL: <https://medbrowse.com.ua/ua/mannit-analogi> (дата звернення: 19.09.2022).

72. Осмотичні діуретики - пошук лікарського засобу за фармакотерапевтичними групами - нормативно-директивні документи МОЗ України. Нормативно-директивні документи МОЗ України. URL: <https://mozdocs.kiev.ua/liki.php?nav=2&phgroup=163> (дата звернення: 19.09.2022).

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

74. Monique C. B., Thiago D. Sweeteners and sweet taste enhancers in the food industry. *Food Sci. Technol.* 2018

75. Chen M. et al. Mannitol: physiological functionalities, determination methods, biotechnological production, and applications // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2020. – Т. 104. – №. 16. – С. 6941-6951.

76. Zhang M. et al. Recent advances in microbial production of mannitol: utilization of low-cost substrates, strain development and regulation strategies // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2018. – Т. 34. – №. 3. – С.

77. Ghoreishi S. M., Shahrestani R. G. Innovative strategies for engineering mannitol production // *Trends in food science & technology*. – 2009. – Т. 20. – №. 6-7. – С. 263-270

78. Mesghali E. et al. Safety of peripheral line administration of 3% hypertonic saline and mannitol in the emergency department // *The Journal of Emergency Medicine*. – 2019. – Т. 56. – №. 4. – С. 431-436.

79. Alnemari A. M. et al. A comparison of pharmacologic therapeutic agents used for the reduction of intracranial pressure after traumatic brain injury // *World neurosurgery*. – 2017. – Т. 106. – С. 509-528.

80. Pasarikovski C. R. et al. Hypertonic saline for increased intracranial pressure after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a systematic review // *World neurosurgery*. – 2017. – Т. 105. – С. 1-6.

81. Weber A. C. et al. Effect of mannitol on globe and orbital volumes in humans // *European Journal of Ophthalmology*. – 2018. – Т. 28. – №. 2. – С. 163-167.
82. Маніт: інструкція для медичного застосування, опис, показання, протипоказання, наявність в аптеках. Де придбати препарат Маніт в Україні. Пошук ліків в аптеках - medbrowse.com.ua. URL: <https://medbrowse.com.ua/ua/mannit-instrukcija> (дата звернення: 19.09.2022).
83. Meng Q. et al. Production of mannitol from a high concentration of glucose by *Candida parapsilosis* SK26. 001 // *Applied biochemistry and biotechnology*. – 2017. – Т. 181. – №. 1. – С. 391-406.
84. Zhang M. et al. Recent advances in microbial production of mannitol: utilization of low-cost substrates, strain development and regulation strategies // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2018. – Т. 34. – №. 3. – С. 1-7.
85. Gaspar P. et al. Engineering *Lactococcus lactis* for production of mannitol: high yields from food-grade strains deficient in lactate dehydrogenase and the mannitol transport system // *Applied and environmental microbiology*. – 2004. – Т. 70. – №. 3. – С. 1466-1474.
86. Wisselink H. W. et al. Overproduction of heterologous mannitol 1-phosphatase: a key factor for engineering mannitol production by *Lactococcus lactis* // *Applied and environmental microbiology*. – 2005. – Т. 71. – №. 3. – С. 1507-1514.
87. Soetaert W. Production of D-mannitol and D-lactic acid by fermentation with *Leuconostoc mesenteroides* // *Agro Food Ind. Hi-Tech*. – 1995. – Т. 6. – С. 41-44.
88. von Weymarn N., Hujanen M., Leisola M. Production of D-mannitol by heterofermentative lactic acid bacteria // *Process Biochemistry*. – 2002. – Т. 37. – №. 11. – С. 1207-1213.

