

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

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

«До захисту в ЕК»

Директор інституту(декан факультету)

Грегірчак Н.М.

(підпис)

(прізвище та ініціали)

« ___ » _____ 2021 р.

«До захисту допущено»

Завідувач кафедри

Пирог Т.П.

(підпис)

(прізвище та ініціали)

« ___ » _____ 2021 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ МАГІСТРА

зі спеціальності _____ 162 «Біотехнології та біоінженерія» _____

(код та назва спеціальності)

освітньо-професійної програми «Фармацевтична біотехнологія» _____

на тему: _____ Біотехнологічний потенціал бактерій роду *Acinetobacter* _____

Виконав: здобувач __2__ курсу, групи __02__

Іванов Микита Сергійович

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Керівник _____ Пирог Тетяна Павлівна _____

(прізвище, ім'я та по батькові повністю)

(підпис)

Консультанти _____

(прізвище та ініціали)

(підпис)

(прізвище та ініціали)

(підпис)

(прізвище та ініціали)

(підпис)

Рецензент _____ Федоренко В.В. _____

(прізвище та ініціали)

(підпис)

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

Здобувач _____

(підпис)

Київ – 2021 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь магістр

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

Освітньо-професійна програма «Фармацевтична біотехнологія»
(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

біотехнології і

мікробіології

Пирог Т.П.

“ 28 ”

жовтня 2020 року

ЗАВДАННЯ

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

Іванова Микити Сергійовича

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Біотехнологічний потенціал бактерій
роду Acinetobacter

керівник роботи Пирог Тетяна Павлівна, д.б.н., професор,

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від “26” жовтня 2020 року № 868-кв

2. Строк подання здобувачем роботи _____

3. Вихідні дані до роботи Ферментер об'ємом 1000 л, коефіцієнт заповнення 0,6,
препарат з ліофілізованим ферментом хондроїтиназою у флаконах, біологічний агент
Acinetobacter sp. C26.

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) Вступ;
Розділ 1. Літературний огляд; Розділ 2. Техніко-економічне обґрунтування випуску
субстанції для лікарського засобу (ЛЗ) та виробництва готової форми ЛЗ; Розділ 3.
Обґрунтування вибору технологічної схеми біосинтезу субстанції та технологічної
схеми виробництва ЛЗ; Розділ 4. Опис технологічного процесу виробничого
біосинтезу; Розділ 5. Опис технологічного процесу виробництва
ЛЗ.

5. Перелік графічного матеріалу

Апаратурна схема 2 листи А1; Технологічна схема 1 лист А1; Технологічна

схема 1 лист

А2

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання _____ 28 жовтня 2020 року _____

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Розділ 1. Літературний огляд	29.08.20-20.09.20	
2	Розділ 2. Техніко-економічне обґрунтування випуску субстанції для лікарського засобу та виробництва готової форми ЛЗ;	21.09.20-01.10.20	
3	Розділ 3. Обґрунтування вибору технологічної схеми біосинтезу субстанції;	02.10.20-12.10.20	
4	Розділ 4. Опис технологічного процесу виробничого біосинтезу;	14.10.20-29.10.20	
5	Розділ 5. Опис технологічного процесу виробництва ЛЗ	30.10.20-17.11.20	
6	Оформлення апаратурної та технологічної схеми	20.11.20-10.12.20	
7	Оформлення вступу та реферату	15.12.20-25.12.20	

Здобувач

_____ (підпис)

Іванов М.С.

_____ (прізвище та ініціали)

Керівник роботи

_____ (підпис)

Пирог Т.П.

_____ (прізвище та ініціали)

РЕФЕРАТ

Бактерії роду *Acinetobacter* здатні до синтезу широкого спектру практично цінних цільових продуктів: високомолекулярних емульгаторів (емульсан, дисперсан, аласан), аналогів у світі яких не існує, оскільки інші мікроорганізми не здатні до синтезу подібних сполук, низькомолекулярних поверхнево-активних гліко- і аміноліпідів, ферментів (у тому числі унікальної хондроїтинази), фітогормонів. Представники роду *Acinetobacter* здатні до сольобілізації фосфатів і деструкції різних ксенобіотиків (аліфатичних та ароматичних вуглеводнів, пестицидів, інсектицидів).

Представлено проект виробництва виробництва ліофілізованого порошку ферменту хондроїтинази культивуванням штаму *Acinetobacter sp. C26*. Розрахована потужність його виробництва становить 5,04 кг на рік.

Технологія виробництва хондроїтинази складається з допоміжних робіт (приготування миючих та дезинфікуючих засобів, приготування та стерилізація поживного середовища, підготовка допоміжних розчинів, підготовки флаконів, ковпачків та пробок) та основних процесів (вирощування інокуляту в колбах на качалці, інокуляторах об'ємами 10 та 100 л, виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 1000 л, центрифугування культуральної рідини, ультрафільтрація, осадження хондроїтинази та відділення осаду центрифугуванням, іонообмінна хроматографія та ультрафільтрація очищеного розчину хондроїтинази, кристалізація та відділення осаду центрифугуванням, сушіння у сублимаційній сушарці, подрібнення, просіювання та фасування на лінії та пакування), що наведені в технологічній та апаратурній схемах.

Дипломний проект викладений на 201 сторінках друкованого тексту, містить 22 таблиці, 20 рисунків і складається з вступу, п'яти розділів, списку використаної літератури (100 джерел) та графічної частини (3 креслення формату А1 та 1 креслення формату А2).

Ключові слова: *Acinetobacter sp. C26*, хондроїтинази, фермент, стерильні лікарські засоби.

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	4
ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД	9
РОЗДІЛ 1	9
РОЗДІЛ 2. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ВИПУСКУ СУБСТАНЦІЇ ДЛЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ (ЛЗ) ТА ВИРОБНИЦТВА ГОТОВОЇ ФОРМИ ЛЗ.	36
2.1 Передумови виробництва ЛЗ.....	36
2.1.1 Аналіз фармакологічних властивостей цільового ЛЗ, галузей використання	36
2.1.2 Обсяг ринку та очікувані темпи його розвитку	37
2.1.3 Вибір форми випуску ЛЗ	37
2.1.4 Опис лікарського засобу згідно АНД (проект АНД)	38
2.1.5 Розрахунок річної потужності виробництва ЛЗ та кількості серій на рік	62
2.2 Розрахунок потреби субстанції для випуску ЛЗ	62
2.2.1 Перелік виробників кінцевого продукту і виробників (постачальників) субстанції	63
2.2.2 Розрахунок річної потужності виробництва субстанції, об'єму ферментера та кількості виробничих циклів.....	63
РОЗДІЛ 3. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ СУБСТАНЦІЇ ТА ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА ЛЗ	69
3.1. Обґрунтування вибору біологічного агенту, поживного середовища для його культивування.....	69
3.2. Обґрунтування вибору способу культивування і типу ферментера	74
3.3. Обґрунтування стадій виділення і очищення субстанції для виробництва ЛЗ.....	78
3.3.1 Обґрунтування способу відділення культуральної рідини від біомаси	79
3.3.2 Обґрунтування способу виділення цільового продукту з супернатанту	84
3.3.3 Обґрунтування способу попередньої очистки цільового продукту.....	88
3.3.4 Обґрунтування способу очищення цільового продукту	91
3.3.5 Обґрунтування способу сушіння	96
3.4 Обґрунтування вибору класів чистоти виробничих приміщень виробництва ЛЗ, вибору первинної упаковки та її підготовки.....	109

РОЗДІЛ 4. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ	120
4.1 Специфікація обладнання ділянки виробничого біосинтезу.....	120
4.2 ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ... 	123
4.3 КОНТРОЛЬ ДІЛЯНКИ БІОСИНТЕЗУ.....	135
РОЗДІЛ 5. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ ВИРОБНИЦТВА ЛЗ.....	144
5.1 Специфікація обладнання ділянки виробництва ЛЗ.....	144
5.2 ОПИС ОСНОВНИХ СТАДІЙ ПРОЦЕСУ ВИРОБНИЦТВА ЛЗ	149
ВИСНОВКИ.....	172
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	173
АПРОБАЦІЯ РОБОТИ.....	182

ВСТУП

Щорічно випадків, що призводять до травм спинного мозку нараховують 276 000. Причинами травм, як правило, є нещасні випадки. На сьогодні лише одна фармакологічна терапія – це використання кортикостероїдів, зокрема метилпреднізолону. За останніми даними використання стероїдних препаратів зменшується в останні десятиліття. Зниження зумовлене сприйняттям ризиків, пов'язаних із лікуванням кортикостероїдами (тобто шлунково-кишковими кровотечами та інфекцією рани) та потенційно обмеженою терапевтичною цінністю та вікном лікування (8 год) [69].

Основною проблемою при лікуванні травм є те, що на місцях ураження розвивається так званий гліальний рубець, що містить молекули протеогліканів, які інгібують регенерацію нервових клітин (аксонів) [71].

На сьогоднішній день терапія трансплантації стовбурових клітин показала перспективність у лікуванні травм спинного мозку. Виявлено, що нейронні стовбурові клітини сприяють покращенню, однак є потенційні недоліки через недостатнє розуміння процесів, які необхідно враховувати та вирішувати при розробленні терапевтичних препаратів на їх основі у клінічних цілях.

Використання ферментів для лікування є досить багатообіцяючим з огляду на безпечність лікування. Британські вчені встановили, про використання ферменту хондроїтинази, як терапевтичний метод при лікуванні травм спинного мозку [70].

Останніми роками з'явилась інформація щодо здатності деяких представників роду *Acinetobacter* до синтезу унікальних ферментів до яких належать хондроїтинази. Інтерес до них зумовлений тим, що вони мають перспективи у використанні при лікуванні травм спинного мозку [71].

НУХТ БТЕК 02.02.06 КР ПЗ

ВСТУП

Кафедра БТМ

7

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Іванов М.С.			ВСТУП	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Пирог Т.П.					7	2
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

Тому метою даної роботи є узагальнення наукової літератури для структуризації інформації щодо біотехнологічного потенціалу бактерій роду *Acinetobacter*. У інженерній частині роботи буде розроблено апаратурно-технологічну схему отримання хондроїтинази АВС з використанням клітин *Acinetobacter* sp. С26.

ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

РОЗДІЛ 1

БІОТЕХНОЛОГІЧНИЙ ПОТЕНЦІАЛ БАКТЕРІЙ РОДУ *ACINETOBACTER*

Бактерії роду *Acinetobacter* здатні до синтезу великої кількості практично цінних цільових продуктів з різним хімічним складом. Рід *Acinetobacter* можна вважати мультифункціональним порівняно з іншими родами через синтез широкого спектру сполук відмінних за своєю природою.

1.1 Синтез практично цінних продуктів бактеріями роду *Acinetobacter*

Деякі представники здатні акумулювати поліфосфати [1], здатні розкладати різноманітні ксенобіотики (бензол, толуол, етилбензол) [2], є продуцентами гіберелінів [3], низькомолекулярних поверхнево-активних речовин [4], ферментів [5], біополімерів. Зокрема першими цінними продуктами були високомолекулярні гетерополісахариди, відомі під загальною назвою «емульсани» [6]. Упродовж останніх років з'явилися перші повідомлення [20, 21] про здатність бактерій роду *Acinetobacter* синтезувати низькомолекулярні ПАВ. Мікробні поверхнево-активні речовини, за своїми властивостями не поступаються синтетичним аналогам, проте на відміну від останніх їм притаманні такі переваги, як біодеградабельність і відсутність токсичності, що робить перспективними їхнє застосування для розробки нових екологічно безпечних технологій.

1.1.1 Поверхнево-активні речовини

З літературних джерел [7–19, 31] відомо, що бактерій роду *Acinetobacter* здатні до синтезу поверхнево-активних речовин різної природи (гліколіпіди, рамноліпіди, ліпопептиди, глікопротеїни) на субстратах: із сировою нафтою [8–12, 16], олієвмісних субстратах [14, 16, 31], інших вуглеводневих субстратах [13] та гідрофільних субстратах [15–19].

НУХТ БТЕК 02.02.06 КР ПЗ

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		<i>Іванов М.С.</i>			Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		<i>Пирог Т.П.</i>				9	26
Консультант					Кафедра БТМ ⁹		
Н. Контр.							
Затверд.		<i>Пирог Т.П.</i>					

РОЗДІЛ 1.
ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

За хімічною природою ПАР синтезовані на гідрофобних та гідрофільних субстратах є гліколіпідами [8, 14, 15, 19, 31] та ліпопептидами [9, 10, 16], або в роботах не визначали [11–13, 17, 18]. При вивченні здатності до синтезу низькомолекулярних ПАР автори у більшості робіт визначали за показником зниження поверхневого натягу [9–15, 17, 19], в деяких роботах визначали концентрацію в г/л після екстракції органічними розчинниками [8, 9, 11, 14, 16, 31] і в деяких за індексом емульгування [8, 11–16, 18].

Основна кількість робіт присвячена синтезу на вуглеводневих субстратах [8–14, 16, 31], що зрозуміло, так як вони були виділені із забруднених вуглеводнями середовищ і передбачаються для деструкції ксенобіотиків. Так дослідники у роботах [8–12, 16] виділили бактерії роду *Acinetobacter* з забруднених вуглеводнями ґрунтів та вирощували їх на середовищах з сировою нафтою різної концентрації (0,5 – 5 %). Концентрація ПАР різнилася від 0,12 г/л штамом *A. baumannii* MKS2 [8] до 4,68 г/л *A. baumannii* MN3 [16]. Щодо використання інших вуглеводневих, є інформація [13] про синтез штамом *Acinetobacter* sp. YC-X 2 ПАР на гексадекані в якості субстрату, із здатністю до зниження поверхневого натягу до 32,5 мН/м.

Інша група дослідників використовували в якості субстрату олієвмісні середовища [14, 16, 31]. Так, *Dong* зі співавт. [14] виділили новий штам *A. junii* BD, що продукує поверхнево-активні речовини, що зменшують поверхневий натяг до 30,27 мН/м. ПАР, що продукуються штамом, ідентифікували за допомогою маспектрометрії як гліколіпіди. Встановили, що використовуючи як джерело вуглецю рафіновану соєву олію концентрація ПАР становила 4 г/л. Як найбільш конкурентоспроможний можна виділити штам *A. calcoaceticus* IMB B-7241 виділений групою вчених під керівництвом *Пирог* [31] який синтезував найбільшу кількість ПАР (8,5 г/л), гліколіпідної природи на середовищі з високою концентрацією відпрацьованої соняшникової олії (4 %).

Групами вчених [15–19] було виділено бактерії роду *Acinetobacter*, що синтезують ПАР на гідрофільних субстратах (гліцерин, етанол, метанол, сахароза, глюкоза, манітол). Серед всіх можна приділити увагу до штаму *Acinetobacter* sp.

АСMS25 виділений *Devaraj* зі співавт. [15], який за культивування на середовищі з 2% гліцерину знижував поверхневий натяг до 37,6 мН/м. Встановлено, що ПАР мають гліколіпідну структуру, але концентрацію ПАР у роботі не визначали. Загальна характеристика поверхнево-активних речовин синтезованих бактеріями роду *Acinetobacter* представлена у табл. 1.1.

Дані наведені у таблиці 1.1 свідчать, що сферою практичного використання поверхнево-активних речовин є утилізація та біодеградація промислових відходів таких речовин: сирої нафти, дизелю, відпрацьованої олії за рахунок використання їх у якості субстратів. Найбільшу концентрацію ПАР та найбільшу конкурентоспроможність мають штам *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 з концентрацією до 8,5 г/л [31], штам *A. baumannii* MN3 (4,68 г/л) [16] та штам *A. junii* ВD (4,0 г/л) [14]. Найбільш доцільним для використання в утилізації промислових відходів є штам *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 за рахунок високої концентрації відходів у середовищі.

Характеристика поверхнево-активних речовин синтезованих бактеріями роду *Acinetobacter*

Штам	Джерело вуглецю	Склад ПАР	Концентрація, г/л	Зниження поверхневого натягу, мН/м	Індекс емульгування E ₂₄ , %	Сфери практичного застосування	Література
Вуглеводневі субстрати							
<i>A. baumannii</i> MKS2	Сира нафта, 1 %	Гліколіпіди	0,12	-	45	Біодеградація нафти	[8]
<i>Acinetobacter</i> sp. D3-2	Сира нафта, 0,5 %	Ліпопептиди	0,52	26,3	-	Біодеградація нафти	[9]
<i>A. baylyi</i> ZJ2	Сира нафта, 1 %	Ліпопептиди	-	35	-	Біодеградація нафти	[10]
<i>A. bouvetii</i> BP18	Сира нафта, 3% дизельне паливо, 2 %	-	0,17	30,72	50,43	Біодеградація парафінів, нафти, дизелю	[11]
<i>A. junii</i> B6	Легкі фракції нафти, 5 %	-	-	45	51	Біодеградація нафти	[12]
<i>Acinetobacter</i> sp. YC-X 2	Гексадекан, 3,2 %	-	-	32,5	54	Хімічна промисловість	[13]
<i>A. junii</i> BD	Рафінована соєва оля, 1 %	Гліколіпіди	4,0	30,27	57	Біодеградація нафти	[14]
<i>A. calcoaceticus</i> IMB B-7241	Відпрацьована оля, 4 % Відходи біодизелю, 7 %	Гліколіпіди	8,5	-	-	Утилізація промислових відходів	[31]

Інші субстрати							
<i>Acinetobacter</i> sp. ACMS25	Гліцерин, 2 %	Гліколіпіди	-	37,6	64,6	Антимікробна активність щодо <i>Xanthomonas</i> <i>oryzae</i>	[15]
<i>A. baumannii</i> MN3	Сира нафта 1 %, сахароза 5 %, кокосова олія 1 %, манітол 1 %, гліцерин 5 %	Ліпопептиди	4,68	-	36,4	Біодеградація нафти	[16]
<i>A.</i> <i>calcoaceticus</i> BU03	Глюкоза, 1 %	-	-	45		Біодеградація нафталіну, фенантрону	[17]
<i>Acinetobacter</i> sp. USTB-X	Етанол 1%, Метанол 1 %	-	-	-	15	Біодеградація пірену	[18]
<i>A. indicus</i> M6	-	Гліколіпопротеїни	-	39,8	-	Антимікробний агент щодо <i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> ; деструкція біоплівки <i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>	[19]

Примітка: «-» - дані не наведено.

Розробка високоефективних технологій поверхнево-активних речовин

Мікробні поверхнево-активні речовини за властивостями, такими як біодеградабельність і відсутність токсичності, є перспективними для розробки нових екологічно безпечних технологій. Тому розробка високоефективних технологій дасть можливість інтенсифікувати біотехнологічні процеси в промисловості.

Використання суміші ростових субстратів

У роботах [20, 21] встановлено здатність *Acinetobacter calcoaceticus* IMB В-7241 використовувати як моносубстрати гексадекан, етанол, гліцерин. Далі було досліджено особливості метаболізму цих субстратів за рахунок дослідження субстратної специфічності НДМА-залежних алкогольдегідрогеназ. Встановлено, що гексадекан є енергетично надлишковим, а гліцерин і етанол енергетично дефіцитними субстратами. На цій підставі дослідники емпірично об'єднували і склали деякі комбінації субстратів. Досліджували синтез ПАР залежно від способу підготовки інокуляту, зокрема природи джерела вуглецю і концентрації субстратів. Такі наступні експерименти показали, що на суміші гексадекану і гліцерину виявилася максимальна концентрація ПАР 1,1 г/л, при використанні гексадекану для вирощування інокуляту. Більшість дослідників емпірично підбирають концентрації моносубстратів у суміші, але більш коректним є теоретичний розрахунок. Тому на наступному етапі [22] розраховували теоретичне молярне співвідношення субстратів (суміші гексадекану з етанолом, глюкозою і гліцерином) і встановлено, що найвищі показники синтезу ПАР на середовищі з сумішшю гексадекану і гліцерину за співвідношення 1:7. При подальших дослідженнях [23] за рахунок знаходження оптимального співвідношення С/Н, що становить 30 вдалося підняти концентрацію ПАР до 2,5 г/л. В наступних дослідженнях [24] очищений гліцерин замінили на технічний. Це було зумовлено великими об'ємами технічного гліцерину (побічний продукт синтезу біодизелю) та його токсичністю, що дозволить утилізувати його використовуючи як субстрат. При теоретично розрахованому співвідношенні гексадекану і технічного гліцерину 1:8 відбувалася інтенсифікація синтезу ПАР на 22-47 % у порівнянні з

моносубстратами, причиною чого може бути компоненти технічного гліцерину, які підвищують активність ферментів синтезу ПАР.

Підсумовуючи, дослідниками було підвищено синтез ПАР до 2,5 г/л при культивуванні на суміші гексадекану і гліцерину як енергетично нерівноцінних субстратах та оптимізації співвідношення C/N.

Використання промислових відходів

Проблема утилізації промислових відходів є як ніколи актуальною сьогодні. Світове виробництво біодизелю зростає, так випуск продукції збільшився на 7% у річному обчисленні в 2018 році, досягнувши 64 мільярди літрів, але середнє зростання виробництва лише 3% на рік очікується протягом наступних п'яти років. Прогнозують до 2030 року підвищення виробництва до 152 мільярдів літрів [25]. Окрім технічного гліцерину, який є дуже токсичним, іншими відходами які утворюються у величезних кількостях є відпрацьовані олії утворювані у процесі обробки харчових продуктів. Кількість виробництва харчових олій у світі на 2019 рік становить 207,5 млн тон і зростає на 5-10 % кожен рік [26]. Такими ж темпами зростає об'єми відпрацьованих олій які потребують утилізації.

Використання відходів виробництва біодизелю – технічного гліцерину

Тому в продовж останніх років група вчених під керівництвом Пирог [24, 27, 28] займалися використанням технічного гліцерину для отримання ПАР *Acinetobacter*. Недоліком технічного гліцерину є те, що його потрібно попередньо очищувати і для цього перш ніж перейти до культивування на технічному гліцерині дослідники модифікували середовище з очищеним гліцерином додаючи усереднені концентрації компонентів технічного (хлорид калію, натрію, етанолу, метанолу) [24]. Встановили, що додавання калій і натрій хлориду до середовища з 1% очищеним гліцерином не інгібують, а навпаки інтенсифікують синтез ПАР підвищуючи умовну концентрацію на 5-10 % до 2,5-2,8. Додавання етанолу чи метанолу дозволило ще підвищити умовну концентрацію з 2,5 до 3,6. Далі дослідники взяли саме технічний гліцерин. При утилізації промислових відходів основним є те, щоб концентрація субстрату була максимальна, через те наступні дослідження були присвячені синтезу ПАР з максимально можливою

концентрацією технічного гліцерину [28]. Підвищення концентрації гліцерину до 6 % так як і тривалості культивування до 168 годин (замість 120 год) не дало підвищення концентрації ПАР на базовому середовищі. Збільшивши концентрацію інокуляту до 10-15 % інокуляту підвищили синтез ПАР на 20-22 %. Основним діючим параметром було встановлення оптимального співвідношення C/N; підвищення вмісту джерела азоту вдвічі дало змогу підвищити синтез ПАР до 5,2 г/л при вмісті гліцерину 7 %.

Використання відпрацьованої олії

Пирог зі співавт. [27] інтенсифікували синтез ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 використовуючи відпрацьовану олію як субстрат. На першому етапі використовували вуглецевмісні компоненти (м'яса, глюкоза) для отримання посівного матеріалу, оскільки вони можуть бути попередниками синтезу гліколіпідів, що входять до складу ПАР. За результатами експерименту, підвищили синтез ПАР на середовищі з 2 % відпрацьованої олії порівняно з використанням олійних субстратів з 1,1 г/л до 1,8 г/л. Також в якості попередників біосинтезу гліколіпідів до середовища культивування з 2 % відпрацьованої олії додавали глюкозу (0,1%), що призвело до підвищення синтезу ПАР до 6,8 г/л. На наступному етапі [29] підвищували концентрацію рафінованої олії у середовищі задля найефективнішого використання. Підвищення олії до 5 % показувало зниження вмісту ПАР до 3,7 г/л порівняно з вмістом олії 4 % і концентрації 4,9 г/л. Визначивши оптимальну концентрацію рафінованої олії наступним етапом була заміна на відпрацьовану олію [30]. Спочатку замінивши джерело вуглецю для інокуляту на рафіновану олію, синтез ПАР зменшився до 3,4 г/л на середовищі з 4 % олії, проте подальша заміна джерела вуглецю на відпрацьовану олію підвищило вміст ПАР до 4,3 г/л, що може бути обумовлено захистом клітин від токсичних сполук відпрацьованої олії. Оскільки якість олії залежить від вмісту сполук у ній, на наступному етапі [31] досліджували різні види відпрацьованої олії, зокрема після смаження м'яса, картоплі селянської, картоплі фрі. Найвищі показники були за використання відпрацьованої олії після смаження м'яса. Додавання 0,1 % глюкози для інтенсифікації синтезу ПАР не мало результату. Тим самим найвища

концентрація ПАР (8,5 г/л) спостерігалася при використанні 4 % відпрацьованої олії після смаження м'яса.

Таким чином, в результаті досліджень було запропоновано кілька підходів до поліпшення синтезу поверхнево-активної речовини за допомогою *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 як у середовищі з сумішшю субстратів так і на промислових відходах. Реалізація цих підходів супроводжувалась збільшенням концентрації позаклітинних ПАР у кілька разів (табл. 1.2).

Способи інтенсифікації синтезу поверхнево-активних речовин на середовищах різного складу штамом

Acinetobacter calcoaceticus IMB B-7241

Джерело вуглецю	Елемент інтенсифікації	Концентрація ПАР, г/л		Література
		До інтенсифікації	Після інтенсифікації	
Гексадекан, 0,5 %	Вирощування інокуляту на 0,5 % гексадекани; Молярне співвідношення 1:7; Співвідношення C/N 30:1	0,71	2,5	[20–23]
Очищений гліцерин, 0,5 %		0,94		
Технічний гліцерин, 7 %	Збільшення вмісту інокуляту до 15 %; Підвищення вмісту джерела азоту до 0,7 г/л	2,9	5,2	[24, 27, 28]
Відпрацьована олія, 4 %	Використання відпрацьованої олії після смаження м'яса; Використання відпрацьованої олії для підготовки інокуляту; Внесення 0,1 % глюкози, 0,1 % цитрату і фумарату; Збільшення концентрації сечовини до 1 г/л	1,1	8,5	[27, 29–31]

Біологічна активність поверхнево-активних речовин

Формування мікробних біоплівочок на різних поверхнях обладнання в харчовій промисловості та медицині є небезпечним явищем, оскільки мікроорганізми в їх складі характеризуються підвищеною резистентністю до різних біоцидів. Зважаючи на актуальність цієї проблеми останніми роками вченими були досліджені антиадгезивні та антимікробні властивості поверхнево-активних речовин як агентів, здатних запобігати утворенню біоплівочок та можливості деструкції біоплівочок використовуючи ПАР.

Антиадгезивні властивості поверхнево-активних речовин

У 2014 році з'явилися повідомлення [32] про антиадгезивні властивості ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241. На першому етапі підбирали ефективні концентрації ПАР у вигляді культуральної рідини чи супернатанту по відношенню до бактерій *E. coli* ІЕМ-1, *B. subtilis* БТ-2, дріжджів *C. albicans* Д-6, мікроміцетів *A. niger* Р-3. Згідно результатів, висока антиадгезивна активність була за нижчої концентрації ПАР при досліджуваних 0,003-0,036 мг/мл. Так при концентрації ПАР 0,018 мг/мл адгезія бактерій і дріжджів становила всього 10-15%. Попередньо було показано, що заміна дріжджового автолізу та мікроелементів на сульфат заліза та міді призводить до інтенсифікації синтезу ПАР через активації ними ферментів синтезу, тому у наступних дослідках [33, 34] визначали вплив факторів росту та мікроелементів на антиадгезивні властивості ПАР. Встановлено, що за наявності дріжджового автолізу та мікроелементів адгезія клітин була в середньому на 20 % меншою ніж з сульфатом міді та заліза, що автори пояснюють зміною співвідношення аміноліпідів (є більш ефективними антиадгезивними агентами) до інших у складі ПАР, за рахунок активації НАДФ⁺-залежної глутаматдегідрогенази деякими катіонами, що входять до складу мікроелементів [34]. За внесення Zn²⁺, що збільшує активність цього ферменту, дослідники визначили зменшення адгезії бактерій на 12-19 %, тобто катіони цинку є активаторами ключового ферменту синтезу аміноліпідів.

У 2017 роках дослідники під керівництвом Пирог [35, 36] порівняли антиадгезивні властивості ПАР при культивуванні на промислових відходах, таких

як відпрацьована олія та технічний гліцерин. Встановлено, що адгезія *L. mesenteroides* ПБ-7, *E. cloacae* С-8, *C. albicans* Д-6 на досліджуваних абіотичних поверхнях, оброблення розчин ПАР, синтезованих на відходах виробництва біодизелю, були у 1,6-4 рази вищою, ніж на очищеному [35]. Однією з причин є інгібування катіонами калію та натрію, що містяться у технічному гліцерині НАДФ⁺-залежну глутаматдегідрогеназу і тим самим пригнічення синтезу аміноліпідів. При дослідженні антиадгезивних властивостей на відпрацьованій олії [36] встановлено, що адгезія досліджуваних тестових культур була практично однаковою для ПАР, синтезованих як на рафінованій, так і на відпрацьованій олії. Так, кількість клітин *B. subtilis*, прикріплених до різних поверхонь, становила 27–48%, *S. aureus* BMS-1 - 25–58%, а *C. albicans* D-6 - 40–65%.

Антимікробні властивості поверхнево-активних речовин

За останні роки з'явилася інформація [35, 36, 37, 38] про антимікробні властивості ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241. Пирог зі співавт. було встановлені антимікробні властивості ПАР залежно від природи вуглецевого живлення, наявності факторів росту та мікроелементів. Критерієм активності слугування мінімальна інгібуюча концентрація (МІК), як найбільш точний метод та можливість використання для визначення кількох антимікробних агентів. Встановлено, що МІК головним чином залежала від наявності дріжджового автолізу, мікроелементів, а не від джерела вуглецю (етанол, гексадекан, гліцерин), що пояснюється активацією катіонами ферментів біосинтезу ПАР. При порівнянні з середовищем з катіонами цинку, міді, залізо МІК була на майже вдвічі більшою і становила від 18-75 мкг/мл. Наступним етапом досліджень було визначення антимікробної активності при культивуванні на промислових відходах. У роботах [35, 38] встановлено, що антимікробна активність розчинів ПАР, синтезованих на технічному гліцерині, щодо бактеріальних та дріжджових тест-культур була у 2–8 разів нижчою порівняно з встановленою для поверхнево-активних речовин, одержаних на очищеному субстраті, що може бути зумовлено інгібуванням ферментів речовинами, що містяться у технічному гліцерині. Незважаючи на нижчі у кілька разів значення МІК ПАР, ці показники (0,96—15,2

мкг/мл) є досить низькими і свідчать про досить високу антимікробну активність препаратів. У роботах [36, 38] визначали МІК поверхнево-активних речовин, синтезованих *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на середовищі з різними видами 4% відпрацьованої олії: МІК щодо *E. coli* ІЕМ-1 таких ПАР перебували у межах 500—850 мкг/мл, у той час як МІК препарату, утвореного на середовищі з аналогічною концентрацією рафінованої олії була на порядки нижчою (16 мкг/мл). Це пояснюється, що утворювані під час смаження сполуки є потенційними інгібіторами синтезу певних компонентів комплексу ПАР, відповідальних за антимікробну активність.

Здатність поверхнево-активних речовин до деструкції біоплівок

Пирог зі співавт. [35, 36, 39] встановлювали здатність деструкції біоплівок *E. coli* ІЕМ-1, *B. subtilis* БТ-2, *S. aureus* БМС-1, дріжджів *C. albicans* Д-6. Дослідивши властивості різних ступенів очищення ПАР синтезованих на різних вуглецевих субстратах (гексадекан, гліцерин, етанол) встановили, що всі препарати ПАР у концентрації 0,04–1,28 мг/мл руйнували біоплівки мікроорганізмів залежно від джерела вуглецю, хоча у всіх дослідах ступінь руйнування підвищувався зі збільшенням концентрації ПАР. Так максимальний ступінь руйнування біоплівки *E. coli* ІЕМ-1 після обробки ПАР (вирощений на етанолі) (1,28 мг/мл) становив 53 % а щодо *B. subtilis* БТ-2 - 86 % за концентрації 0,64 мг/мл, для *S. aureus* БМС-1 та *C. albicans* Д-6 максимальний ступінь деструкції становив 88 % та 42 % відповідно вирощеним на гексадекані. У роботі [35] дослідники замінивши очищений гліцерин на технічних гліцерин підсумували, що максимальна деструкція біоплівки *E. cloacae* С-8 та *L. mesenteroides* ПБ-7 (38–58 %) під впливом розчинів ПАР, утворених на відходах виробництва біодизелю, спостерігалася за концентрації ПАР 62–124 мкг/мл, у той час як аналогічний ступінь її руйнування досягався за нижчої на 2–3 порядки концентрації ПАР, одержаних на очищеному гліцерині (0,95–1,9 мкг/мл). При дослідженні деструкції біоплівки ПАР синтезованими на відпрацьованій олії дослідниками було встановлено, що ступінь деструкції біоплівки мікроорганізмів підвищувався з підвищенням концентрації ПАР, хоча в середньому був на 10-15 % меншим при аналогічних концентраціях на рафінованій

олії [36]. Одержані результати показують, що здатність ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 до руйнування біоплівки залежить від концентрацій ПАР та умов культивування продуцента, зокрема від природи джерела вуглецю у поживному середовищі.

Таблиця 1.3

**Біологічна активність поверхнево-активних речовин штаму
Acinetobacter calcoaceticus ІМВ В-7241**

Субстрат	Тест культура	МІК, мкг/мл	Адгезія на полівінілхлориді*, %	Руйнування біоплівки**, %
Етанол	<i>B. subtilis</i> БТ-2	9	33	86
	<i>E. coli</i> ІЕМ-1	20	22	49
	<i>C. albicans</i> Д-6	9	27	-
Очищений гліцерин	<i>B. subtilis</i> БТ-2	9	25	87
	<i>E. coli</i> ІЕМ-1	34	33	41
	<i>C. albicans</i> Д-6	68	25	32
Гексадекан	<i>B. subtilis</i> БТ-2	27	33	43
	<i>E. coli</i> ІЕМ-1	11	45	47
	<i>C. albicans</i> Д-6	54	47	42
Відходи виробництва біодизелю	<i>B. subtilis</i> БТ-2	0,96	-	-
	<i>E. coli</i> ІЕМ-1	3,8	-	-
	<i>C. albicans</i> Д-6	15,2	86	-
Відпрацьована олія	<i>B. subtilis</i> БТ-2	28,8	34	63
	<i>E. coli</i> ІЕМ-1	0,9	-	25
	<i>C. albicans</i> Д-6	57,6	44	-

Примітка: «-» – дані не наведено; «*» – концентрація ПАР 2,5-5,0 мкг/мл;
«**» – концентрація ПАР 233-1280 мкг/мл.

Отже, проаналізувавши таблицю 1.3, можна сказати, що поверхнево-активні речовини синтезовані на усіх досліджуваних субстратах, у тому числі на токсичних

промислових відходах, характеризуються високою антимікробною та атиадгезивною активністю. Так мінімальні інгібуючі концентрації щодо *B. subtilis* БТ-2, *E. coli* ІЕМ-1, *C. albicans* Д-6 перебували в межах 1-70 мкг/мл, адгезія на полівінілхлориді не перевищувала в середньому 40 % при концентраціях ПАР 2,5-5 мкг/мл; при концентраціях у середньому 750 мкг/мл ПАР забезпечували руйнування біоплівки на рівні 40-60 % досліджуваних тест-культур.

Загалом, якщо порівнювати штами як потенційних продуцентів ПАР, серед досліджених, заслуговують уваги закордонні штами *A. baumannii* MN3 (4,62 г/л) і *A. junii* BD (4 г/л) та *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 (8,5 г/л) як найбільш конкурентоспроможні. Проте досліджений вітчизняними вченими штам *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 поверхнево-активні речовини якого мають ряд переваг, зокрема культивуються на промислових відходах [24, 27–31], так на технічному гліцерині та відпрацьованій олії синтез ПАР складав 5,2-8,5 г/л; їм притаманний широкий спектр застосування (антимікробні, атиадгезивні, здатність до деструкції біоплівок) [32–37], в той час як закордонні штами розглядалися тільки як деструктори ксенобіотиків.

1.1.2 Біоемульгатори

З кінця ХХ століття було відкрита здатність бактерії роду *Acinetobacter* синтезувати біоемульгатори. У 1981 році *A. venetianus* RAG-1 став відомий завдяки своїй здатності синтезувати екзополімер, що має назву емульсан. Пізніше було відкрито біодисперсан, що синтезується штамми *A. calcoaceticus* А2 і HE5 та аласан штамом *A. radioresistens* КА53 [7], але на сьогоднішній день продовжуються дослідження бактерій роду *Acinetobacter* та відкривають біоемульгатори іншого складу та властивостей.

Починаючи з 2009 року з літературних джерел [40–44] виділили, що бактерій роду *Acinetobacter* здатні до синтезу різних за складом речовин з емульгуючими властивостями на вуглеводневих [41, 42] та олієвмісних [40, 43, 44] субстратах. За хімічною природою біоемульгатори, що вирощували на олієвмісних та вуглеводневих субстратах є глікопротеїнами та ліпопротеїнами. При вивченні здатності до синтезу біоемульгаторів автори визначали концентрацію в г/л і за

індексом емульгування, який часто використовують як нескладний тест для первинної оцінки здатності культур до утворення біоемульгаторів.

Група дослідників визначала синтез на вуглеводневих субстратах, там *Vázquez* зі співавт. [42] виділили штамп *A. bouvetii* UAM25, що синтезував біоемульгатор ліпополісахаридної структури в концентрації 0,15 г/л при вирощуванні на 0,8 % гексадекані. Більш економічно вигідніший був штамп *A. beijerinckii* ZRS виділений *Zhao* зі співавт. [41], що синтезував 5,16 г/л емульгатору з індексом емульгування 80 % на середовищі з 2 % гексадекану.

Іншою групою велись дослідження на олієвмісних субстратах [40, 43, 44]. Найвищий синтез спостерігався у роботі [40] при культивуванні штаму *A. baumannii* AC5 на 1 % рафінованій оливковій олії за концентрації емульгатора 5,05 г/л та індексі емульгування 78 %. Більш високий індекс емульгування був встановлений *Adetunji* зі співавт. [44], що культивування штамів *Acinetobacter* sp. Ab9-ES та *Acinetobacter* sp. Ab33-ES на 2 % рафінованій оливковій або соняшниковій оліях в якості джерела вуглецю дозволило отримати емульгатор в концентраціях 4,52 і 4,31 г/л відповідно, а найбільші емульгувальні властивості 83,8 % штаму Ab9-ES мав за 168 год культивування під час стаціонарної фази росту, а Ab33-ES з емульгуючою активністю 80,8 % за 120 год під час пізньої експоненціальної фази. Обидва штами синтезували речовини з емульгуючими властивостями глікопротеїнової природи. Загальна характеристика біоемульгаторів синтезованих бактеріями роду *Acinetobacter* представлена у табл. 1.4.

Характеристика біоемулгаторів синтезованих бактеріями роду *Acinetobacter*

Штам	Джерело вуглецю	Склад	Молекулярна маса, кДа	Концентрація, г/л	Індекс емульгування E24, %	Сфери практичного застосування	Література
<i>A. baumannii</i> AC5	Рафінована оливкова олія, 1 %	Ліпоглікан	-	5,05	78	Антимікробний агент щодо <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> ;; Протигрибковий агент щодо <i>Fusarium oxysporum</i>	[40]
<i>A. beijerinckii</i> ZRS	Гексадекан, 2 %	Ліпопротеїн	40	5,16	80	Біоремедіація	[41]
<i>A. bouvetii</i> UAM25	Гексадекан, 0,8 %	Ліпогетерополісахарид	1010	0,15	12,51	Біоремедіація	[42]
<i>A. lwoffii</i> TA 38	Рафінована касторова олія, 1 %	Глікопротеїн	-	1,9	-	Біоремедіація	[43]
<i>Acinetobacter</i> sp. Ab9-ES	Рафінована оливкова олія, 2 % Рафінована соняшникова олія, 2 %	Глікопротеїн	-	4,52	83,8	Біоремедіація	[44]
<i>Acinetobacter</i> sp. Ab33-ES	Рафінована оливкова олія, 2 % Рафінована соняшникова олія, 2 %	Глікопротеїн	-	4,31	80,8	Біоремедіація	[44]

Примітка: «-» - дані не наведено.

Проаналізувавши, можна сказати, що серед усіх штамів потенційно спроможними є *A. baumannii* AC5, що синтезують 5,05 г/л емульгуючих речовин та *A. beijerinckii* ZRS з концентрацією 5,16 г/л. Порівняно з широковідомими емульсаном синтезуємим *A. venetianus* RAG-1 (1,89 г/л) на нафті та олії, біодисперсаном *A. calcoaceticus* A2 (4 г/л) та аласаном *A. radioresistens* KA53 (2,2 г/л), синтезуємих на етанолі [7], відкриті штами є конкурентоспроможними хоча б по утворюваній концентрації, що є вдвічі більшою за емульсан і аласан. Сфери застосувань біоемульгаторів за стільки років майже не змінилися, це емульгування олійних речовин та вуглеводнів для різних потреб, очистка танкерів від нафти.

1.1.3 Ферменти

За останні 10 років закордонними вченими була також досліджена здатність бактерій роду *Acinetobacter* до синтезу різноманітних ферментів для використання їх у різних сферах [47–53]. Усі роботи можна поділити за здатністю до синтезу цільових ферментів: ліпаз [49–52], агараз [47, 53] та інших ферментів [48].

Більша частина робіт стосується саме синтезу ліпаз бактеріями роду *Acinetobacter*, для використання у різних сферах хімічної промисловості (миючі засоби, хімічний синтез). У всіх роботах синтезу ліпаз як джерело вуглецю використовують олієвмісні субстрати. Так найбільшу активність проявляють ліпази синтезовані штамми *Acinetobacter* sp. AU07 (14,5 Од/мл) та *Acinetobacter* sp. XMZ-26 (584,85 Од/мл) синтезовані на рафінованій касторовій олії та рафінованій оливковій олії [50, 52].