89. Weymarn F. N. W. et al. Scale-up of a New Bacterial Mannitol Production Process // *Biotechnology progress*. – 2003. – T. 19. – №. 3. – C. 815-821.
90. Fontes C. P. M. L. et al. Kinetic study of mannitol production using cashew apple juice as substrate // *Bioprocess and Biosystems Engineering*. – 2009. – T. 32. – №. 4. – C. 493-499.
91. Saha B. C. A low-cost medium for mannitol production by *Lactobacillus intermedius* NRRL B-3693 // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2006. – T. 72. – №. 4. – C. 676-680.
92. Saha B. C. Production of mannitol from inulin by simultaneous enzymatic saccharification and fermentation with *Lactobacillus intermedius* NRRL B-3693 // *Enzyme and microbial technology*. – 2006. – T. 39. – №. 5. – C. 991-995.
93. Lee J. K., Song J. Y., Kim S. Y. Controlling substrate concentration in fed-batch *Candida magnoliae* culture increases mannitol production // *Biotechnology progress*. – 2003. – T. 19. – №. 3. – C. 768-775.
94. Lee J. K. et al. Ca²⁺ and Cu²⁺ supplementation increases mannitol production by *Candida magnoliae* // *Biotechnology letters*. – 2007. – T. 29. – №. 2. – C. 291-294.
95. Song K. H. et al. Production of mannitol by a novel strain of *Candida magnoliae* // *Biotechnology letters*. – 2002. – T. 24. – №. 1. – C. 9-12.
96. Yoshikawa J. et al. Production of mannitol from raw glycerol by *Candida azyma* // *Journal of bioscience and bioengineering*. – 2014. – T. 117. – №. 6. – C. 725-729.
97. Hattori K., Suzuki T. Large scale production of erythritol and its conversion to D-mannitol production by n-alkane-grown *Candida zeylanoides* // *Agricultural and Biological Chemistry*. – 1974. – T. 38. – №. 6. – C. 1203-1208.
98. Wang P. et al. Efficient secretory overexpression of endoinulinase in *Escherichia coli* and the production of inulooligosaccharides // *Applied biochemistry and biotechnology*. – 2016. – T. 179. – №. 5. – C. 880-894.

99. Фруктоза 1 кг. prom.ua. URL: <https://prom.ua/p600123916-fruktoza.html>(дата звернення: 19.09.2022).
100. Глюкоза 1кг Харчова добавка, Декстроза. prom.ua. URL: <https://prom.ua/p1187606664-glyukoza-1kg-pishevaya.html> (дата звернення: 19.09.2022).
101. Інулін з цикорію 1 кг Голландія. prom.ua. URL: <https://prom.ua/p667979337-inulin-tsikoriya-gollandiya.html> (дата звернення: 19.09.2022).
102. Monedero V., Pérez-Martínez G., Yebra M. J. Perspectives of engineering lactic acid bacteria for biotechnological polyol production // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2010. – Т. 86. – №. 4. – С. 1003-1015.
103. Барышников Н. А., Беляков Г. В., Таурова А. А., Филиппов А. Н. Фильтрация суспензии через пористую среду с учетом гравитации // *Мембраны и мембранные технологии*. – 2016. – т. 6, № 1. – с. 92–98.
104. Флотация [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://medic.studio/biotehnologii/flotatsiya-70593.html>
105. Черевко О. І., Поперечний А. М. Процеси і апарати харчових виробництв: підручник / О. І. Черевко, А. М. Поперечний. — 2-е видання, доп. та випр. — Х.: Світ Книг, 2014. — 495 с.
106. *Doran P. M. Unit Operations. Bioprocess Engineering Principles*. 2013. P. 445–595.
107. Пирог Т.П., Ігнатова О.А. Загальна біотехнологія: Підручник. – К.: НУХТ, 2009. – 336 с.
108. Clara 20 [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.alfalaval.com/globalassets/documents/products/separation/centrifugal-separators/disc-stack-separators/pchs00013en-clara-20-leaflet.pdf?_gl=1*1ere5vk*_ga*MTEzNDMyMzU4Ni4xNjcyNTY4Njc4*_ga_VR90J5D3K9*MTY3MjU2ODY3Ny4xLjEuMTY3MjU2ODg5MS4wLjAuMA..&_ga=2.48461729.627176643.1672568678-1134323586.1672568678

109. Данилов І. П. Апарати мікробіологічної промисловості [Текст]: навч. посібник І. П. Данилов, С. І Самійленко.-Харків : НТУ «ХП», 2008. – 272.

110. Карлаш Ю.В. Основи проектування біотехнологічних виробництв. [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобувачів освітнього ступеня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» освітньо-професійної програми «Біотехнологія» денної та заочної форм навчання /Ю.В. Карлаш, Є.О. Омельчук - К: НУХТ, 2019. – 252 с.

111. Вакуум випарні установки [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://prom.ua/ua/p4158133-vakuum-vyparnye-ustanovki.html?&primelead=MC43NQ4>

112. Екстракція [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/2323/ekstrakciya>

113. Адсорбція [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/8936/adsorbciya>

114. Кристалізація [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/3732/kristalizaciya>

115. von Weymarn, Niklas. Process development for mannitol production by lactic acidbacteria. Espoo 2002, Helsinki University of Technology.