Також є декілька робіт [47, 53] у яких дослідники виділили фермент агаразу, яка може використовуватися для обробки біомаси морських водоростей та їх подальшого використання у виробництві біопалива. *Leema* зі співавт. [47] виділили штам *Acinetobacter junii* PS12B, який здатний синтезувати агаразу з активністю 0,3 Од/мл на середовищі з глюкозою з додаванням як індуктора 0,5 % агару. У іншій роботі *Lakshmikanth* зі співавт. [53] виділили штам *Acinetobacter* sp. AG LSL-1 здатний до синтезу агаразу з більшою активністю (3 Од/мл).

Також, групою вчених під керівництвом *Zhu* [48] було виділено штам *Acinetobacter* sp. C26, що синтезує унікальний фермент хондроїтиназу, що є багатообіцяючим в лікувальні при травмах спинного мозку.

Підсумувавши, можна сказати серед продуцентів ліпаз штам *Acinetobacter* sp. XMZ-26, що синтезує ліпазу з активністю (584,85 Од/мл) є найкращим із синтезуємих *Acinetobacter*, проте порівнявши з перспективним продуцентом *Aspergillus tamaris* JGIF06, який синтезує ліпазу на середовищі з кокосовою олією з активністю 25000 Од/мл [45], можна сказати, що *Acinetobacter* sp. XMZ-26 потребує модифікацій середовища культивування, умов, додавання індукторів. Порівнявши здатність до синтезу агараз мікроорганізмами останніх років, штам *Acinetobacter* sp. AG LSL-1, активність агараз якого становить 3 Од/мл є перспективнішим за штам *Alteromonas* sp. C-1 активність агараз якого становить 2,3 Од/мл, який хоч і був відкритий більше 15 років назад синтезував агаразу найбільшої активності [53]. Крім того у 2017 році встановлена здатність *Acinetobacter* sp. C26 до синтезу унікального ферменту хондроїтинази, який є перспективним для використання у терапіях лікування травм спинного мозку та маючи активність 8,23 Од/мл, перевищує у 2,5 рази активність хондроїтинази продуцента *Pichia pastoris* X33 (2,72 Од/мл) [46]. Загальна характеристика ферментів синтезованих бактеріями роду *Acinetobacter* представлена у табл. 1.5.

Характеристика ферментів синтезованих бактеріями роду *Acinetobacter*

Штам	Джерело вуглецю	Фермент	Активність*, Од/мл	Сфера застосування	Література
<i>Acinetobacter junii</i> PS12B	Глюкоза, Агар, 0,5 %	Агараза	0,3	Виробництва біопалива	[47]
<i>Acinetobacter</i> sp. C26	Хондроїтин сульфат, 0,6 %	Хондроїтиназа	8,23	Терапія при травмах спинного мозку	[48]
<i>Acinetobacter</i> sp. EH28	Трибутирин, 1 %	Ліпаза	3,8	Синтезу етил- каприлату	[49]
<i>Acinetobacter</i> sp. AU07	Рафінована касторова олія, 2 %	Ліпаза	14,5	Хімічна промисловість	[50]
<i>Acinetobacter johnsonii</i> LP28	Рафінована оливкова олія, 2 %	Ліпаза	3,09	Хімічна промисловість	[51]
<i>Acinetobacter</i> sp. XMZ-26	Рафінована оливкова олія, 1 %	Ліпаза	584,85	Хімічна промисловість	[52]
<i>Acinetobacter</i> sp. AG LSL-1	Сахароза 3 %, Агар, 0,3 %	Агараза	3,01	Виробництва біопалива	[53]

Примітка: «-» - дані не наведено; «*» - активність у супернатанті.

Згідно даних у таблиці 1.5, ферменти синтезовані бактеріями роду *Acinetobacter* можна умовно поділити на: ліпази [49 – 52], агарози [47, 53] та інші специфічні ферменти [48]. Серед ліпаз для біотехнологічного виробництва найцінніша є синтезована штамом *Acinetobacter* sp. XMZ-26 з активністю 584,85 Од/мл [52]. Фермент хондроїтиназа нещодавно виділена з *Acinetobacter* sp. C26 [48] має потенціал у медичній практиці, а саме в лікуванні травм спинного мозку.

1.1.4 Фітогормони

Бактерії роду *Acinetobacter* широко поширені в ґрунті і здатні до синтезу біологічно-активних гіберелінів, які прискорюють і покращують ріст рослин та солюбілізації фосфатів, що є дуже ефективним при використанні їх у сільському господарстві для покращення і збільшення врожайності [54, 55, 56, 57].

Так групою вчених з Кореї було встановлено, що штам *Acinetobacter calcoaceticus* SE370 виділяв 10 різних гіберелінів, включаючи біологічно-активні ГК1, ГК3 і ГК4. Встановлена кількість біологічно-активних гіберелінів ГК3 та ГК4 становила 6,25 нг і 2,83 нг в 100 мл культуральної рідини відповідно, тоді як ГК1 – 0,45 нг/100 мл [54]. Цими ж вченими була досліджена здатність до мобілізації фосфатів *A. calcoaceticus* SE370. Ріст культури упродовж 6 діб супроводжувався перетворенням нерозчинного фосфату на розчинний, що було зумовлене зниженням рН середовища в результаті накопичення кислот (глюконова та 2-кетоглюконова кислота), що вказувало на мобілізацію культурою фосфатів. Також здатність до солюбілізації фосфатів викладено у роботі Gulati [55], який зі співавт. виділили фосфатмобілізуючий штам ВІНВ 723 з ризосфери обліпихи крушиновидної (*Hippophae rhamnoides*). Штам виявляв ознаки стимулювання росту рослин за рахунок солюбілізації фосфатів та синтезу ауксину. Згідно досліджень штам ВІНВ 723 синтезує індолілоцтову кислоту в кількості 15,6 нг/мл. Збільшення довжини коренів гороху, нуту, кукурудзи та ячменю було зафіксовано в межах 15-27 % порівняно з контролем. Тобто бактерії роду *Acinetobacter* здатні до синтезу не тільки гіберелінів, а й зафіксований синтез індолілоцтової кислоти [55]. Також, Peix зі співавт. [56] встановили, що штамми *Acinetobacter* sp ІН9 і ОСІ1 сприяють росту нута та ячменя синтезуючи ріст стимулювальні речовини, природу

яких не було досліджено. Встановлено, що суха вага нуту у оброблених культуральною рідиною рослин збільшилася на 15–20% порівняно з контролем. Рослини ячменю, оброблені штамами ІН9 та ОСІ1, також показали значно збільшену вагу сухої речовини в межах від 56% до 66% відповідно.

Пирог зі співавт. [57] було встановлена здатність продуцентів штаму *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 синтезувати позаклітинні фітогормони при культивуванні на гліцерині і етанолі. Концентрація індолоцтової кислоти складала 25 мкг/л, цитокінінів (3,5-364 мкг/л) і абсцизової кислоти (0,9-3,6 мкг/л).

Порівнявши концентрації гіберелінів (ГК1 - 0,45 нг/100 мл, ГК3 - 6,25 нг/100 мл, ГК4 - 2,83 нг/100 мл) та індолоцтової кислоти (15,6 нг/мл) синтезованих штамом *A. calcoaceticus* SE370 та штамом *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241, який синтезує індолоцтову кислоту 25 мкг/л, цитокініни (3,5-364 мкг/л) [57] з перспективним недавно виділеним штамом *Cladosporium* sp. МН-6 концентрації гіберелінів якого становлять: ГК1 - 1,97, ГК3 - 5,18, ГК4 - 13,35 нг/мл [58] та штамом *Paenibacillus polymyxa* CR1, який здатний до синтезу 62,8 мкг/мл індолоцтової кислоти [59], можна сказати, що штам *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 здатний до синтезу невеликої концентрації індолоцтової кислоти 25 мкг/л (порівняно з *Paenibacillus polymyxa* CR1 - 62,8 мкг/мл.) та високої концентрації цитокінінів.

1.1.5 Органічні кислоти

Серед досліджень бактерій роду *Acinetobacter* на здатність до синтезу органічних кислот дана властивість виявлена тільки у штаму *Acinetobacter calcoaceticus* SE370 [54] та *Acinetobacter rhizosphaerae* ВІНВ 723 [55].

Потенціал солюбілізації фосфатів *A. calcoaceticus* SE370 спостерігався протягом 6 днів на агарових середовищах. Встановлено, що збільшення зони очищення від фосфатів із збільшенням секреції кислоти і, таким чином, перетворення нерозчинного фосфату в розчинну форму. Вченими показано, що зниження рН середовища відбувалося через виробництво кислот (найімовірніше, глюконова кислота та 2-кетоглюконова кислота), що і є причиною солюбілізації фосфатів [54].

Штам *Acinetobacter rhizosphaerae* ВІНВ 723 демонстрував солюбілізацію трифосфату кальцію. Процесі солюбілізації фосфатів відбувається за рахунок синтезуємих органічних кислот. Якісні та кількісні відмінності були виявлені у глюконової, шавлевій, 2-кето-глюконової, молочній, яблучній та мурашиній кислотах під час солюбілізації різних неорганічних фосфатів штамом. Глюконова кислота була основною органічною кислотою, що утворюється під час солюбілізації фосфатів. Виробництво мурашиної кислоти обмежувалося солюбілізацією фосфатів. Встановлено, що на природу та кількість органічних кислот, що продукуються штамом *Acinetobacter rhizosphaerae* ВІНВ 723, впливає джерело мінерального фосфату. Посилений ріст рослин завдяки солюбілізації трифосфату кальцію показав, що солюбілізація фосфатів є важливим механізмом сприяння росту рослин бактеріальним штамом [55].

Отже, аналіз літературних даних показав, що представники роду *Acinetobacter* синтезують широкий спектр речовин: поверхнево-активні речовини [8–19, 31], біоемульгатори [40–44], ферменти [47–53], органічні кислоти [54, 55], фітогормони [54–57]. Як потенційно важливі можна розглядати біоемульгатори, що використовуються для очистки танкерів від нафти та не мають аналогів у світі, оскільки інші мікроорганізми не здатні до їх синтезу. Останніми роками з'явилася інформація в яких досліджуються активніші штами, а саме *A. baumannii* AC5 та *A. beijerinckii* ZRS, що синтезують у двічі більшу концентрації емульгаторів (5 г/л), ніж відомий емульсан *A. venetianus* RAG-1 (1,89 г/л). Щодо ПАР, то конкурентом перспективних штамів *A. baumannii* MN3 (4,62 г/л) і *A. junii* BD (4 г/л) є український штам *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241, який здатний до утилізації відходів (технічний гліцерин, відпрацьована олія) синтезуючи при цьому значно більшу кількість ПАР (до 9 г/л) та проявляючи антимікробну, антиадгезивну активності та здатність до деструкції біоплівки. Різні штами *Acinetobacter* здатні до синтезу групи ферментів як ліпаз та агараз. Крім того у 2017 році встановлена здатність *Acinetobacter* sp. С26 до синтезу унікального ферменту хондроїтинази, який є перспективним для

використання у терапіях лікування травм спинного мозку та маючи активність 8,23 Од/мл, перевищує у 2,5 рази активність хондроїтинази продуцента *Pichia pastoris* X33 (2,72 Од/мл). Щодо синтезу ліпаз, досліджено ліпазо синтезуючий штам *Acinetobacter* sp. XMZ-26, який поки що є потенційно цікавим, але щоб бути конкурентоспроможним порівняно з грибами як *Aspergillus tamaris* JGIF06 потребує оптимізації умов культивування. *Acinetobacter* sp. AG LSL-1 уже зараз є цікавим як потенційно промисловий штам синтезу ферменту агарози, через її більшу активність (3 Од/мл) порівняно з *Alteromonas* sp. C-1 (2,3 Од/мл), який є використовуваним продуцентом агарози. Щодо здатності до синтезу фітогормонів (гібереліни, індолицтова кислота, цитокіни), то штам *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 є цікавим, за рахунок синтезу високої концентрації індолицтової кислоти (25 мкг/л) та цитокінінів (364 мкг/л) та є конкурентоспроможним для використання. Серед здатності до синтезу органічних кислот дана властивість виявлена тільки у штамів *Acinetobacter calcoaceticus* SE370 та *Acinetobacter rhizosphaerae* BИВ 723, що синтезують глюконову, щавлеву, 2-кето-глюконову, молочну, яблучну та мурашину кислотами, як механізм солубілізації ґрунтових фосфатів.

1.2 Представники роду *Acinetobacter* як деструктори ксенобіотиків

Забруднення нафтою - це вічна проблема, яка зачіпає як наземні, так і морські екосистеми. Деструкція нафти може бути досягнуто фізичними та хімічними методами. З іншого боку, біоремедіація, використовуючи складні мікробні спільноти, може діяти автономно та є більш економічний та екологічний. Високонебезпечні маслянисті матеріали легко мінералізуються до нешкідливих кінцевих продуктів, вводячи відповідні мікробні штами [60]. Однак мікроорганізми, внесені в забруднені нафтою екосистеми, вимагають певний час для адаптації до нових умов існування. У зв'язку з цим більш ефективним є інший спосіб очищення - біостимуляція, що припускає використання різних речовин, стимулюючих природну мікробіоту. Ефективними стимуляторами природного нафтоокислюючих мікробіоти можуть бути мікробні ПАР [61]. За останні роки з'явилися повідомлення, про дослідження вченими роль поверхнево-активних

речовин бактерій роду *Acinetobacter* у деструкції ксенобіотиків за двома принципово різними підходами.

Ксенобіотики як субстрат для вирощування *Acinetobacter*

Група авторів під керівництвом Ногіної [62] визначали ефективність біодеструкції вуглеводнів (керосин, н-гексадекан, дизельне паливо, сира нафта) *A. calcoaceticus* ІМВ В-7013 використовуючи їх як у якості ростових субстратів. Штам ІМВ В-7013 проявляв високу ефективність біодеструкції н-гексадекану (82,1 %), керосину (72,5 %), дизельного палива (70,1 %) і сирій нафти (63,5 %). Було показано здатність штаму ІМВ В-7013 синтезувати ПАР. Недоліком цього підходу можна вважали, що не було встановлена роль ПАР у процесі деструкції ксенобіотиків беручи до уваги, що причиною деструкції можуть бути не тільки солубілізація сполук за участі ПАР, а явище руху молекул гідрофобної речовини до гідрофобних клітин, до якої поверхнево-активні речовини не мають відношення.

Основною групою авторів [8, 9, 12, 16] досліджувалося ефективність біодеструкції нафти використовуючи її як у якості ростових субстратів. Група бразильських вчених встановила, що штам *A. baumannii* MKS2 [8] здатний до деградації 10 г сирій нафти за 14 діб, що є ефективнішим за штам *Acinetobacter sp.* D3-2 виділеним *Vao* зі співавт. [9], що при додаванні 5 г нафти при 30 °С здатний до деградації 82% за 14 діб. Найкраще себе показав штам *A. junii* В6, який деградував легкі фракції нафти [12]. Так, штам *Acinetobacter baumannii* MN3 [16] здатний до деградації 10 г сирій нафти на 78 % за 7 діб, що є найкращим результатом серед досліджених.

Також, окрім нафти дослідники [63, 64] вивчали здатність до деструкції фенолу бактеріями роду *Acinetobacter*. Так *Jiang* зі співавт. [63] встановили, що штам *Acinetobacter sp.* BS8Y здатний видаляти 99,2% вихідного фенолу 600 мг/л у рідкому мінімальному середовищі протягом 24 год та переносити фенол у концентраціях до 1200 мг/мл. При іммобілізації клітин ефективність деградації фенолу була до 96% протягом 30 год, початкова концентрація фенолу 800 мг/л, і іммобілізовані клітини показали кращі показники, ніж суспендовані клітини. Штам *Acinetobacter calcoaceticus* PA виділений *Liu* [64] показав кращі результати щодо

деструкції фенолу. Так встановлено, що ефективність видалення фенолу досягала 91,6% від початкових 800 мг/л протягом 48 годин, а толерантність концентрації фенолу досягала 1700 мг/л.

Окрім цього, є декілька робіт [65, 66] в яких штами *Acinetobacter* використовувалися для деструкції пестицидів, зокрема похідних аніліну. *Silambarasan* зі співавт. [65] показали новий шлях деградації 4-нітроаніліну, який є одним з основних пріоритетних забруднювачів, що утворюються в результаті промислового виробництва та трансформації пестицидів. Так виділений штам *Acinetobacter* sp. AVLБ2 здатний до деградації 82 % 4-нітроаніліну з початковою концентрацією 25мг/л за 7 діб. Інший штам *A. baylyi* GFJ2 [66], який був виділений раніше, був здатний до ефективної біодеградації 4-хлораніліну та 3,4-дихлораніліну, та широкого діапазону інших анілінів, включаючи хлоро-, бромо-, фтор-анілін.

Дослідження біодеструкції ксенобіотиків на модельних системах

Інша група вчених під керівництвом Пирог [61, 67, 68] досліджувати вплив ПАР *A. calcoaceticus* IMB В-7241 на деструкцію нафти у воді та ґрунтах. Як препарати ПАР використовували культуральну рідину і супернатант різних концентрацій (5-15 %). Було встановлено, що найвищий рівень деструкції (92,3 %) після 30 діб спостерігався за концентрації культуральної рідини 5 %. Дослідники встановили, що основним механізмом є активація ПАР автохтонної мікробіоти. Так як забруднення в екосистемах найчастіше мають комплексний характер (одночасна наявність як нафти, так і металів), тому наступним етапом досліджень було дослідження ступеня деструкції нафти ПАР у присутності важких металів (свинець, кадмій, мідь). Додавання катіонів міді стимулювала розкладання нафти з 75 % до 90 %. Це явище зумовлене тим, що основним механізмом є активація катіонами міді алкангидроксилаз штаму-продуценту ПАР і природної нафтоокиснювальної мікробіоти. Так за наявності міді загальна кількість клітин збільшилася вдвічі до $2,5 \times 10^7$. У подальших дослідженнях встановили, що після обробки ПАР за суміші катіонів металів (Cu^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+}) деструкція нафти (3 г/л) досягала 90-92 %. При підвищенні концентрації нафти до 6 г/л, ступінь

деструкції незначно (85-88%), що говорить про позитивний вплив катіонів на деструкцію нафти.

Отже, можна підсумувати, що представники роду *Acinetobacter* є ефективними деструкторами ксенобіотиків, а саме: нафти, фенолу, аніліну. Так, можна виділити два шляхи деструкції. Більшість дослідників використовували метод дослідження ступеня деструкції методом використання ксенобіотику як субстрату [8, 9, 12, 16, 62–66]. Так, штам *Acinetobacter baumannii* MN3 показав найвищий рівень деструкції 10 г нафти (78 %) після 7 діб. Штам *Acinetobacter calcoaceticus* PA виділений Liu показав найкращі результати щодо деструкції фенолу, тобто 91,6% від початкових 800 мг/л протягом 48 годин. Проте можна виділити також використання модельних систем, що є ближче до реальних умов існування [61, 66, 67]. Так штам *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 за концентрації нафти 6 г/л найвищий рівень деструкції (88 %) спостерігався після 30 діб.

ВИСНОВОК

Підсумувавши можна сказати, що бактерії роду *Acinetobacter* здатні до синтезу широкого спектру практично цінних цільових продуктів. До них належать біоемульгатори (емульсан, дисперсан, аласан) аналогів у світі яких не існує, оскільки інші мікроорганізми не здатні до синтезу подібних сполук. Низькомолекулярні поверхнево-активні речовини, до яких відносяться рампопептиди, гліколіпіди, ліпопептиди, які є перспективними деструкторами ксенобіотиків (нафта, парафіни, нафталін, фенантрен, пірен), а також антимікробними та антиадгезивними агентами. Серед ферментів синтезованих бактеріями ліпази та агарози синтезовані *Acinetobacter* мають переваги за рахунок синтезу термостабільних або стабільних до низьких температур ліпаз та агараз з вищою активністю порівняно з іншими. Також, серед *Acinetobacter* є представники, що здатні до синтезу фітогормонів (гібереліни, індолоцтова кислота, цитокіни) у кількостях, що можуть бути практично цікавими до використання. Також деякі представники мають здатність до синтезу органічних кислот, таких як: глюконова, щавлева, 2-кето-глюконова, молочна, яблучна та мурашина кислот.

ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

РОЗДІЛ 2. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ВИПУСКУ СУБСТАНЦІЇ ДЛЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ (ЛЗ) ТА ВИРОБНИЦТВА ГОТОВОЇ ФОРМИ ЛЗ.

2.1 Передумови виробництва ЛЗ

Щорічно випадків, що призводять до травм спинного мозку нараховують 276 000. Причинами травм, як правило, є нещасні випадки. На сьогодні лише одна фармакологічна терапія – це використання кортикостероїдів, зокрема метилпреднізолону. Використання ферментів для лікування є досить багатообіцяючим з огляду на безпечність лікування. Британські вчені встановили, про використання ферменту хондроїтинази, як терапевтичний метод при лікуванні травм спинного мозку [69, 70]. Зростає кількість досліджень, які оцінюють використання хондроїтинази як частину комбінованої терапії, і, що важливо, останні дослідження показали, що лікування також може бути корисним при хронічних ураженнях [71].

2.1.1 Аналіз фармакологічних властивостей цільового ЛЗ, галузей використання

Травма спинного мозку - руйнівний стан, щодо якого в даний час не існує ефективного лікування Цей стан виникає через нездатність нейронів центральної нервової системи відновити пошкодження після травми. Це частково пояснюється наявністю в середовищі пошкодженого спинного мозку молекул, які блокують процес відновлення, це речовини під назвою хондроїтинсульфати. Фермент хондроїтиназа розщеплює ці молекули, тим самим сприяючи регенерації нервів та функціональному відновленню. Він також сприяє пластичності, що дозволяє непошкодженим нейронам проростати і брати на себе функції пошкоджених нейронів. Це особливо актуально у випадку хронічних травм.

					НУХТ БТЕК 02.02.06 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		<i>Іванов М.С.</i>			РОЗДІЛ 2. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ	Літ.	Арк.	Акрюшів
Перевір.		<i>Пирог Т.П.</i>					36	33
Консультант						Кафедра БТМ ³⁶		
Н. Контр.								
Затверд.		<i>Пирог Т.П.</i>						

Відновлюючі властивості ферменту були продемонстровані у багатьох незалежних лабораторіях та в декількох моделях тварин. Важливо, що, окрім того, що фермент є ефективним у лікуванні гострих травм, він також нещодавно показав свою ефективність при хронічних травмах, значно розширивши кількість пацієнтів, які могли б отримати лікування. Хондроїтиназа також може сприяти нейропротекції травмованих нейронів [71, 72].

2.1.2 Обсяг ринку та очікувані темпи його розвитку

Прогнозується, що ринок продуктів для лікування травм спинного мозку зросте з більш ніж 2270 млн. доларів в 2017 році до більш ніж 3000 млн. доларів до кінця 2025 року. Маючи понад 85 % частки доходу сегмент хірургії, ймовірно, очолить світовий ринок лікування травм спинного мозку протягом прогнозованого періоду. У 2016 році сегмент хірургії домінував на світовому ринку з точки зору доходів і оцінювався понад 1900 млн. доларів і за прогнозами, він буде оцінений більше ніж 2600 млн. доларів к 2025 року. Очікується, що сегмент кортикостероїдів буде найбільш прибутковим сегментом на світовому ринку серед препаратів для лікування травм спинного мозку [73].

2.1.3 Вибір форми випуску ЛЗ

Препарат існує в лікарських формах: розчин для ін'єкцій, що вводиться внутрішньом'язово та ліофілізований порошок для ін'єкцій, що вводиться внутрішньом'язово.

Препарат існує тільки в ін'єкційній лікарській формі, оскільки застосування інших форм неможливе в зв'язку з зниженням активності та проблемою доставки до місця ураження.

Як ми вже сказали, розглянутий препарат належить до ін'єкційних лікарських форм, тобто призначений до парентерального застосування.

Парентеральний – введення лікарського препарату минаючи шлунково-кишковий тракт. Найпоширенішим способом парентерального введення є ін'єкційний, що потребує дотримання умов асептики.

Перевагами ін'єкційного введення є:

- швидка дія і повна біологічна доступність лікарської речовини;

- точність і зручність дозування;
- можливість введення лікарської речовини хворому, що знаходиться в непритомному стані або, коли ліки не можна вводити через рот;
- відсутність впливу секретів ШКТ і ферментів печінки, що має місце при внутрішньому вживанні ліків;
- можливість створення великих запасів стерильних препаратів, що полегшує і прискорює їх відпускання.

Недоліками ін'єкційного введення є:

- при введенні рідин через ушкоджений покрив шкіри в кров легко можуть потрапити патогенні мікроорганізми;
- разом з препаратом для ін'єкцій в організм може бути введене повітря, що викликає емболію судин або розлад серцевої діяльності;
- навіть незначні кількості сторонніх домішок можуть викликати шкідливий вплив на організм хворого;
- психоемоційний аспект, пов'язаний із хворобливістю ін'єкційного шляху введення;
- введення стерильних ліків повинні здійснюватися тільки кваліфікованими фахівцями.
- заборонено введення ліків, що викликають утворення тромбів, руйнування еритроцитів, некроз тканин тощо;
- больове відчуття при введенні ліків.

Найголовніша складність виготовлення ферментних препаратів це збереження активності препарату, тому ліофілізований порошок для ін'єкцій є кращою лікарською формою у зв'язку зі збереженням активності на більш довгий термін, що є суттєвою перевагою перед розчинами для ін'єкцій. Отже, в результаті порівняння можливих лікарських форм препарату Хондроїтиназа було обрано для випуску форму ліофілізованого порошку для ін'єкцій.

2.1.4 Опис лікарського засобу згідно АНД (проект АНД)

Проект АНД розробляється для вхідного контролю субстанції та постійного контролю ГЛЗ.

Проект АНД субстанції.

Основні фізико-хімічні властивості: аморфний порошок білого з жовтуватим відтінком кольору.

Форма випуску. Нестерильна порошкоподібна субстанція у флаконах.

Фармакологічна група. Засоби, що впливають на опорно-руховий апарат.

Фармакологічні властивості. Субстанція має ферментативну ліазну (хондроїтиназу) активність, а також хондропротекторну, протизапальну дію. Специфічним субстратом хондроїтинази є глікозаміноглікани (гіалуронова кислота, хондроїтин, хондроїтин-4-сульфат, хондроїтин-6-сульфат), що складають основу матриксу сполучної тканини.

Таблиця 2.1

№	Найменування показника	Допустимі норми	Методи контролю
1	2	3	4
1.	Опис	Аморфний порошок білого з жовтуватим відтінком кольору	За АНД, п.1, візуально
2.	Ступінь подрібнення	Допустиму кількість часток, що виходить за межі інтервалу, зазначають у окремій статті.	Згідно ДФУ п. 2.9.13
3.	Час розчинення	Час розчинення препарату у воді для ін'єкції Р не має перебільшувати 20 с з моменту введення всього об'єму розчинника. Час розчинення препарату у розчині 9 г/л натрію хлориду не має перебільшувати 10 с з моменту введення всього об'єму розчинника.	За АНД, п.3
4.	Ідентифікація	Метод абсорбційної спектрометрії в ультрофіолетовій і видимій областях	За АНД, п.4
4.1.	Пептиди	Характерне сине забарвлення з реактивом Лоурі і реактивом Фоліна-Чокольтеу.	АНД, п.4.1., кольорова реакція

5.	pH	Від 5,5 до 7,0	За АНД, п.5, ДФУ, I вид., 2.2.3.
6.	Загальна зола	Не більше 8,0 %	АНД, п.6., ДФУ, I вид., с. 2.4.16.
7.	Сульфатна зола	Не більше 10,0 %	АНД, п.7., ДФУ, I вид., с. 2.4.14.
8.	Втрата в масі при висушуванні	Не більше 10,0 %	За АНД, п.8, ДФУ, I вид., 2.2.32.
9.	Визначення Супровідних домішок	Не більше 1,0 %	АНД, п.9., ДФУ п. 2.4
10.	Мікробіологічна чистота	Загальне число життєздатних аеробних мікроорганізмів: не більше 10^3 бактерій і не більше 10^2 грибів в 1 г препарату. Відсутність бактерій род. <i>Enterobacteriaceae</i> в 1 г., відсутність <i>Pseudomonas aeruginosa</i> та <i>Staphylococcus aureus</i> в 1 г.	АНД, п. 10., ДФУ, I вид., с. 2.6.12., 2.6.13
11.	Кількісне визначення	Метод високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ)	За АНД, п.11
12.	Термін придатності	2 роки	

МЕТОДИ КОНТРОЛЮ

1. Опис.

Дрібнокристалічний порошок білого або з жовтим відтінком кольору.

2. Ступінь подрібнення.

Визначення розміру часток порошоків методом мікроскопії

Визначення проводять згідно ДФУ п. 2.9.13.

Відповідну кількість порошку (наприклад, 10-100 мг) суспендують у 10 мл підхожої рідини, у якій порошок не розчиняється, додаючи, якщо необхідно, речовину, що покращує змочуваність часток порошку. Порцію гомогенної суспензії поміщають у підхожу лічильну чашку і переглядають під мікроскопом площу, відповідну не меншу 10 мкг випробовуваного порошку. Підраховують усі

частки, які мають розміри, що виходять за межі зазначеного інтервалу. Допустиму кількість часток, що виходить за межі інтервалу, зазначають у окремій статті.

3. Розчинність.

Вміст 0,5 г розчиняють в 2 мл води для ін'єкцій. Час розчинення повинен бути не більше 20 с.

Вміст 0,5 г розчиняють в 10 мл розчину натрію хлориду ізотонічного 0,9 % для ін'єкцій. Час розчинення повинен бути не більше 10 с.

4. Ідентифікація.

Методом електрофорезу у сульфат поліакриламідному гелі (SDS-PAGE) виділяють фракції з масою 76 кДа, які далі аналізуються методом мас спектрометрії (ESI-Q-TOF MS). Ті фракції, що виявляють активність, збирають, перевіряючи на ферментативну активність. Ферментативну реакцію проводять при 37 °С з використанням хондроїтину-А (CSA) (2 мг/мл) як субстрату в буфері (20 мМ Трис-НСl, рН 7,5), і 20 мкл зразка ферменту додають до реакційної суміші. Після інкубації при 37 °С протягом 20 хв. Реакцію зупиняють нагріванням протягом 5 хв на киплячій водяній бані. Потім за допомогою УФ-детектора при довжині хвилі 232 нм пропускають отриманий розчин порівнюючи з відповідною порожньою сумішшю, що містить 20 мкл інактивованого розчину ферменту.

Пептиди

0,05 г субстанції поміщають у конічну колбу місткістю 25 мл, розчиняють у 10 мл води Р і перемішують.

1 мл одержаного розчину поміщають у пробірку, додають 5 мл реактиву Лоурі Р і перемішують. Через 10 хв. у пробірку додають 0,5 мл реактиву Фоліна-Чокольтеу Р і перемішують. Через 30 хвилин з'являється сине забарвлення (пептиди).

Примітки: 1. Приготування реактиву Лоурі Р.

Розчин А: 2 г натрію карбонату для спектрального аналізу (ТУ 6-09-3987-75) або аналогічної якості та 0,4 г натрію гідроксиду Р поміщають у мірну колбу місткістю 100 мл, розчиняють у 50 мл води Р, доводять об'єм розчину тим же розчинником до позначки і перемішують.

Термін придатності реактиву – 3 місяці.

Розчин Б: 0,5 г міді (II) сульфату Р та натрію цитрату Р поміщають у мірну колбу місткістю 100 мл, розчиняють у 50 мл води Р, доводять об'єм розчину тим же розчинником до позначки і перемішують.

Термін придатності реактиву – 3 місяці.

1 мл розчину Б поміщають у стакан, додають 50 мл розчину А і перемішують.

Використовують свіжеприготованим.

2. Приготування реактиву Фоліна-Чокольтеу Р.

У плоскодонну колбу зі шліфом місткістю 250 мл поміщають 20 г натрію вольфрамату Р, 5 г натрію молібдату Р, розчиняють у 140 мл води Р, додають 10 мл фосфорної кислоти Р, 20 мл хлористоводневої кислоти Р, кип'ятять суміш зі зворотним холодильником протягом 10 годин. Потім додають 30 г літію сульфату Р, 10 мл води Р, 2 краплі бромиду Р і кип'ятять без холодильника протягом 15 хвилин у витяжній шафі для видалення надлишку бромиду. Вміст колби охолоджують до кімнатної температури, переносять за допомогою 10 мл води Р у мірну колбу місткістю 200 мл, доводять об'єм розчину водою Р до позначки, перемішують і фільтрують через паперовий фільтр «біла стрічка».

Термін придатності розчину 6 місяців при зберіганні в склянці оранжевого скла з притертою пробкою в захищеному від світла місці.

Реактив перед застосуванням розбавляють водою Р у співвідношенні 1:1.

Розчин не використовують, якщо він змінив забарвлення на зелене.

Термін придатності розчину – 10 діб.

5. рН

Визначення проводять згідно (ДФУ, I вид., 2.2.3).

0,4 г (точна наважка) субстанції вносять у мірну колбу місткістю 100 мл, розчиняють у 50 мл води, вільній від діоксиду вуглецю Р, доводять об'єм розчину тим же розчинником до мітки і перемішують. Значення рН має бути від 5,5 до 7,0.

6. Загальна зола

Визначення проводять згідно (ДФУ, I вид., 2.4.16).

Загальну золу визначають у 1,0 г субстанції. Загальна зола не повинна перевищувати 8,0 %.

7. Сульфатна зола

Визначення проводять згідно (ДФУ, I вид., 2.4.14).

Сульфатну золу визначають у 1,0 г субстанції. Сульфатна зола не повинна перевищувати 10,0 %.

8. Втрата в масі при висушуванні

Визначення проводять згідно (ДФУ, I вид., 2.2.32).

0,500 г (точна наважка) субстанції сушать у сушильній шафі при температурі від 100 до 105 °С до постійної маси.

Втрата в масі при висушуванні не повинна перевищувати 10,0 % .

9.Визначення супровідних домішок

Домішки – це сторонні речовини, які потрапляють у ЛЗ і відрізняються від діючої субстанції як хімічним складом, так і відсутністю основної або наявності іншої фармакологічної дії. Як правило, майже всі лікарські речовини містять ті чи інші домішки , поява яких є цілком закономірною. Одним із джерел забруднення є те, що при синтезі лікарських субстанцій можуть використовуватись недостатньо очищені вихідні речовини і реагенти. Крім того, у процесі виробництва використовується апаратура , виготовлена з відповідного матеріалу , фільтри з певними фільтрувальними матеріалами , різні розчинники, кислоти, луги, залишки яких можуть потрапити в одержуваний продукт.(такі домішки наз. загальними – до них належать домішки йонів амонію, кальцію, феруму, арсену, цинку, важких металів, хлоридів, сульфатів, фосфатів). Не дотримання правильних умов зберігання препарату призводить до порушення його доброякісності за рахунок гідролітичного розкладання, окислення та ін. (такі домішки наз.специфічними).

Граничні межі домішок регламентують Фармакопеею або методами контролю якості ЛЗ. Найчастіше наявність домішки визначають колориметричним або нефелометричним методами, порівнюючи аналітичний сигнал (інтенсивність забарвлення або ступінь опалесценції) в еталонному розчинні та випробуваному розчині лікарської речовини після додавання до них однакові кількості реактивів

згідно з методикою випробування. Якщо випробувана субстанція доброякісна, то інтенсивність забарвлення або помутніння випробуваного розчину не повинна перевищувати інтенсивність забарвлення або помутніння еталонного розчину. (використовують тільки коли домішка є допустимою, так визначають вміст домішок амонію, арсену, кальцію, магнію, лужноземельних металів, важких металів, хлоридів, феруму, фосфатів, фторидів, цинку).

Визначення домішок проводять згідно ДФУ п. 2.4.

Солі амонію

Кількість випробовуваної речовини, зазначену у статті, поміщають у пробірку, розчиняють у 14 мл води, якщо необхідно, підлужнюють розчином натрію гідроксиду розведеним і доводять об'єм розчину водою до 15 мл. Додають 0,3 мл розчину калію тетраїодмеркурату лужного.

Як еталон використовують розчин, одержаний додаванням до 10 мл еталонного розчину амонію (1 ppm NH₄) 5 мл води і 0,3 мл розчину калію тетраїодмеркурату лужного. Пробірки закривають.

Через 5 хв жовте забарвлення випробовуваного розчину має бути не інтенсивнішим за забарвлення еталона.

Арсен

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

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

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

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

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

Кальцій

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

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

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

Хлориди

До 15 мл розчину випробовуваної речовини, додають 1 мл кислоти азотної розведеної і виливають суміш за один раз у пробірку, що містить 1 мл розчину срібла нітрату.

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

Фториди

Випробовувану речовину, 0,1 г піску, промитого кислотою, і 20 мл суміші рівних об'ємів кислоти сірчаної і води поміщають у внутрішню пробірку приладу. Оболонку, заповнену тетрачлоретаном, нагрівають до температури кипіння 146 °С. Приєднують генератор водяної пари і відганяють вміст пробірки з перегрітою водяною парою, збираючи відгін у мірну колбу місткістю 100 мл, яка містить 0,3 мл 0,1 М розчину натрію гідроксиду і 0,1 мл розчину фенолфталеїну. Об'єм розчину в пробірці під час відгону має бути постійним (20 мл). Підтримують лужну реакцію вмісту мірної колби, якщо необхідно, додаючи краплями 0,1 М розчин натрію гідроксиду. Доводять об'єм розчину водою до позначки і перемішують (випробовуваний розчин).

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

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

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

Магній

До 10 мл розчину випробовуваної речовини додають 0,1 г динатрію тетраборату. Визначають рН розчину і, якщо необхідно, доводять до рН 8,8-9,2, використовуючи кислоту хлористоводневу розведену або розчин натрію гідроксиду розведений. Розчин поміщають у ділільну лійку, струшують протягом 1 хв з двома порціями, по 5 мл кожна, розчину 1 г/л гідроксихіноліну у хлороформі, залишають до розшарування і відкидають органічний шар. До водного шару

додають 0,4 мл бутила міну і 0,1 мл триетаноламіну. Визначають рН розчину і, якщо необхідно, доводять до рН 10,5-11,5. Додають 4 мл розчину 1 г/л гідроксигіноліну у хлороформі, струшують протягом 1 хв, залишають до розшарування, нижній шар відбирають і використовують для випробування.

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

Забарвлення випробовуваного розчину має бути не інтенсивніше за забарвлення еталона.

Магній і лужноземельні метали

До 200 мл води додають 0,1 г гідроксил аміну гідрохлориду, 10 мл аміачного буферного розчину рН 10,0, 1 мл 0,1 М розчину цинку сульфату і близько 15 мг індикаторного суміші протравного чорного. Нагрівають до температури близько 40 °С. Одержаний розчин титрують 0,01 М розчином натрію едетату до переходу забарвлення розчину від фіолетового до синього. До одержаного розчину додають випробовувану речовину, розчинену в 100 мл води. Якщо забарвлення розчину стає фіолетовим, знову титрують до переходу забарвлення розчину до синього.

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

Залізо

Кількість випробовуваної речовини, зазначену в окремій статті, розчиняють в у воді, доводять об'єм розчину водою до 10 мл і перемішують або використовують 10 мл розчину, зазначеного в окремій статті. Додають 2 мл розчину 200 г/л кислоти лимонної і 0,1 мл кислоти тіоглікової. Перемішують, підлужують розчином аміаку, доводять об'єм розчину водою до 20 мл.

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

Сульфати

При приготуванні усіх розчинів, застосовуваних у випробуванні, має використовуватися вода дистильована.

До 1,5 мл еталонного розчину сульфату (10 ррт SO_4) додають 1 мл розчину 250 г/л барію хлориду. Струшують і залишають на 1 хв, потім додають 15 мл випробовуваного розчину та 0,5 мл кислоти оцтової кислоти.

Паралельно за цих самих умов готують еталон, використовуючи замість випробовуваного розчину 15 мл еталонного розчину сульфату.

Через 5 хв опалесценція випробовуваного розчину не має перевищувати опалесценцію еталона.

Фосфати

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

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

Забарвлення випробовуваного розчину має бути не інтенсивнішим за забарвлення еталона.

Калій

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

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

Алюміній

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

Еталон готують аналогічно.

Холостий розчин готують аналогічно.

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

Флуоресценція випробовуваного розчину не має перевищувати флуоресценцію еталона.

Цинк

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

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

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

Речовини, що легко обвуглюються

Випробовувану речовину невеликими порціями поміщають у пробірку з безбарвного скла, стійкого до дії кислоти сірчаної, що містить зазначену в окремій статті кількість сірчаної кислоти (95±0,5) % (об/об). Пробірку попередньо промивають кислотою сірчаною, потім водою і висушують.

Суміш перемішують скляною паличкою до повного розчинення випробовуваної речовини, залишають на 15 хв, і порівнюють забарвлення одержаного розчину із забарвленням еталона, поміщеного в аналогічну пробірку.

10. Мікробіологічна чистота

Субстанції і допоміжні речовини для виробництва готових лікарських засобів повинні відповідати таким вимогам щодо мікробіологічної чистоти:

- Загальне число життєздатних аеробних мікроорганізмів - не більше 10^3 бактерій і не більше 10^2 грибів у грамі або мілілітрі;
- Відсутність бактерій родини *Enterobacteriaceae* в 1 г або 1 мл;

- Відсутність *Pseudomonas aeruginosa* в 1 г або 1 мл;
- Відсутність *Staphylococcus aureus* в 1 г або 1 мл.

Випробування проводять відповідно до вимог (ДФУ, I вид., 2.6.12, 2.6.13), N; категорія 3А (5.1.4.), N.

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

Спочатку готують розведення ферменту 1:10. 10 г ферменту розчиняють у 100 мл буферного розчину із натрію хлоридом і пептоном рН 7,0. Далі роблять 5 пасажей розведень.

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

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

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

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

Також проводять випробування на окремі види мікроорганізмів [74].

Родина *Enterobacteriaceae*

10 мл розведення ферменту вносять у 100 мл поживного середовища № 3, гомогенізують і інкубують при температурі 35-37°C впродовж 18-24 год.

Якщо спостерігаються ознаки помутніння, бродіння, то роблять пересів на чашки Петрі з густими поживними середовищами №4 і №5. Посіви інкубують при температурі 35-37°C протягом 24-48 год.

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

- середовище № 4 (рис 2.1): круглі малинові з металевим блиском або без нього колонії; рожеві, безбарвні, блискучі опуклі колонії діаметром від 2 мм до 4 мм;
- середовище № 5: чорні з металевим блиском колонії, ділянки середовища під якими забарвлені в чорний колір; зеленувато-бурі, ясно-зелені, бурі колонії .



**Рис. 2.1. Колонії бактерій родини *Enterobacteriaceae*
*Staphylococcus aureus***

10 мл розведення ферменту вносять у 100 мл поживного середовища №8, гомогенізують і інкубують при температурі 35-37°C впродовж 18-24 год.