116. Методи розділення гетерогенних систем [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://kc.pnu.edu.ua/wp-content/uploads/sites/11/2021/02/Processes-and-apparatus-of-chemical-productionLecture6.pdf>

117. The Alfa Laval Foodec range of decanter centrifuges [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.alfalaval.com/globalassets/documents/products/separation/centrifugal-separators/decanter/foodec/Product_leaflet_foodec_en.pdf?_gl=1*15mthuy*_ga*_MTEzNDMyMzU4Ni4xNjcyNTY4Njc4*_ga_VR90J5D3K9*MTY3MjU3NzQ5

[MC4zLjEuMTY3MjU3NzYzNy4wLjAuMA.&_ga=2.53105839.627176643.1672568678-1134323586.1672568678](https://doi.org/10.26907/2542-2075.2020.1134323586.1672568678)

118. Інноваційне обладнання галузі. Змістовий модуль 1. Виробництво препаратів мікробіологічного синтезу [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобувачів освітнього ступеня «Магістр» спеціальності 133 «Галузеве машинобудування» освітньо-професійної програми «Інжиніринг фармацевтичних та біотехнологічних виробництв» денної та заочної форм навчання / О.О. Губеня, В.І. Теличкун, М.Г. Десик, Ю.С. Теличкун. – К.: НУХТ, 2020. – 278 с.

119. Marcial-Coba MS., Knøchel S., Nielsen DS. Low-moisture food matrices as probiotic carriers. *FEMS Microbiol Lett.* 2019; 366 (2).

120. Висушування у віброкиплячому шарі [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://vuzlit.com/234638/visushuvannya_vibrokiplyachomu_shari

121. Saha B. C. A low-cost medium for mannitol production by *Lactobacillus intermedius* NRRL B-3693. *Applied microbiology and biotechnology.* 2006; 72 (4): 676-680.

122. Настанова СТ-Н МОЗУ 42-4.0:2020 Лікарські засоби. Належна виробнича практика.

123. Новые стандарты и новые технологии от компании UniversalPack. *Фармацевтическая отрасль.* 2022; 3 (92).

124. Тара и упаковочные материалы [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://estiw.ru/info/package-n-marking/package>

125. Упаковка и идентифицирующая маркировка фармацевтических субстанций и промежуточной продукции [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://pharmacopoeia.ru/russian-gmp-inspections/pravila-gmp/osnovnye-trebovaniya-k-farmatsevticheskim-substantsiyam-ispolzuemym-v-kachestve-ishodnogo-syrya/upakovka-i-identifitsiruyushhaya-markirovka-farmatsevticheskikh-substantsij-i-promezhutochnoj-produktsii/>

126. Pharmavision 830 — automated particle size and shape measurement [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://cforce.co.uk/PDF/MalvernPVS830.pdf>

127. Визначення масової частки вологи в харчових продуктах та сировині [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://cpo.stu.cn.ua/Oksana/harch_himia_lab_prakt/80.html

128. Shrivastava A., Sharma S., Kaurav M., Sharma A. Characteristics and analytical methods of mannitol: an update. *International Journal of Applied Pharmaceutics*. 2021; 13(3): 20-32.

129. Настанова СТ-Н МОЗУ 42-4.0:2020 Лікарські засоби. Належна виробнича практика.

130. Виробництво стерильної продукції [Електронний ресурс] - Режим доступу: <https://buklib.net/books/36219/>

131. Лич І.В. Промислова технологія лікарських засобів [Електронний 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.

132. Вода для ін'єкцій [Електронний ресурс] - Режим доступу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/1784/voda-dlya-in-yekcij>

133. Ditec [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.tecninox.it/en/product/ditec>

134. Bosch vial washing and sterilizing line, with RRU 3040 washing machine and HQL 2240 sterilising tunnel [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.hauser-maschinen.de/en/confectionery-food/washers-bottle-blowers-sterilisers/bosch-vial-washing-and-sterilizing-line-with-rru-3040-washing-machine-and-hql-2240-sterilising-tunnel>

135. Processing tank [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.tecninox.it/en/product/processing-tank>

136. Aseptic Filling and Closing Machines BOSCH MLF 3002 [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://intimac.it/en/used->

[machines/aseptic-filling-and-closing-machines/aseptic-filling-and-closing-machines-bosch-mlf-3002-/](https://www.zirbus.com/autoclaves/productions-units/)

137. Production Autoclaves for the laboratory, pharmaceutical, food industry and animal husbandry [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.zirbus.com/autoclaves/productions-units/>

138. Horizontal Cartoner SC 5 (up to 200 cartons/min.) [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://iwk.de/en/products-solutions/machinery/horizontal-cartoner-sc-5-up-to-200-cartons-min/>

139. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». — 1-е вид. — Доповнення 2. — Харків: Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр», 2008. — 620 с. ISBN 966-96478-1-9.

140. Маніт [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://mozdocs.kiev.ua/likiview.php?id=5516>

141. Approved Products [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.pharmaxis.com.au/approved-products/bronchitol/>