Якщо спостерігаються ознаки помутніння, бродіння, то роблять пересів на чашку з густим поживним середовищем №10 і інкубують при температурі 35-37°C протягом 24-48 год.

Ріст золотаво-жовтих колоній (рис. 2.2), оточених жовтими зонами (що свідчить про ферментацію маніту), указує на можливість забруднення ферменту *S. aureus*.



Рис. 2.2. Колонії бактерій *Staphylococcus aureus*

Pseudomonas aeruginosa

10 мл розведення ферменту вносять у 100 мл поживного середовища №8, гомогенізують і інкубують при температурі 35-37°C впродовж 18-24 год.

Якщо спостерігаються ознаки помутніння, бродіння, то роблять пересів на чашку з густим поживним середовищем №9 і інкубують при температурі 35-37°C протягом 24-48 год.

Ріст зеленуватих, як правило, флуоресціюючих колоній (рис. 2.3), блакитних в ультрафіолетовому світлі (що свідчить про наявність пігменту піоціаніну), указує на можливість забруднення ферменту *P. aeruginosa*.



Рис. 2.3. Колонії бактерій Pseudomonas aeruginosa

11. Кількісне визначення

Кількісне визначення проводять за допомогою високоефективної рідинної хроматографії на хроматографі WatersAlliance (Waters, Milford, MA, USA). Колонка для хроматографа заповнена силікагелем Sephadex G-100 (1,0 см × 100 см), врівноважена буфером Tris-HCl (20 мМ, рН 7,5). Елюювання субстанції хондроїтинази проводять буфером Tris-HCl (20 мМ, рН 7,5) при швидкості потоку 0,2 мл/хв⁻¹. Фракції аналізують УФ-детектором при довжині хвилі 232 нм.

12. Термін придатності

Термін придатності порошку хондроїтинази – 2 роки.

Проект АНД ГЛЗ

Основні фізико-хімічні властивості: аморфний порошок білого з жовтуватим відтінком кольору.

склад: 1 флакон містить порошок ліофілізований ферменту хондроїтинази, в перерахунку на білок не менше 10,0 мг.

Форма випуску. Ліофілізат для розчину для ін'єкцій.

Фармакологічна група. Засоби, що впливають на опорно-руховий апарат.

Фармакологічні властивості. Хондроїтиназа має ферментативну ліазну (хондроїтиназну) активність, а також хондропротекторну, протизапальну дію. Специфічним субстратом хондроїтинази є глікозаміноглікани (гіалуронова

кислота, хондроїтин, хондроїтин-4-сульфат, хондроїтин-6-сульфат), що складають основу матриксу сполучної тканини.

Фармакокінетика. Після введення максимальна концентрація в районі спинного мозку досягається через 4-5 годин після ін'єкції. Крізь гематоенцефалічний бар'єр не проникає. Виводиться з організму протягом 24 годин. Виводиться переважно нирками.

Показання для застосування. Препарат може бути застосований у складі комплексної терапії як засіб, при лікуванні грижі поперекового диска, функціональному відновленні травмованого спинного мозку, терапії пухлинного та кістозного фіброзу.

Спосіб застосування та дози. Препарат застосовують для лікування дорослих, у тому числі літнього віку чоловіків. Вводити внутрішньом'язово один раз на день. Перед застосуванням вміст флакону розчинити в 4-5 мл води для ін'єкцій або 0,9 % розчині натрію хлориду. Курс лікування становить 14 днів. Повторний курс - через 6 місяців.

Розчини використовують одразу після приготування. Недопустиме додавання до розчинів інших лікарських засобів.

Побічна дія. При внутрішньом'язовому введенні препарату можлива болючість у місці ін'єкції.

Протипоказання. Підвищена чутливість до активної речовини препарату або будь-якої з допоміжних речовин.

Взаємодія з іншими лікарськими засобами. Немає даних про будь-яку взаємодію препарату з іншими лікарськими засобами.

Передозування. Про випадки передозування препарату не повідомлялося.

Особливості застосування. Неприпустиме змішування в одній ємкості з іншими медикаментами.

Умови та термін зберігання. Зберігати в оригінальній упаковці для захисту від дії світла при температурі від 2 до 8 °С. Термін придатності – 2 роки.

Умови відпуску. За рецептом.

Упаковка. По 5 флаконів з нейтрального скла у контурній чарунковій упаковці у картонній коробці.

Специфікація на препарат у флаконах

Таблиця 2.2

№	Найменування показника	Допустимі норми	Методи контролю
1	2	3	4
1.	Опис	Аморфний порошок білого з жовтуватим відтінком кольору	За АНД, п.1, візуально
2.	Час розчинення	Час розчинення препарату у воді для ін'єкції Р не має перебільшувати 20 с з моменту введення всього об'єму розчинника. Час розчинення препарату у розчині 9 г/л натрію хлориду не має перебільшувати 10 с з моменту введення всього об'єму розчинника.	За АНД, п.2
3.	Ідентифікація	Метод абсорбційної спектрометрії в ультрофіолетовій і видимій областях	За АНД, п.3
3.1.	Пептиди	Характерне синє забарвлення з реактивом Лоурі і реактивом Фоліна-Чокольтеу.	АНД, п.3.1., кольорова реакція
4.	pH	Від 7,0 до 9,0	За АНД, п.4, ДФУ, I вид., 2.2.3.
5.	Прозорість розчину	Для внутрішньом'язового введення розчин вмісту флакону з дозуванням 0,01 г простатилену солі у 2 мл води для ін'єкцій Р за ступенем каламутності не має перевищувати еталон I.	За АНД, п.5, ДФУ, I вид., 2.2.1.
6.	Кольоровість розчину	Забарвлення розчину, приготованого для випробування на прозорість (для внутрішньом'язового введення) має бути не інтенсивніше за еталон № 6г.	За АНД, п.6, ДФУ, I вид., 2.2.2, метод II

7.	Бактеріальні ендотоксини	Не більше 80 МО на 100 МО.	За п. 7, ДФУ/ЄФ, 2.6.14
8.	Стерильність	Препарат має бути стерильним	За АНД, п.8, ДФУ, І вид., 2.6.1.
9.	Пірогени	Препарат має бути апірогенним	За АНД, п.9, ДФУ, І вид., 2.6.8.
10.	Аномальна токсичність	Препарат має бути не токсичним	За АНД, п.10, ДФУ, І вид., 2.6.9.
11.	Кількісне визначення	Метод високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ)	За АНД, п.11
12.	Механічні включення	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	За АНД, п.12, ДФУ, 1.2 вид., 2.9.19.
13.	Однорідність маси	Має витримувати вимоги ДФУ	За АНД, п.13, ДФУ, І вид., 2.9.5.
14.	Важкі метали	Коричнєве забарвлення випробовуваного розчину має бути не інтенсивнішим за забарвлення еталона	За п. 13, ДФУ/ЄФ, 2.4.8
15.	Термін придатності	2 роки	

МЕТОДИ КОНТРОЛЮ

1. Опис

Дрібнокристалічний, аморфний порошок світло-жовтого кольору.

2. Час розчинення

Вміст флакону з дозуванням 0,01 г розчиняють в 1 мл води для ін'єкцій. Час розчинення повинен бути не більше 20 с.

Вміст флакону з дозуванням 0,01 г розчиняють в 2 мл розчину натрію хлориду ізотонічного 0,9 % для ін'єкцій. Час розчинення повинен бути не більше 10 с.

3. Ідентифікація

Методом електрофорезу у сульфат поліакриламідному гелі (SDS-PAGE) виділяють фракції з масою 76 кДа, які далі аналізуються методом мас спектрометрії (ESI-Q-TOF MS). Ті фракції, що виявляють активність, збирають, перевіряючи на ферментативну активність. Ферментативну реакцію проводять при 37 °С з використанням хондроїтину-А (CSA) (2 мг/мл) як субстрату в буфері (20 мМ Трис-НСl, рН 7,5), і 20 мкл зразка ферменту додають до реакційної суміші. Після інкубації при 37 °С протягом 20 хв. Реакцію зупиняють нагріванням протягом 5 хв на киплячій водяній бані. Потім за допомогою УФ-детектора при довжині хвилі 232 нм пропускають отриманий розчин порівнюючи з відповідною порожньою сумішшю, що містить 20 мкл інактивованого розчину ферменту.

3.1. Пептиди

0,05 г субстанції поміщають у конічну колбу місткістю 25 мл, розчиняють у 10 мл води Р і перемішують.

1 мл одержаного розчину поміщають у пробірку, додають 5 мл реактиву Лоурі Р і перемішують. Через 10 хв. у пробірку додають 0,5 мл реактиву Фоліна-Чокольтеу Р і перемішують. Через 30 хвилин з'являється сине забарвлення (пептиди).

Примітки: 1. Приготування реактиву Лоурі Р.

Розчин А: 2 г натрію карбонату для спектрального аналізу (ТУ 6-09-3987-75) або аналогічної якості та 0,4 г натрію гідроксиду Р поміщають у мірну колбу місткістю 100 мл, розчиняють у 50 мл води Р, доводять об'єм розчину тим же розчинником до позначки і перемішують.

Термін придатності реактиву – 3 місяці.

Розчин Б: 0,5 г міді (II) сульфату Р та натрію цитрату Р поміщають у мірну колбу місткістю 100 мл, розчиняють у 50 мл води Р, доводять об'єм розчину тим же розчинником до позначки і перемішують.

Термін придатності реактиву – 3 місяці.

1 мл розчину Б поміщають у стакан, додають 50 мл розчину А і перемішують. Використовують свіжеприготованим.

2. Приготування реактиву Фоліна-Чокольтеу Р.

У плоскодонну колбу зі шліфом місткістю 250 мл поміщають 20 г натрію вольфрамату Р, 5 г натрію молібдату Р, розчиняють у 140 мл води Р, додають 10 мл фосфорної кислоти Р, 20 мл хлористоводневої кислоти Р, кип'ятять суміш зі зворотним холодильником протягом 10 годин. Потім додають 30 г літію сульфату Р, 10 мл води Р, 2 краплі бромиду Р і кип'ятять без холодильника протягом 15 хвилин у витяжній шафі для видалення надлишку бромиду. Вміст колби охолоджують до кімнатної температури, переносять за допомогою 10 мл води Р у мірну колбу місткістю 200 мл, доводять об'єм розчину водою Р до позначки, перемішують і фільтрують через паперовий фільтр «біла стрічка».

Термін придатності розчину 6 місяців при зберіганні в склянці оранжевого скла з притертою пробкою в захищеному від світла місці.

Реактив перед застосуванням розбавляють водою Р у співвідношенні 1:1.

Розчин не використовують, якщо він змінив забарвлення на зелене.

Термін придатності розчину – 10 діб.

4. рН

Визначення проводять згідно ДФУ, I вид., 2.2.3. Значення рН повинно бути в діапазоні від 7,0 до 9,0 (10% водний розчин препарату (потенціометрично)).

5. Прозорість розчину

Визначення проводять згідно ДФУ, I вид., 2.2.1.

Розчин 0,01 г препарату в 2 мл води для ін'єкцій повинен бути прозорим або по ступені мутності не повинен перевищувати еталонний розчин I.

6. Кольоровість розчину

Визначення проводять згідно ДФУ, I вид., 2.2.2, метод II.

Кольоровість розчину 0,01 г препарату в 2 мл води для ін'єкцій повинна бути не інтенсивніше еталона №6 г.

7. Бактеріальні ендотоксини.

Випробовування проводять методом гелю тромб-тесту (ДФУ/ЄФ, 2.6.14 метод А). Рекомендований лізат – ЛАЛ-реактив Pyrotell з чутливістю 0,03 МО/мл. Концентрація препарату у дослідному розчині – 0,08 ОД/мл.

Приготування основного розчину дослідного зразка. Дослідний зразок перемішують не менше 30 с на вихровій мішалці.

Приготування робочого розчину дослідного зразка. Дослідний зразок аналізують в розведенні 1:1250, що відповідає концентрації препарату – 0,08 ОД/мл:

До 0,9 мл ЛАЛ-води додають 0,1 мл основного розчину дослідного зразка, перемішують на протязі 30 с, далі до 0,9 мл ЛАЛ-води додають 0,1 мл отриманого розчину, перемішують на протязі 30 с, далі до 1,05 мл ЛАЛ-води додають 0,2 мл отриманого розчину, перемішують на протязі 30 с.

Методика проведення дослідів. Визначення результатів.

Випробовування проводять у двох паралельних постановках. Всі пробірки обережно перемішують і поміщають на 60 ± 2 хв у водяну баню або термоблок при температурі 37 ± 1 °С.

Позитивним результатом вважають утворення стійкого гелю, який не руйнується при плавному перевертанні пробірки на 180° . Негативним результатом вважають відсутність стійкого гелю.

Тест дійсний, якщо в обох пробірках з негативним контролем отримані негативні результати і у всіх 4-х пробірках позитивного контролю отримані позитивні результати.

Граничний вміст бактеріальних ендотоксинів – менше 80 МО на 100 МО препарату.

8. Стерильність

Препарат повинен бути стерильним. Визначення проводять згідно ДФУ, I вид., 2.6.1.

Посів на поживні середовища здійснюється методом мембранної фільтрації. Вміст кожного з 5 флаконів з дозуванням 0,01 г хондроїтинази розчиняють у 2 мл розчину 9 г/л натрію хлориду, переносять у колбу, яка містить 100 мл того самого

розчинника і негайно фільтрують крізь один мембранний фільтр. Після закінчення фільтрації мембрану промивають п'ятьма порціями по 100 мл розчину 9 г/л натрію хлориду, розрізають навпіл і вміщують у поживні середовища.

Проводять негативний контроль, пропускаючи через два мембранних фільтри не менше 200 мл (100 мл на кожен фільтр) промиваючої рідини.

Після фільтрації каністри заповнюють по 100 мл рідким тіогліколевим середовищем та соєво-казеїновим бульйоном.

Посіви інкубують в термостатах:

- Рідке тіогліколеве середовище при температурі $(32,5 \pm 2,5)$ °С, протягом 14 діб.
- Соєво-казеїновий бульйон при температурі $(22,5 \pm 2,5)$ °С, протягом 14 діб.

Через 14 діб інкубації вираховують результати.

Препарат повинен бути стерильним.

9. Пірогени

Визначення проводять згідно ДФУ, I вид., 2.6.8.

Препарат повинен бути апірогенним. Перед введенням випробовуваний розчин нагрівають приблизно до температури 38,5 °С. Випробовуваний зразок може бути розчинений або розведений в апірогенному розчині 9 г/л натрію хлориду або іншому розчиннику, зазначеному в окремій статті. Об'єм, що вводиться, має бути не менш як 0,5 мл і не більш як 1,0 мл на кілограм. Розчин повільно вводять у крайову вену вуха кожного із трьох кроликів протягом не більше 1 хв, якщо немає інших зазначень в окремій статті.

10. Аномальна токсичність

Випробування проводять відповідно до вимог ДФУ, I вид., 2.6.9.

0,01 г випробовуваного лікарського засобу, розчиненого в 0,5 мл води для ін'єкцій Р або у стерильному розчині 9 г/л натрію хлориду. вводять внутрішньовенно кожній із п'яти здорових мишей масою від 17 г до 22 г. Розчин вводять протягом інтервалу часу від 15 с до 30 с, якщо немає інших зазначень в

окремій статті. Зразок витримує випробування, якщо жодна з мишей не гине в межах 24 год або протягом часу, зазначеного в окремії статті.

11. Кількісне визначення

Кількісне визначення проводять за допомогою вискоефективної рідинної хроматографії на хроматографі WatersAlliance (Waters, Milford, MA, USA). Колонка для хроматографа заповнена силікагелем Sephadex G-100 (1,0 см × 100 см), врівноважена буфером Tris-HCl (20 мМ, рН 7,5). Елюювання субстанції хондроїтинази проводять буфером Tris-HCl (20 мМ, рН 7,5) при швидкості потоку 0,2 мл/хв⁻¹. Фракції аналізують УФ-детектором при довжині хвилі 232 нм.

12. Механічні включення

Випробування проводять відповідно до вимог ДФУ 1.2, 2.9.19.

Використовують підхожий прилад, заснований на принципі світлоблокування, який дозволяє автоматично вимірювати кількість і розмір часток. Відбирають 4 проби, не менше 5 мл кожна, і визначають кількість часток із розмірами, що дорівнюють або перевищують 10 мкм і 25 мкм. Виключають результат, одержаний для першої проби, і розраховують середню кількість часток у випробовуваному зразку. 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.

13. Однорідність маси

Випробування проводять відповідно до вимог ДФУ I вид., 2.9.5.

Вибирають за обгрунтованою схемою 20 флаконів препарату. Видаляють паперову етикетку з поверхні контейнера. Контейнер миють і сушать. Потім контейнер розкривають і зразу зважують. Обережним постукуванням звільняють якомога повніше контейнер від вмісту, обполіскують його, якщо необхідно, водою Р і потім 96 % спиртом Р і сушать при температурі від 100 °С до 105 °С протягом 1 год або, якщо природа контейнера не дозволяє використовувати нагрівання при такій температурі, сушать при більш низькій температурі до постійної маси. Після

цього охолоджують в ексікаторі і зважують. За різницею зважувань розраховують масу вмісту контейнера. Повторюють процедуру з іншими 19 контейнерами.

14. Важкі метали.

Проводять загальним методом (ДФУ/ЄФ, 2.4.8 метод А).

Через 2 хв коричневе забарвлення випробовуваного розчину має бути не інтенсивнішим за забарвлення еталона.

Упаковка

1 флакон об'ємом 2 мл містить порошок ліофілізований ферменту хондроїтинази, в перерахунку на білок не менше 10,0 мг з медичного скла марки НС-3. По 5 флаконів у груповому коробі.

Маркування

Відповідно до графічного оформлення упаковки.

Зазначається назва препарату, об'єм, активність, лікарська форма, слово «Стерильно», номер серії, виробник (назва та адреса), строк придатності та склад на 1 мл препарату.

Умови зберігання

В захищеному від світла місці, в оригінальній упаковці, при температурі від 2 °С до 8 °С.

Строк придатності

2 роки з моменту випуску.

2.1.5 Розрахунок річної потужності виробництва ЛЗ та кількості серій на рік

Загальна потреба у препараті на рік $G = 5040$ г

Вміст одного флакону $G_{\text{agl}} = 10$ мг

Загальна кількість доз $N_{\text{доз}} = G \cdot 1000 / G_{\text{agl}} = 5040 \cdot 1000 / 10 = 504\,000$ флаконів

на 1 серію.

Продуктивність машини наповнення і укупорки флаконів $\nu = 2700$ флаконів/год.

Кількість годин на наповнення та упаковку флаконів:

$T = 504\,000 / 2700 = 187$ год

2.2 Розрахунок потреби субстанції для випуску ЛЗ

2.2.1 Перелік виробників кінцевого продукту і виробників (постачальників) субстанції

Наразі немає препаратів на основі ферменту хондроїтинази, проте проводять лабораторні дослідження ферменту: форма ЛП, шлях доставки, механізми його дії, також проводять дослідження ефективності дії на тваринах. Серед постачальників субстанції (ферменту) можна відмітити:

1. Американська компанія R&D Systems.
2. Американська компанія Sigma-Aldrich.
3. Китайська компанія Sinopharm Chemical Reagent Co.
4. Китайська компанія Guangzhou Isun Pharmaceutical Co.
5. Міжнародна компанія Amsbio.

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

Лікарські засоби на основі ферменту хондроїтинази для відновлення спинного мозку після травм зараз тільки розробляються і є багатообіцяючі дані щодо ефективності на основі досліджень з моделями тварин. Такі лікарські препарати передбачаються ін'єкційними через складність доставки ферменту у місце травми. Згідно останніх досліджень ефективності терапії хондроїтиназою на тваринах, середня ефективна доза задля забезпечення лікувального ефекту була 50 ОД на 1 кг. Хоча ці дані є експериментальними, можна прийняти, що зважаючи на середню вагу людини (для України – 75 кг) ефективна доза складатиме $50 \times 75 = 3500$ ОД [4]. Прийmemo, що вміст хондроїтинази у ліофілізаті для ін'єкцій у флаконах буде складати 3500 ОД. Активність виділеної і очищеної хондроїтинази з *Acinetobacter* sp. C26 дорівнює 348 од/мг білка [11]. Отже, 3500 ОД відповідає $3500/348 = 10,05$ мг хондроїтинази.

Ін'єкції зі вмістом хондроїтинази 3500 ОД доцільно робити двічі на добу, упродовж двох тижнів, повторний курс через 6 місяці.

Станом на 2017 рік постраждалих, що мають травми становить 4257 людей на 100 000 тис. населення [75]. Припустимо, що з них отримали травми спинного мозку 5 %, тобто 213 людей. Так як травми (наприклад, внаслідок ДТП) є явищем

розповсюдженим ризик отримання травм спинного мозку є достатньо високим. З огляду на складність лікування та малу ефективність медикаментозного лікування для розрахунку потреби виділимо 10 % від населення України, тобто $42,22 \times 0,1 = 4,222$ млн людей. Так як теоретично на 100 000 тисяч населення припадає 213 хворих, то на 4,22 млн отримаємо приблизно 9000 населення.

Таблиця 2.3

Вихідні дані для розрахунку річної потреби в субстанції (хондроїтиназі)

Захворювання	Доза препарату на добу, мг	Кількість ін'єкцій для одного курсу	Кількість препарату на 1 людину, мг	Кількість хворих на 2017 рік*	Загальна кількість субстанції на всіх хворих, мг
Травми спинного мозку	10	56	560	9000	5 040 000

Примітка: *- теоретично розраховано згідно статистики по Україні.

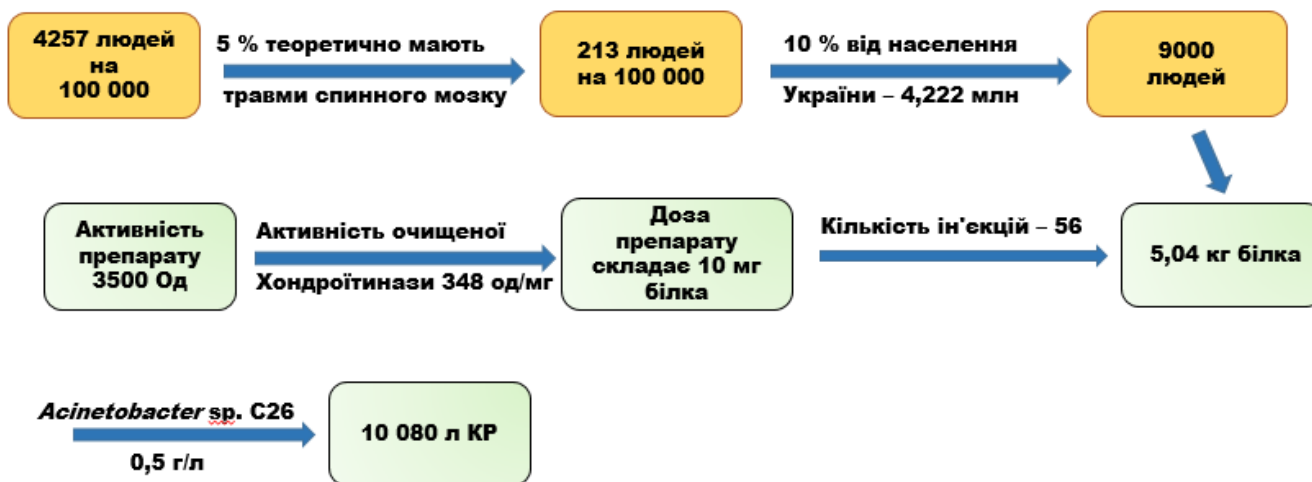


Рис. 2.4 Узагальнена схема здійснення етапів розрахунків техніко-економічного обґрунтування виробництва ферменту хондроїтинази

Знаючи кількість препарату на одну людину та кількість хворих, можна розрахувати річну потребу у субстанції для населення України:

$$560 \times 9000 = 5\,040\,000 \text{ мг}$$

Тоді потужність виробництва складає:

$$G_{\text{п}} = 5\,040\,000 \text{ мг} / 10^6 = 5,04 \text{ кг}$$

Розраховуємо кількість культуральної рідини, яку необхідно одержати, щоб забезпечити на рік населення України субстанцією для лікарського препарату.

Так як даних щодо синтезувальної здатності продуцента *Acinetobacter* sp. C26 у літературі не наведено, то приймаємо синтезувальну здатність на рівні 0,5 г/л, через те що фермент хондроїтиназа (субстанція) не відноситься до конститутивних, а синтезується тільки за наявності індуктора.

Знаючи концентрацію ферменту у культуральній рідині розраховуємо її кількість:

1 л культуральної рідини – 0,50 г

X л культуральної рідини - 5040 г

Отримаємо, $x = 5040/0,5 = 10\ 080$ л культуральної рідини.

Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера

Для забезпечення 10 % населення України субстанцією для препарату для лікування травм спинного мозку, необхідно одержати $G_{гп} = 10\ 080$ л культуральної рідини.

Приймаємо кількість робочих трудоднів (Трд) 110, тоді кількість продукту за цикл становить:

$$G_{цк} = G_{гп} \cdot T_{цф}/24 \cdot T_{рд} = 10080 \cdot 34,5/24 \cdot 110 = 131,73 \text{ л/цикл}$$

де $T_{цф}$ – цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу (26 год) та час підготовки ферментера до роботи. Підготовка ферментера включає: миття та огляд (1,5 год), перевірка на герметичність (1 год), підігрів апарату (0,5 год), стерилізація апарату (1 год), охолодження апарату (1 год), завантаження середовища (2 год), засів (0,5 год), вивантаження культуральної рідини (1 год).

$$\text{Отже, } T_{цф} = 26 + 1,5 + 1 + 0,5 + 1 + 1 + 2 + 0,5 + 1 = 34,5 \text{ год}$$

$$\text{Кількість циклів: } N_{ц} = G_{гп}/G_{цк} = 10080/131,73 = 76,52 = 77$$

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

Враховуючи частку сухих речовин в готовому продукті, яка складає 0,95, та втрати при виділенні (50%), об'єм культуральної рідини складатиме:

$$V_{кр} = K_1 \cdot G_{цк} \cdot C_{гп} / R_{кр} (1 - E_{св}) = 1,1 \cdot 131,73 \cdot 0,95 / 0,5 \cdot (1 - 0,50) = 550,62 \text{ л/цикл}$$

При одержанні культуральної рідини потрібно врахувати її втрати в результаті крапле виносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять 10% (Еф).

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

$$V_{роб1} = V_{кр} / (1 - E_{ф}) = 550,62 / (1 - 0,10) = 611,8 \text{ л}$$

611,8 л культуральної рідини ($V_{роб1}$) можна отримати у ферментері, геометричний об'єм якого має становити:

$$V_{г} = V_{роб1} / K_{зап} = 611,8 / 0,6 = 1020 \text{ л,}$$

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

Знаходимо найближчий за геометричний об'ємом ферментер $V_{ф} = 1000 \text{ л}$.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_{зап} = V_{роб1} / V_{ф} = 611,8 / 1000 = 0,61, \text{ що не перевищує заданого значення.}$$

Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

Виробничий біосинтез здійснюється у ферментері з геометричним об'ємом $V_{ф} = 1000 \text{ л}$.

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

Тоді кількість поживного середовища в ферментері буде становити:

$$V_{пс1} = V_{роб1} / (1 + X_{ф}) = 611,8 / (1 + 0,1) = 556,2 \text{ л,}$$

де $X_{ф} = 0,1$ – доза посівного матеріалу.

$$\text{Кількість посівного матеріалу становить } V_{пм1} = V_{роб1} - V_{пс1} = 611,8 - 556,2 = 55,6 \text{ л}$$

Для одержання 55,6 л інокуляту в посівному апараті враховуємо втрати в результаті крапле виносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять 10%.

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

$$V_{роб2} = V_{пм1} / (1 - E_{па}) = 55,6 / (1 - 0,10) = 61,78 \text{ л.}$$

Кількість інокуляту $V_{роб2}$ можна одержати під час культивування дріжджів у посівному апараті геометричним об'ємом $V_{па2} = V_{роб2}/K_{зап}=61,78/0,6=102,97$ л. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{сф} = 100$ л. Уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{з1} = V_{роб2}/V_{сф}=61,78/100=0,61.$$

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

Тоді кількість поживного середовища в інокуляторі буде становити:

$$V_{пс2} = V_{роб2}/(1+X_{па}) = 61,78/(1+0,1)=56,16 \text{ л,}$$

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

$$\text{Кількість посівного матеріалу становить } V_{пм2} = V_{роб2} - V_{пс2} = 61,78 - 56,16 = 5,62 \text{ л.}$$

Для одержання 5,62 л посівного матеріалу в малому інокуляторі враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять 10%.

Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу в інокуляторі становитиме:

$$V_{роб3} = V_{пм2}/(1-E_{ін}) = 5,62/(1-0,10)=6,25 \text{ л.}$$

Кількість інокуляту $V_{роб3}$ можна одержати під час культивування дріжджів у малому інокуляторі геометричним об'ємом $V_{ін3} = V_{роб3}/K_{зап}=6,25/0,6=10,4$ л. Приймаємо найближчий за об'ємом інокулятор $V_{сф} = 10$ л. Уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{з1} = V_{роб3}/V_{сф}=6,25/10=0,63.$$

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

Тоді кількість поживного середовища в інокуляторі буде становити:

$$V_{пс3} = V_{роб3}/(1+X_{ін}) = 6,25/(1+0,1)=5,68 \text{ л,}$$

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

$$\text{Кількість посівного матеріалу становить } V_{пм3} = V_{роб3} - V_{пс3} = 6,25 - 5,68 = 0,57 \text{ л.}$$

Кількість інокуляту для засіву малого інокулятора $V_{\text{імз}}=0,57$ л можна одержати культивуванням у колбах на качалці. Для цього використовують качалочці колби об'ємом $V_{\text{колб}}=750$ мл та коефіцієнтом заповнення $K_{\text{зк}}=0,2$.

Тоді кількість колб для одержання посівного матеріалу становить:

$$N_{\text{колб}} = V_{\text{імз}} / (V_{\text{колб}} \cdot K_{\text{зк}}) = 570 / (750 \cdot 0,2) = 3,8 = 4$$

Таким чином, для одержання посівного матеріалу необхідно 4 качалочні колби.

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 1000 л з коефіцієнтом заповнення 0,6 буде проходити у 3 етапи.

Таким чином, за результатами розрахунків для біосинтезу приймаємо до встановлення один ферментер об'ємом 1000 л, один інокулятор об'ємом 100 л, один інокулятор об'ємом 10 л

**РОЗДІЛ 3. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ
БІОСИНТЕЗУ СУБСТАНЦІЇ ТА ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ
ВИРОБНИЦТВА ЛЗ**

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

Останніми роками з'явилися дослідження щодо використання ферментів хондроїтинази при лікуванні травм спинного мозку. Інформація про продуценти зараз є обмеженою, з досліджених в даний час це *Flavobacterium heparinum*, *Bacteroides*, *Arthrobacter*, *Proteus vulgaris*. Зростає кількість досліджень, які оцінюють використання хондроїтинази як частину комбінованої терапії [71].

Хоча перші мікроорганізми, які здатні синтезувати фермент хондроїтиназу виділили ще на початку 2000 років, для обґрунтування вибору біологічного агента ми будемо порівнювати організми дослідження яких проводилося останніми роками. Це штам *Bacteroides stercoris* HJ-15 [76], який синтезує хондроїтиназу типу АСП активність якої у супернатанті становить 0,42 Од/мл, проте штам *Bacteroides stercoris* HJ-15 культивується в анаеробних умовах, що потребує робити всі операції в анаеробних умовах (техніка Хангейта). Оптимальним рН для цього ферменту є діапазон 4-9, а температура при якій спостерігається максимальна активність є 35-45 °С. Іншим організм який здатний до синтезу хондроїтинази типу АВС у вдвічі більшої активності (0,94 Од/мл) синтезується *Sphingomonas paucimobilis* [77]. Ще одним із конкурентоспроможних є рекомбінантний штам дріжджів *Pichia pastoris* X33, для одержання якого гени відповідальні за синтез ферменту з *Arthrobacter* sp. CS01 були перенесені у плазміді рPIC9К та рPICZαА [46]. Рекомбінантний штам *Pichia pastoris* X33 при цьому синтезував хондроїтиназу з активністю 2,72 Од/мл, що є більше ніж у 3 рази більше порівняно з іншими.

					НУХТ БТЕК 02.02.06 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		<i>Іванов М.С.</i>			Літ.	Арк.	Акрюшів
Перевір.		<i>Пирог Т.П.</i>				69	50
Консультант					Кафедра БТМ⁶⁹		
Н. Контр.							
Затверд.		<i>Пирог Т.П.</i>					
					РОЗДІЛ 3. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ		

Культивування штаму *Pichia pastoris* X33 проходить двостадійно, перша стадія до досягнення оптичної густини 4,0; друга стадія 72 години при рН 7,0, 28 °С. Проте, найвища активність ферменту спостерігається у штаму *Acinetobacter* sp. С26 (8,23 Од/мл) [48] перевищуючи штам *Pichia pastoris* X33 у 3 рази. Також важливим є те, що найвища активність ферменту спостерігається за температури тіла людини (37-40 °С), що робить *Acinetobacter* потенційним біологічним агентом для синтезу цієї хондроїтинази для використання у майбутніх терапіях лікування травм спинного мозку.

Узагальнюючу характеристику технологічних особливостей одержання хондроїтинази на різних середовищах з використанням різних мікроорганізмів для подальшого вибору біологічного агента наведено у *табл. 2.1*. Дані, наведені у таблиці свідчать про те, що для всіх штамів використовують одностадійний спосіб культивування. Найвища концентрація ферменту спостерігається у штама *Acinetobacter* sp. С26 (8,23 Од/мл), а найнижча – у *Bacteroides stercoris* НJ-15 (0,42 Од/мл). Нижчий показник, порівняно з іншими, часу культивування (12 год) належить *Bacteroides stercoris* НJ-15, проте культивування відбувається у анаеробних умовах, що створює деякі складнощі, через необхідність продування культури сумішшю газів на всіх етапах синтезу. Однак така характеристика технологічного процесу (див. *табл. 3.1*) є недостатньою для вибору біологічного агента. Тому є доцільним подальше порівняння вартості поживних середовищ використовуваних наведеними продуцентами (*табл. 3.2*).

Таблиця 3.1

Особливості синтезу хондроїтинази бактеріями *Acinetobacter* sp. C26, *Sphingomonas paucimobilis*, *Pichia pastoris* X33, *Bacteroides stercoris* HJ-15

Біологічний агент	Склад поживного середовища, г/л	Тривалість культивування, год	Активність ферменту, Од/мл	Особливості процесу біосинтезу	Використана література
<i>Acinetobacter</i> sp. C26	Хондроїтин сульфат-А – 0,6; М'ясний екстракт сухий – 15 ; Пептон – 10; MgSO ₄ – 1,03; NaCl – 5; CaCl ₂ – 0,01.	26	8,23	24 °C; pH= 7.	Zhu C., Zhang J., Zhang J., Jiang Y., Shen Z., Guan H., Jiang X. Purification and characterization of chondroitinase ABC from <i>Acinetobacter</i> sp. C26. <i>Int. J. Biol. Macromol.</i> 2017, 95: 80-86.
<i>Pichia pastoris</i> X33	Середовище №1: Пептон – 20; Глюкоза – 20; Дріжджовий екстракт – 10; Середовище №2: Гліцерин – 10; Дріжджовий екстракт – 10; Пептон – 20; (NH ₄) ₂ SO ₄ – 1; Біотин – 4 мг/л; YNB – 3,4; Метанол – 5.	72	2,72	Двостадійне культивування; Тривалість I стадії до оптичної густини 4,0, середовище № 1; середовище № 2 для синтезу продукту 28 °C; pH= 7.	Fang Y., Yang S., Fu X., Xie W., Li L., Liu Z. Expression, purification and characterization of chondroitinase AC II from marine bacterium <i>Arthrobacter</i> sp. CS01. <i>Mar. Drugs.</i> 2019, 17 (3).

Закінчення табл. 3.1

<p><i>Sphingomonas paucimobilis</i></p>	<p>Хондроїтин сульфат-А – 5; Дріжджовий екстракт – 10; MgSO₄·7H₂O – 0,5; NaCl – 5; KH₂PO₄ – 0,3</p>	<p>36</p>	<p>0,94</p>	<p>25 °С; рН= 8,5.</p>	<p>Fu J., Jiang Z., Chang J., Han B., Liu W., Peng Y. Purification, characterization of Chondroitinase ABC from <i>Sphingomonas paucimobilis</i> and in vitro cardiocytoprotection of the enzymatically degraded CS-A. <i>International Journal of Biological Macromolecules</i>. 2018, 115: 737–745.</p>
<p><i>Bacteroides stercoris</i> HJ-15</p>	<p>Хондроїтин сульфат-А – 0,15; Триптон – 17; Пептон соєвий – 3; KH₂PO₄ – 2,5; Натрій тіогліколят – 0,1; Аскорбінова кислота – 1</p>	<p>12</p>	<p>0,42</p>	<p>Анаеробні умови; Культивування у ферментаторі; 37 °С; рН= 7,2.</p>	<p>Hong S.-W., Kim B.-T., Shin H.-Y., Kim W.-S., Lee K.-S., Kim Y.-S., Kim D.-H. Purification and characterization of novel chondroitin ABC and AC lyases from <i>Bacteroides stercoris</i> HJ-15, a human intestinal anaerobic bacterium. <i>European Journal of Biochemistry</i>. 2002, 269 (12):2934–2940.</p>

**Вартість компонентів поживного середовища для
культивування**

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації *
<i>Acinetobacter</i> sp. C26	Хондроїтин сульфат А, 0,6	19600	11,76	[1]
	М'ясний екстракт сухий, 15	2700	40,5	[6]
	Пептон, 10	720	7,2	[3]
	MgSO ₄ ·7H ₂ O, 1,03	8,1	0,01	[3]
	NaCl, 5	1,7	0,01	[5]
	CaCl ₂ , 0,01	35	0,01	[5]
	Вартість 1 л середовища – 59,5 грн			
<i>Pichia pastoris</i> X33	Середовище № 1			
	Пептон, 20	720	14,4	[3]
	Глюкоза, 20	21	0,42	[3]
	Дріжджовий екстракт, 10	1632	16,32	[2]
	Середовище № 2			
	Гліцерин, 10	40	0,4	[5]
	Дріжджовий екстракт, 10	1632	16,32	[2]
	Пептон, 20	720	14,4	[3]
	(NH ₄) ₂ SO ₄ , 1	50	0,05	[5]
	YNB, 3,4	24	0,09	[4]
	Біотин, 4 мг/л	240	0,01	[4]
	Метанол, 5	120	0,6	[5]
	Сумарна вартість 1 л середовищ – 63,01 грн			
<i>Sphingomonas</i> <i>paucimobilis</i>	Хондроїтин сульфат-А, 5	19600	98	[1]
	Дріжджовий екстракт, 10	1632	16,32	[2]
	MgSO ₄ ·7H ₂ O, 0,5	8,1	0,01	[3]
	NaCl, 5	1,7	0,01	[5]
	KH ₂ PO ₄ , 0,3	52	0,02	[5]
Вартість 1 л середовища – 114,32 грн				
<i>Bacteroides</i> <i>stercoris</i> HJ-15	Хондроїтин сульфат-А, 0,15	19600	2,94	[1]
	Триптон, 17	1300	22,1	[4]
	Пептон, 3	720	2,16	[3]
	KH ₂ PO ₄ , 2,5	52	0,13	[5]
	Натрій тіогліколят, 0,1	25	0,01	[4]
	Аскорбінова кислота, 1	200	0,2	[7]
Вартість 1 л середовища – 27,54 грн				

Примітка. * - Ціни наведено станом на грудень 2020 р. 1. www.sigmaaldrich.com, 2. <http://agar.com.ua>, 3. <https://www.systopt.com.ua>, 4. www.russian.alibaba.com, 5. www.prom.ua; 6. <https://laboratorysales.com>, 7. <http://www.agrohimprom.com>

Аналізуючи дані, наведені в табл. 3.2, можна засвідчити, що середовища для культивування *Bacteroides stercoris* HJ-15 (27,54 грн) є найдешевшим, а середовище

для *Sphingomonas paucimobilis* є більш ніж в 3 рази дорожчим (114,32 грн), тому в подальших розрахунках ми його не розглядаємо.

Для того, щоб остаточно обрати найефективніший біологічний агент розраховували умовну вартість 1 мг ферменту (табл. 3.3).

Таблиця 3.3

Умовна вартість ферменту синтезованому при культивуванні *Acinetobacter* sp. C26, *Pichia pastoris* X33, *Bacteroides stercoris* HJ-15

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища, грн	Активність ферменту, од/мл	Умовна вартість 1 од активності цільового продукту, грн./од	Тривалість культивування, год	Активність ферменту за годину, од/год
<i>Acinetobacter</i> sp. C26	59,5	8,23	$7,23 \times 10^{-3}$	26	0,32
<i>Pichia pastoris</i> X33	63,01	2,72	$23,17 \times 10^{-3}$	72	0,04
<i>Bacteroides stercoris</i> HJ-15	27,54	0,42	$65,57 \times 10^{-3}$	12	0,035

Узагальнивши всі дані, наведені в табл. 3.1, табл. 3.2, табл. 3.3, можна зробити висновок, що умовна вартість 1 до ферменту за культивування штаму *Bacteroides stercoris* HJ-15 є майже у 6 разів дорожче ($65,57 \times 10^{-3}$ грн/од) за інші штами доцільніше використовувати для отримання хондроїтинази штам *Acinetobacter* sp. C26, так як умовна вартість одиниці цільового продукту є найнижчою ($7,23 \times 10^{-3}$ грн/од) також порівнюючи активність ферменту за годину найбільшою є *Acinetobacter* sp. C26 – 0,32 од/год, отже, біосинтез саме цього штаму є найбільш економічно вигідним.

3.2. Обґрунтування вибору способу культивування і типу ферментера

Спосіб культивування *Acinetobacter* sp. C26 обираємо виходячи з фізіолого-біохімічних ознак продуцента:

- по відношенню до кисню *Acinetobacter* sp. C26– аероб;
- оптимальне значення рН для росту і біосинтезу становить 7;
- продуцент – мезофіл, оптимальна температура росту і синтезу ферменту 24 °С

[48];

Такі умови є оптимальними для росту і розвитку більшості мезофільних мікроорганізмів. Це потребує необхідності забезпечення асептичних умов під час біосинтезу. Культивування можна проводити поверхневим або глибинним методом. Поверхнєве культивування заключається у вирощуванні аеробних мікроорганізмів на поверхні рідких і твердих поживних середовищ. При цьому мікроорганізми отримують кисень безпосередньо із повітря. У зв'язку з цим при поверхневому культивуванні стараються збільшити площину зіткнення середовища з повітрям. При такому вирощуванні складніше досягти асептичних умов через велику площу зіткнення середовища з повітрям.

Тому для культивування даного мікроорганізму є доцільним використовувати глибинний спосіб культивування.

Асептичні умови забезпечуються стерилізацією всього обладнання, приміщень, комунікацій, поживного середовища, аераційного повітря. Для запобігання контамінації у ферментері створюється надлишковий тиск.

Глибинний метод культивування використовують на рідких середовищах, в яких мікроорганізми розвиваються по всій товщі. Так як мікроорганізми можуть утилізувати тільки розчинний в воді кисень, розчинність кисню у воді невелика, то для забезпечення росту аеробів їх необхідно постійно збагачувати киснем. Перевага глибинного культивування заключається у тому, що цей спосіб не потребує великих площ і громіздкого обладнання, об'єм ферментаторів можна збільшити за рахунок збільшення висоти. Перевагою являється також простота обслуговування, можливість автоматизації, а головне, зручність видалення непошкодженого цільного продукту із культуральної рідини.

Глибинне культивування мікроорганізмів може бути періодичним або безперервним. Безперервне культивування являє собою процес в якому клітини тривалий проміжок часу перебувають в експоненційній фазі росту. В ході якого додають нове поживне середовище і відбирають надлишок утвореної культури. Постійне оновлення середовище не дає клітинам досягнути стаціонарної фази. Нашому продуценту необхідно досягти стаціонарної фази, у зв'язку з тим, що йому потрібно насинтезувати фермент – хондроїтиназу. Це зумовлює використання для біосинтезу періодичного культивування.

Отже, для виробничого біосинтезу ферменту хондроїтинази, як вторинного метаболіту використовують глибинний метод культивування періодичним способом, що відбувається в стерильних умовах.

Вибір ферментера. Тип ферментерів (біореакторів) для кожного біотехнологічного процесу вибирають з урахуванням специфіки продуцента, властивостей середовища та економічних міркувань.

Важливим є забезпечення належного рівня теплообміну в ферментері, оскільки життєдіяльність і метаболічна активність об'єктів залежить значною мірою від коливань температури. Тому потрібно встановити теплову сорочку, яка дозволить підтримувати температурний режим при культивуванні. Це відбувається за рахунок подачі у сорочку нагрітої води.

Перемішування широко застосовують в хімічній промисловості для одержання однорідних рідких сумішей взаємно розчинних компоненті, прискорення процесу розчинення твердої фази в рідкому, збільшення швидкості хімічних реакцій, інтенсифікації процесів теплообміну.

Мішалка у нашому випадку використовується для збільшення площі розділу фаз і тим самим збільшення аерації та для рівномірного розподілу біомаси бактерій, і рівномірного підтримання температури. Доцільно обрати ферментер з механічним перемішуванням рідини барботажного типу. Так як нам потрібно перемішувати

бактеріальні клітини, які характеризуються низькою чутливістю до зрізових зусиль, тому можливе використання мішалок будь-якого типу.

Найефективнішими будуть лопатеві мішалки, що застосовують для перемішування рідин з невеликою в'язкістю (до 0,01 Па·с). Лопатеві мішалки відрізняються простотою конструкції і низькою вартістю виготовлення. Найбільш прості за конструкцією мішалки з плоскими лопатями із смугової або кутової сталі, встановлені перпендикулярно або похило до напрямку їх руху. Частота обертання таких мішалок коливається від 18 до 200 об/хв.

Отже, культивування буде проводитися глибинним методом з використанням ферментера з лопатевим типом мішалки. Незважаючи на переваги безперервного способу культивування, так як фермент є вторинним метаболітом недоцільним буде підтриманням продуценту в експоненційній фазі росту, то ж культивування буде проводитися періодичним способом.

Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Acinetobacter sp. C26 вирощують на рідкому поживному середовищі такого складу (г/л): Хондроїтин сульфат-А – 0,6; М'ясний екстракт сухий – 15; Пептон – 10; MgSO₄ – 1,03; NaCl – 5; CaCl₂ – 0,01.

Культивування *Acinetobacter* sp. C26 проходить за рН 7,0. Так як рН деяких компонентів (хондроїтин сульфат, пептон) складає 6,5, то є потреба у підлученні. Також при стерилізації загальний рН середовища дещо знижується за рахунок дії високих температур, тому є необхідність у підготовці як 6% розчину HCl для підкислення так і 6% розчину NaOH для підлучення у процесі культивування.

Для контролю рН у інокуляторі на 10 л: готуємо та 6% розчин NaOH у розрахунку 0,8 мл на 1 л середовища, що приблизно підвищує рН з 6,2 до 7-7,1. В такій же кількості готуємо 6% розчин HCl.

Об'єм середовища для інокулятора на 10 л складає 5,68 л, тобто готуємо по 5 мл 6%-х розчинів NaOH та HCl у колбах.

Для інокулятора на 100 л, об'єм середовища якого складатиме 56,2 л готуємо 50 мл 6%-х розчинів NaOH та HCl у колбах.

Для ферментерах об'ємом 1000 л, об'єм середовища якого складатиме 556,2 л потрібно 450 мл. Так як рН контролюється датчиком, то готувати 450 мл 6%-х розчинів NaOH та HCl будемо у збірниках на 1 л, задля більшою зручністю та ефективності.

3.3. Обґрунтування стадій виділення і очищення субстанції для виробництва ЛЗ

Фермент хондроїтиназа розщеплює хондроїтинсульфати, що утворюються при травмах спинного мозку, тим самим сприяючи регенерації нервів та функціональному відновленню [70, 71].

При виборі методу виділення та очищення хондроїтинази з культуральної рідини необхідно враховувати наступні фактори:

1. Фізико-хімічні властивості культуральної рідини;
2. Властивості субстанції (термолабільність, стійкість до різних хімічних агентів);
3. Вимоги до кінцевої форми продукту (ступінь чистоти).

Зважаючи, що майбутній лікарський препарат буде ін'єкційного типу у фармацевтичній промисловості будуть використовуватися тільки ферменти високого ступеня очистки, без домішок, які можуть вплинути на організм людини.

Хондроїтиназа, яка синтезується штамом *Acinetobacter* sp. C26 [48] є екзометаболітом, тобто виділяється в культуральну рідину, тому при виділенні ферменту не застосовуються етапи виділення продукту із клітин продуцента.

Найвища активність хондроїтинази спостерігається за температури 42 °С, при збільшенні температури вище 60 °С втрачає активність та руйнується [48]. Демонструє найвищу каталітичну активність при рН 5 – 7. Хондроїтиназа, яка синтезується штамом *Acinetobacter* sp. C26 має молекулярну масу 76 кДа.

Культуральна рідина після біосинтезу містить, крім потрібного нам ферменту, біомасу продуцента і продукти його життєдіяльності. Тому першою стадією виділення цільового продукту є відділення біомаси продуцента.

Після відділення біомаси концентрація хондроїтинази у над осадовій рідині дуже низька та містить багато домішок (високо та низькомолекулярних). Тому наступний етап – звільнення ферментного розчину від сторонніх високомолекулярних речовин.

Наступним етапом необхідно забезпечити звільнення ферментного розчину від баластних речовин, щоб забезпечити високий ступінь чистоти ферментного препарату.

Так як хондроїтиназа є субстанцією для проектного ЛП парентерального способу введення, то випускатися має в сухому вигляді, тому наступною стадією передбачається сушіння.

Отже, технологія виробництва ферментних препаратів високої чистоти включає такі основні етапи:

- 1) відокремлення біомаси від культуральної рідини;
- 2) концентрування та виділення ферменту;
- 3) очистка виділеного ферменту;
- 4) кристалізація;
- 5) сушіння.

3.3.1 Обґрунтування способу відділення культуральної рідини від біомаси

Впродовж процесу культивування ми отримуємо 550,62 л культуральної рідини, яка потім йде на процес виїлення.

У залежності від властивостей біомаси та рідини для цих цілей можуть бути використані різні методи для відділення біомаси: сепаруванням, седиментацією, фільтруванням, флотацією, центрифугуванням.

Сепарування. Даний процес використовується у процесі одержання хлібопекарських і кормових дріжджів, ферментів, антибіотиків, а також багатьох інших продуктів хіміко-фармацевтичної, медичної і харчової промисловості.

Шляхом сепарування дозволяють обробити великі об'єми суспензій, що складно піддаються фільтруванню і сконцентрувати клітини більше 5 мкм.

Переваги методу:

- немає потреби в застосуванні фільтрувальних елементів, що дає змогу непотрібну для подальшої переробки фракцію використовувати як кормову добавку;
- матеріал обробляється з найменшими витратами активної речовини;
- процес легше піддається автоматизації, агрегати займають менше місця, легше мити устаткування.

Недоліки методу:

- швидке забруднення мундштуків і міжтарільчатого простору механічними включеннями й мертвими клітинами [78].

Фільтрація. Даний процес використовують у мікробіологічній промисловості з метою розділення: клітин, розчинів високо та низькомолекулярних сполук, спор, колоїдних частинок.

Основна характеристика процесу швидкість фільтрації (кількість фільтрату, що отримується з одиниці фільтруючої поверхні в одиницю часу).

Переваги методу:

- Менш енергоємний, порівняно з сепарацією.

Недоліки методу:

- Налипання клітин на фільтрі, шар яких знижує швидкість потоку рідини в процесі фільтрування.
- При фільтрації деяких культуральних рідин, зокрема культуральної рідині актиноміцетів, грибів, дріжджів, питомий опір драглистого осаду, що утворюється, дуже великий.
- Навіть тонкий шар осаду, який залишається після зрізання ножом, призводить до різкого зниження швидкості фільтрації [79].

Оскільки застосування фільтрації пов'язане із труднощами: закупорювання пор у фільтрах, малий розмір клітин бактерій, наявність різноманітних речовин у

культуральній рідині (залишки поживного середовища, метаболіти), то використання даного методу є недоцільним.

Седиментація. Седиментацію використовують для відділення конгломератів типу «кефірних зерен» у деяких процесах молочнокислого чи змішаного бродіння, а також під час біологічної обробки відходів активним мулом. Швидкість осадження біомас з культуральних рідин є низькою. Використовують у випадках при діаметрі частинок не менше 3 мкм.

Переваги методу:

- Не потребує дороговартісного обладнання;
- Не енергоємний.

Недоліки методу:

- Розтягнута в часі операція;
- Неможливість використання для виділення нестабільних продуктів.

Даний спосіб розділення є недоцільним через довготривалість процесу та невисокий ступінь очищення культуральної рідини від клітин продуцента.

Флотація. Використовується для виділення клітин дріжджів за рахунок того, що при вспінюванні культуральної рідини основна маса дріжджів переходить у піну, яку відділяють від рідини.

Переваги методу:

- Економічність;
- висока продуктивність і можливість використання в безперервних процесах.

Недоліки методу:

- Флотація не дає гарантій повного відділення біомаси від культуральної рідини.

Використання даного способу є недоцільним через неможливість використання його для відділення бактеріальних клітин з культуральної рідини, за рахунок нездатності бактерій адсорбувати на своїй поверхні бульбашки повітря та через малий розмір клітин [80].

Центрифугування. У мікробіологічній промисловості центрифуги широко використовують для розділення суспензій на рідину й тверді фази, що містять мікроорганізми, ферменти, амінокислоти й інші продукти біосинтезу кристалічної або аморфної структур.

У технологіях мікробного синтезу використовують різні типи центрифуг: осаджувальні, шнекові, безперервної дії, тощо. Центрифугування дає змогу виділяти з культуральних рідин біомасу бактерій, дріжджів, міцеліальних грибів.

Переваги методу:

- Висока продуктивність і високий ступінь концентрування;
- відносно низька тривалість процесу;
- висока продуктивність
- можливість варіювати розмір розділювальних часток.

Недоліки методу:

- Складність конструкції;
- висока вартість.

Висновок: проаналізувавши всі способи відокремлення біомаси від культуральної рідини доцільним буде обрати спосіб центрифугування, як найбільш ефективний спосіб розділення бактерій від культуральної рідини. Він дозволить швидко та ефективно відділити супернатант від біомаси продуцента.

Вибір центрифуги. За принципом дії центрифуги поділяються на:

- Осаджувальні;
- Фільтрувальні;
- Комбіновані.

Комбіновані центрифуги поєднують два або більше принципів поділу, наприклад, осадження і фільтрування. Їх використовують для комбінованого розділення суспензій і неоднорідних рідких систем.

Фільтрувальні центрифуги використовують при розділенні тонко дисперсних суспензій із розміром частинок 20-200 мкм і об'ємною концентрацією твердої фази 5-40 %. Їх застосовують у випадках якщо осад погано фільтрується.

Осаджувальні або відстійні центрифуги використовують при поділі грубодисперсних суспензій, якщо частинки 0,2-5 мкм і об'ємною концентрацією твердої фази 5-50 %. Досягається високий ступінь зневоднювання осаду. Фільтрувальні об'єднують два типи відділення, це фільтрування і осадження.

Найкращим вибором для відділення біомаси, зважаючи на розмір клітин (1,0—1,5 × 1,5—2,5 мкм) в нашому випадку є осаджувальна центрифуга.

Отже, враховуючи об'ємну концентрації культуральної рідини, потрібний ступінь відділення ми вибираємо осаджувальну центрифугу Rousselet Robatel DRC60 (рис 3.1).



Рис. 3.1 Осаджувальна центрифуга Rousselet Robatel DRC60

В процесі культивування ми отримуємо 550,62 л культуральної рідини, яка потім подається в збірник культуральної рідини об'ємом 700 л. В рубашку збірника подається вода охолоджена для охолодження культуральної рідини до 5-10 °С, для зберігання перед центрифугуванням.

Обладнання сконструйоване для роботи в періодичному режимі з робочим об'ємом 60 л, що задовольняє нашу потребу в переробці 550,62 л культуральної рідини після ферментації.

За приблизними розрахунками маса вологого осаду, який одержують під час центрифугування 1 л суспензії становить 7,4 г/л, тоді об'єм волого осаду в суспензії становить приблизно 3910 мл, також втрати суспензії при центрифугуванні приймемо за середні 4,5 %, тоді втрати суспензії при центрифугуванні складатимуть 24,8 л. Разом об'єм отриманого супернатанту з урахуванням втрат при центрифугуванні складатиме приблизно 522 л, тобто для наступної стадії будемо розраховувати апарати, опираючись на цей об'єм.

3.3.2 Обґрунтування способу виділення цільового продукту з супернатанту

Наступним етапом є виділення хондроїтинази з супернатанту.

Вимогами до проведення процесу виділення є:

- проведення процесу у м'яких умовах (при низькій температурі), для того, щоб не відбувалося зниження активності;
- очищення супернатанту від високомолекулярних речовин, більше 80 кДа, з розрахунку, що молекулярна маса хондроїтинази 76 кДа;

Першим етапом виділення хондроїтинази з культуральної рідини є концентрування.

Основними методами є випарювання та мембранні методи – ультрафільтрація, мікрофільтрація, діаліз.

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. Випарювання є тепловим процесом і використовують для зневоднення розчинів, суспензій з метою концентрації твердої фази або розчиненої речовини. Для термолабільних продуктів температури кипіння нижче 100 °С (для

культуральних рідин і екстрактів, що містять ферменти - 30...40 °С) досягаються шляхом створення відповідного вакууму у випарних апаратах.

Недоліки даного методу:

- необхідність нагрівання, яке проводять при низькому тиску, що призводить до втрати активності ферменту;
- не відбувається відділення цільового продукту від низькомолекулярних речовин.

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 [79].

Даний метод також недоцільно використовувати для концентрування ферментів, так як даним методом на мембрані затримуються лише великі частки, а молекули хондроїтинази затримуватися не будуть.

Діаліз - процес очищення розчинів високомолекулярних речовин (наприклад, ферментів) від розчинених в них низькомолекулярних речовин за допомогою напівпроникної мембрани. З одного боку мембрани знаходиться початковий розчин, з іншої – чиста вода. Присутні в розчині низькомолекулярні речовини шляхом дифузії проходять через мембрану і віддаляються разом з водою. Білки або інші високомолекулярні речовини, молекули яких більше пор мембрани, залишаються в розчині, і, таким чином, їх розчин очищається від низькомолекулярних домішок [79].

Істотними недоліками є:

- При діалізі можлива «втрата» ферменту в результаті вимивання іонів металів, що входять до складу молекули ферменту;
- В процесі діалізу одночасно з очищенням відбувається сильне розведення ферментного розчину через проникнення води під дією сил прямого осмосу в діалізуємих розчин. то внаслідок діалізу отримують дуже розбавлені ферментні розчини [81].

Також діаліз має невисоку швидкість процесу. Тому зараз цей метод очищення ферментних розчинів від баластних речовин майже не використовується.

Ультрафільтрація - процес концентрації 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. Сьогодні для ультрафільтрування і зворотного осмосу використовують поки тільки мікропористі анізотропні та ізотропні – мембрани. Під час експлуатації поверхня мембран забруднюється, що різко погіршує показники процесу розділення [79, 82].

Переваги методу:

- Високий ступінь очищення;
- Розчинена речовина не піддається дії робочого тиску;
- Концентрація і очищення здійснюються без зміни агрегатного стану і фазових перетворень;
- Продукт не піддається тепловим і хімічним впливам.

Недоліки методу:

- Велика вартість процесу;
- Забивання пор мембрани осадами або адсорбованими молекулами.

Даний метод є найбільш ефективний для швидкого очищення супернатанту від високомолекулярних речовин з огляду на використання фільтрів з малим розміром пор.

Ультрафільтрацію супернатанту здійснюють на установці циклічної дії при температурі 10 ± 1 °С. При ультрафільтрації відбувається розділення супернатанту на високомолекулярну фазу (концентрат) та низькомолекулярну – пермеат.

При ультрафільтрації може відбуватися забивання пор мембрани осадом, що призводить до зниження продуктивності ультрафільтраційної установки. Для того, щоб запобігти цьому здійснюють промивання мембрани водою.

Розмір пор мембрани повинен бути меншим за діаметр молекул хондроїтинази, щоб затримувати на мембрані молекули ферменту, та пропускати низькомолекулярні домішки для одночасного концентрування ферменту та діалізу.

Розрахуємо розміри пор мембран для ультрафільтрації:

Молекулярна маса хондроїтинази становить 76000 Да, діаметр молекул:

$$D = 0,098 \times M^{0.38} = 0,098 \times 76000^{0.38} \approx 7 \text{ нм.}$$

Отже, на першій стадії використовують мембрани з розміром пор 2 нм для концентрування розчину хондроїтинази, і одночасного видалення низькомолекулярних речовин (амінокислот, солей, органічних кислот).

Як матеріал для виготовлення ультрафільтраційних мембран в основному використовуються полімерні речовини - ацетат целюлози, полісульфон, поліамід.

Найдоцільніше використовувати мембрани з полісульфонамідів марки УПМ-20, які мають розміри пор 2 нм, так як вони мають набагато більшу продуктивність, порівняно з ацетатцелюлозними мембранами [83].

Виділення ферменту проводитиметься на ультрафільтраційній установці The MMS SW25 (рис. 3.2) з робочим об'ємом 30 л, продуктивність якої складає до 450 л за годину, при об'ємі супернатанту 522 л.

Для розрахунку об'єму концентрату, що ми отримуємо після ультрафільтрації приймемо, що втрати у процесі становлять 9,5 %, тоді об'єм разом з втратами буде становити 472,4 л. У процесі ультрафільтрації приймемо, що коефіцієнт концентрування становитиме 10, тоді приблизно ми отримуємо 47 л концентрату для наступної стадії.

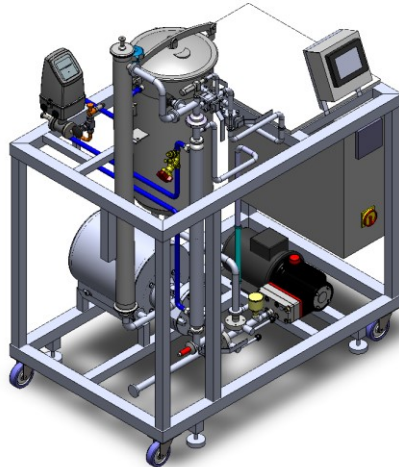


Рис. 3.2. Зовнішній вигляд ультрафільтраційної установки

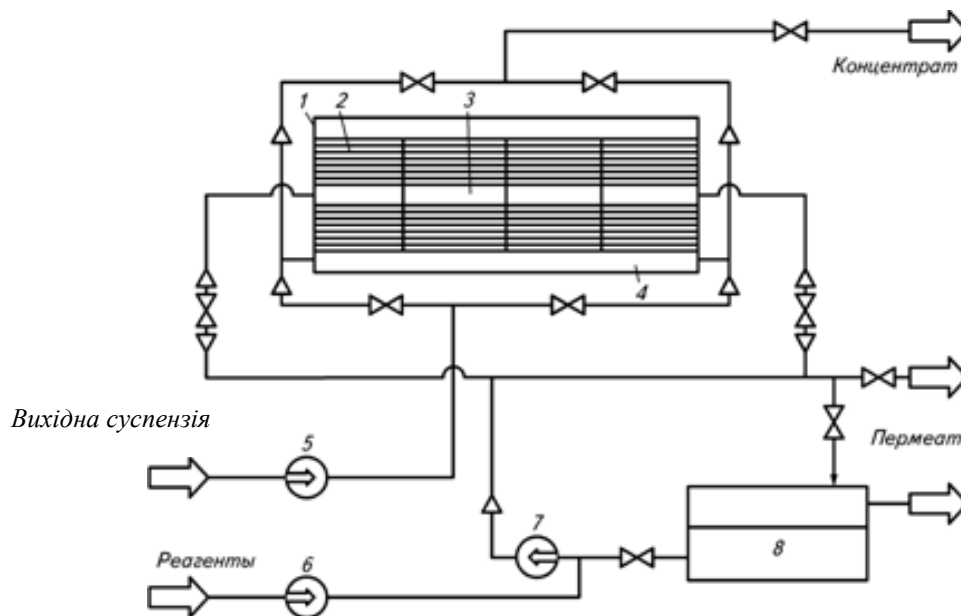


Рис. 3.3. Схема ультрафільтраційної установки

1 - напірний корпус; 2 - мембранний елемент; 3 - центральна труба - канал пермеату; 4 - канал вихідної суспензії і відведення концентрату під час зворотнього промивання; 5-7 - насоси; 8 - бак зворотнього промивання.

3.3.3 Обґрунтування способу попередньої очистки цільового продукту

Виділення ферментів із складної суміші речовин представляє значні труднощі, оскільки для агрегації білкових молекул і випадання їх в осад слід чітко дотримуватись певних умов.

Розчинність білків в різних розчинниках визначається розподілом на поверхні їх молекул гідрофобних і гідрофільних груп. Змінюючи деякі властивості води як основного розчинника білків, можна створити певне оточення білкових молекул, вплинути на їх гідратний або сольватний шар і викликати агрегацію молекул та випадання їх в осад.

В промисловості осаджують ферменти з використанням органічних розчинників і солей.

Осадження - процес, в якому додавання певних реагентів або зміна фізико-хімічних умов викликає випадання розчиненої речовини (частіше за весь білок) в осад.

Найчастіше для осадження ферментів використовують нейтральні солі (в цьому випадку процес називають висолюванням) або органічні розчинники, а також методи, засновані на зміні температури або рН розчину, додаванні високомолекулярних полімерів і ін.

Тому для виділення хондроїтинази осадженням частіше застосовують сульфат амонію, оскільки він добре розчинний у воді і на більшу частину ферментів не здійснює негативного впливу.

Перевагами використання сульфату амонію є:

- сульфат амонію доступний в достатньо чистому вигляді та є достатньо дешевим
- він добре розчинний у воді, що дозволяє отримувати чіткий поділ білкових фракцій;
- розчинність його мало залежить від температури;
- він не має шкідливого впливу на ферменти [84].

Отже, осадження хондроїтинази проводитиметься за допомогою сульфату амонію.

Згідно з результатами досліджень [71] осадження сульфатом амонію з концентрацією розчину 70% є найефективнішим.

Отже, на кожен літр ферментного розчину необхідно 700 г сульфату амонію. Так як з попередньої стадії ультрафільтрації ми отримали 47 л концентрату, то нам знадобиться 32,9 кг сульфату амонію. Опираючись на цей об'єм будемо використовувати реактор-змішувач об'ємом 100 л, у якому здійснюється осадження хондроїтинази сульфатом амонію.

Після осадження проводиться центрифугування для відділення осаду. Для відділення осаду ферменту найдоцільніше використовувати фільтруючі центрифуги, так як вони забезпечать відокремлення осадженого ферменту від солі, яка використовувалася для осадження.

Ми будемо використовувати автоматизовану фільтруючу центрифугу фірми «Heinkel» HF 600.1 об'ємом 52 л (рис. 3.4), що дозволить нам відділити фермент.

Перевагами даної центрифуги є:

- Універсальність, можливість обробки широкого діапазону суспензій;
- Можливість вбудовування в автоматичні системи очищення. Всі стадії процесу відділення твердої фази і фільтрації можуть проходити в автоматичному режимі з заданими параметрами;
- Забезпечення високої якості очищення твердої фракції;
- Висока продуктивність.



Рис. 3.4. Фільтруюча центрифуга «Heinkel» HF 600.1

Розраховуємо приблизний об'єм осадженого ферменту: з 550,62 л культуральної рідини при концентрації ферменту 0,5 г/л ми маємо отримати 275,31 г абсолютно сухої хондроїтинази; у процесі центрифугування (5 % втрат), ультрафільтрації (9,5 % втрат) та осадження (10 % втрат), за розрахунками, ми отримуємо 215 г абсолютно сухої хондроїтинази (АБХ). Враховуючи вміст вологи, приймемо 10 %, отримуємо 240 г вологого осаду. Отриманий розчин після осадження йде на знешкодження відходів.

3.3.4 Обґрунтування способу очищення цільового продукту

Очистку ферментів найчастіше здійснюють хроматографічними методами: іонообмінною хроматографією, гель-фільтрацією, афінною хроматографією.

Розглянемо переваги та недоліки даних методів.

Афінна хроматографія є різновидом лігандообмінної хроматографії. Розділення за методом афінної хроматографії засноване на різного роду вибірковій (специфічній) взаємодії біологічно активних молекул суміші, що проходить через колонку (рухома фаза) з закріпленими (імобілізованими) на носії специфічними молекулами (лігандами) нерухомої фази.

Через складність підбору специфічних молекул, що будуть з'єднуватися з біологічно активними молекулами суміші цей метод є недоцільним.

Гель-хроматографія на відміну від інших варіантів хроматографії, де розділення іде за рахунок різних видів взаємодії компонентів суміші з поверхнею сорбенту, роль твердого наповнювача в ексклюзійній хроматографії полягає тільки у формуванні пор певного розміру, а нерухомою фазою є розчинник, що заповнює ці пори. Розділення засноване на відмінностях у розмірах молекул: молекули малих розмірів проникають у порівняно тонкі пори сорбенту і затримуються в них.

Недоліком методу є те, що гель-фільтрація застосовується тільки для очистки невеликої кількості продукту, так як продуктивність даного методу дуже низька, даний метод не використовується в промислових умовах.

Іонообмінна хроматографія – базується на реакціях іонного обміну в гетерогенних системах в динамічних умовах. Рухома фаза – рідка. Як сорбенти

використовують іоніти – високомолекулярні сполуки, нерозчинні в воді та деяких органічних розчинниках, які мають в своєму складі функціональні групи, здатні обмінювати свої іони на іони із розчина.

Спорідненість іона до іонообмінника залежить від його природи, заряду та інших факторів. Різниця в ступенях розподілу компонентів між рухомою фазою та іонообмінником дають можливість проводити розділення.

Перевагами іонообмінної хроматографії є:

- висока селективність,
- простота методу
- можливість автоматизації.

Іонообмінна хроматографія поділяється на катіонообмінну та аніонообмінну.

Для здійснення катіонного обміну сорбент повинен містити у своїй структурі кислотні групи, іон водню яких легко обмінюється на катіон електроліту, що знаходиться в розчині (катіонообмінний сорбент або катіоніт).

У разі аніонообмінної сорбції сорбент повинен містити у своїй структурі групи, що мають властивості основ, тобто гідроксиду; іон цих груп повинен обмінюватися на аніони електроліту, що знаходяться в розчині (аніонообмінний сорбент або аніоніт).

Вибір іонообмінника здійснюється на основі ізоелектричної точки хондроїтинази (табл. 3.4).

Таблиця 3.4

Вибір іонообмінників для білків з відомою біоелектричною точкою [85]

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

Так як ізоелектрична точка хондроїтинази 8,2 – 8,5, то здійснюється очистка методом катіонообмінної хроматографії. [85].

При виборі буфера потрібно виключити конкуренцію його іонів з білком. Розчинність білка в ізоелектричній точці мінімальна, тому, щоб уникнути випадання білка в осад, слід вибирати рН, зрушений відносно рІ не менше, ніж на 0,5 од. При значеннях рН нижче ізоелектричної точки, білок має позитивний заряд і адсорбується на катіонообміннику.

Далі необхідно вибрати матрицю (нерухому фазу) до якої буде приєднуватися фермент. Сильні іонообмінники повністю іонізуються в широкому робочому діапазоні рН (тобто не демонструють втрат або посилення заряду при зміні рН), тоді як слабкі іонообмінники лише частково іонізуються у вузькому діапазоні рН (тобто заряд може суттєво змінюватися залежно від рН). Сильні іонообмінники часто використовуються для початкової розробки та оптимізації протоколів очищення (і для зв'язування білків зі значеннями рІ, що лежать до крайніх кінців шкали рН). На відміну від цього, слабкі іонообмінники є більш гнучкими з точки зору селективності і є більш поширеним вибором для розділення білків, які зберігають свою функціональність у діапазоні рН 6–9, а також для лабільних білків, які можуть вимагати м'яких умов елюції [86].

Через те, що сильні катіонообмінні смоли не використовують у промисловості, через неможливість розділення лабільних білків, які можуть вимагати м'яких умов елюції, тому ми оберемо слабкий катіоніт - карбоксиметилцелюлоза або КМ-сефароза (інша назва).

Наступним етапом ми обираємо буферний розчин. Буфер не повинен взаємодіяти з функціональними групами іонообмінника (тобто позитивно заряджені буфери слід використовувати при аніонообмінні, і навпаки). Можна використовувати ацетатний буфер, фосфатний та тріс-НСІ, проте ми обираємо фосфатний буфер через те, що це більш економічно вигідно та простіша схема приготування. Нарешті, слід вибрати рН буфера, який дозволяє білку залишатися стабільним, одночасно дозволяючи йому

оборотно зв'язуватися з матрицею. Він також повинен бути досить близьким до рН, при якому білок починає дисоціювати від колонки, щоб уникнути необхідності регулювати рН, тобто рН 7,5 [86, 87].

Підсумовуючи ми обираємо як нерухому фазу катіоніт КМ-целюлозу [86], як буфер обираємо 50 мМ фосфатного буферу з рН 7,5 [87]. Елюцію проводимо 25 мМ NaCl в тому ж буфері при постійній температурі 5 °С.

Спочатку колонку попередньо збалансовують 50 мМ фосфатним буфером з рН 7,5, потім отриманий ферментний осад після центрифугування (приблизно 240 г) розчиняють у 100-кратному об'ємі цього ж буферу з рН 7,5 тобто в 24 л та пропускають через колонку протягом 30 хв для з'єднання активних позитивних груп ферменту з негативно зарядженою карбоксильною групою катіоніту. Потім елюють 25 мМ NaCl в тому ж буфері зі швидкістю потоку 50 мл / хв упродовж 90 хв, тим самим іони натрію зв'язуючись з карбокси групою смоли витісняють фермент.

Для етапу хроматографії обираємо хроматографічну систему **Prochrom Varicol 6-110**, з діаметром колонки 110 мм [88].

Після елюції відбувається збір чистих фракцій ферменту; змішані фракції повторно циркулюють через колонки. Зокрема після хроматографії ми отримуємо з урахуванням втрат (5 %) приблизно 23 л розчину на подальший процес, з них абсолютно сухої хондроїтинази (АБХ) 204 г.

Зображення хроматографічної установки наведено на *рис. 3.5*.



Рис. 3.5. Зовнішній вигляд хроматографічної системи Prochrom Varicol 6-

110

Після очистки шляхом хроматографії розчин ферменту потрібно повторно ультрафільтрувати для видалення зокрема хлоридом натрію, за допомогою якого здійснювалася елюція ферменту з колонки.

Тому на наступному етапі необхідно відділити ці низькомолекулярні домішки. Це можна здійснити шляхом ультрафільтрації, яка є досить продуктивним методом, та дозволяє здійснити і очищення ферменту від домішок, і концентрування ферментного розчину.

Ультрафільтрацію здійснюють на установці **The MMS SW18** при постійній температурі 5 °С. Використовуємо мембрани з полісульфонамідом марки УПМ-20, які мають розміри пор 2 нм для відділення низькомолекулярних домішок.

Для розрахунку об'єму концентрату, що ми отримуємо після ультрафільтрації приймемо, що втрати у процесі становлять 9,5 %, тоді об'єм разом з втратами буде становити 20,81 л. У процесі ультрафільтрації приймемо, що коефіцієнт концентрування становитиме 10, тоді приблизно ми отримуємо 2,1 л концентрату для наступної стадії в якому вміст хондроїтинази в абсолютно сухому стані становитиме 184 г.

Наступною стадією очистки є кристалізація.

Кристалізація білків використовується як завершальна стадія очищення та як метод стабілізації при зберіганні.

Щоб почалася кристалізація, необхідно створити такі умови, в яких білковий розчин стає перенасиченим, що призводить до білкової агрегації.

Знижують рН розчину ферменту до 7 (контроль за допомогою рН-метра) тим же самим буферним розчином та додають поліетиленгліколь таким чином, щоб отримати концентрацію поліетиленгліколю 15%, тобто до 2,1 л додають 320 г. Як затравку додають приблизно 0,5 – 2 г ферменту і суміш залишають стояти у реакторі-змішувачі знизивши температуру до кімнатної (17-18 °С) приблизно протягом одного тижня, отримуючи білі або безбарвні голкоподібні або призматичні кристали хондроїтинази [87].

Далі здійснюють відокремлення кристалічного осаду центрифугуванням за допомогою фільтруючої центрифуги **Rousselet Robatel RC 30 Vx** з робочим об'ємом до 2,75 л [89].

У процесі кристалізації та подальшого центрифугування за приблизними розрахунками та з урахуванням втрат у процесі кристалізації та центрифугування (5 %) отримаємо 175 г абсолютно сухого ферменту.

3.3.5 Обґрунтування способу сушіння

Після кристалізації здійснюють сушіння. Сушіння може здійснюватися в розпилюючих, пневматичних сушарках, сушарках з киплячим шаром, сублімаційних та вакуумних сушарках.

Пневматична сушарка (рис. 3.6) є найбільш простою сушаркою, яка заснована на конвективному теплопереносі. Повітря гріють за допомогою калориферу подається разом з матеріалом в сушильну шафу. Сухі частки препарату відділяються від повітря в циклоні, а відпрацьоване повітря поступає на додаткове очищення у фільтрі.

Недоліками даного типу сушарок є те, що вона використовує повітря яке нагріте до високих температур, що може негативно впливати на кінцеві властивості продукту.

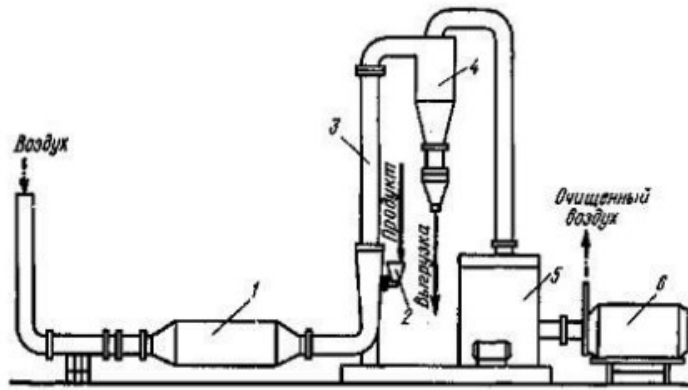


Рис 3.6 Схema пневматичної сушарки: 1 - калорифер; 2 - живильник; 3 - сушильна труба; 4 - циклон-віддільник; 5 - фільтр; 6 – вентилятор

Вальцева сушарка (рис. 3.7) використовується у випадках, коли сушінню підлягають пастоподібні або кашоподібні матеріали, які витримують короткострокове сушіння, при порівняно високих температурах, зокрема деякі продукти мікробного синтезу, встановлюють вальцові сушарки, в яких сушіння відбувається на зовнішній поверхні вальців.

Найчастіше використовуються для сушіння кормових дріжджів із вмістом сухих речовин до 20...25 %, а також інших пастоподібних біошротів. Процес сушіння проводиться за суворого контролю температурного режиму, щоб уникнути денатурації білків. На вальцових сушарках межа температури теплоносія становить 70...80 °С.

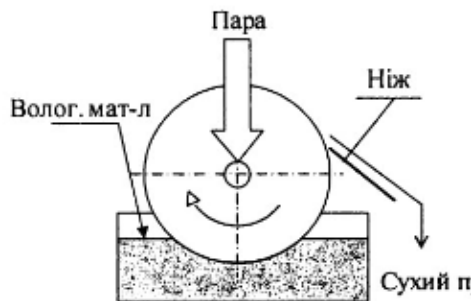


Рис 3.7 Вальцева сушарка

Сублімаційна сушарка (рис. 3.8), метод сушіння ґрунтується на вилученні вологи з матеріалу, який знаходиться у замороженому стані. При цьому лід переходить в газовий стан, обминаючи рідкий. Більшу частину часу сушіння

матеріалу знаходиться при температурі $-15\dots-30$ °.Оскільки процес ведуть при дуже низьких тисках (50/150 Па), то на матеріал не діє не тільки тепло, але й кисень повітря. Заморожування вологого неживого матеріалу труднощів не виникає, але вони виникають при заморожуванні живої біомаси в нормальне середовище. Якщо занадто швидко заморожувати живу біомасу без вживання запобіжних заходів кристалики льоду пошкоджують біологічні мембрани і клітини гинуть. Для попередження цього біомасу обробляють спеціальними розчинами, наприклад глюкози, гліцерину тощо, які не дають утворюватися кристаликам з гострими краями. Занадто швидке охолодження те негативно впливати на кінцевий продукт.

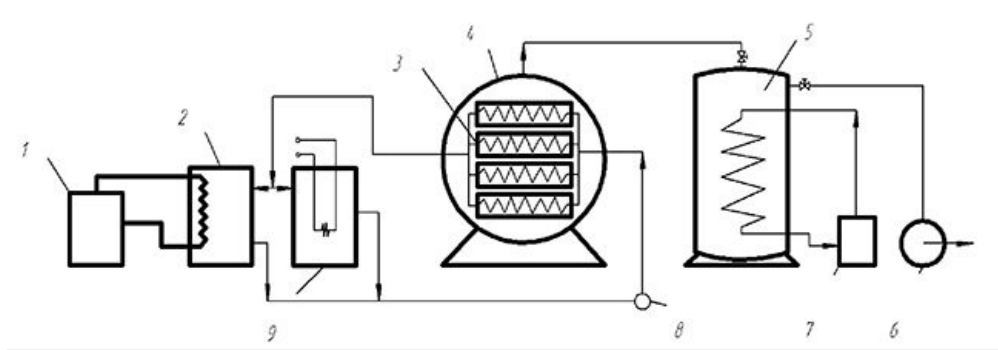


Рис 3.8 **Схема сублімаційної сушарки:** 1, 7 - холодильні установки; 2 – холодильник; 3 – полиці; 4 – субліматор; 5 – конденсатор; 6 - вакуум-насос; 8 –насос; 9 - ємність для нагріву теплоносія.

Вакуум-сушильна шафа (*рис. 3.9*) працює в періодичному режимі і являє собою шафу циліндричної або прямокутної форми та закривається герметично. Як і сублімаційні сушарки, вони призначені для сушіння нетерmostійких матеріалів, але процес відбувається за кімнатної або підвищеної температури.

Сушіння матеріалу у вакуум-сушильній шафі триває декілька годин, після закінчення процесу матеріал охолоджують і вивантажують із сушарки, потім процес сушіння знову повторюють.

Сушіння відбувається періодично, тобто у шафу на полиці закладють вологий матеріал, створюють вакуум, починають обігрівання шафи паром через порожнини в плитах або електричним струмом. Процес закінчують, коли матеріал матиме певну

залишкову вологість, після чого готовий сухий матеріал зважують. Ці апарати призначені для сушіння порівняно невеликих кількостей вологого матеріалу.

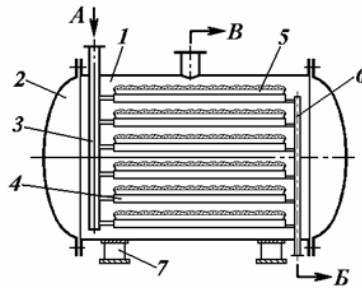


Рис 3.9 Вакуум-сушильна шафа:

1 - корпус; 2 - кришка; 3 - паровий колектор; 4 - нагрівні плити; 5 - полиці з матеріалом; 6 - колектор для відведення конденсату; 7 - опора; Потіки: А - гріюча пара; Б - конденсат; В - пароповітряна суміш

Розпилювальна сушарка (рис. 3.10) найбільш широко застосовують для сушіння продуктів мікробіологічного синтезу, оскільки забезпечують найшвидше сушіння, не потребують точного забезпечення і витримки потоку теплоносія, температура якого може порівняно невисокою. Призначена для висушування рідких матеріалів (розчинів, суспензій, рідких паст) до стану сипучого дрібнодисперсного порошку, являють собою вертикальні камери зазвичай круглої форми. Вихідний вологий матеріал розпилюється механічними, пневматичними або дисковими розпилювачами у верхній частині камери, і дрібні краплі (зазвичай середнім розміром 20-40 мм) падають вниз, контактуючи своєю поверхнею з сушильним агентом, що подається прямо-або протитоком по відношенню до низхідного руху крапель матеріалу. Висушений до стану сухого порошку продукт знаходиться на нижньому, кінчному днищі апарату і безперервно вивантажується з апарату через центральний патрубок.

Розпилювальні сушарки відносно стійкі в роботі (при відсутності засмічення механічних або пневматичних форсунок) і дозволяють отримувати висушені матеріали у вигляді однорідного порошку.

Недоліки таких сушарок – в підвищених витратах сушильного агента і енергії, як на нагрівання сушильного агента, так і на розпорошення вихідного рідкого продукту. Габарити розпилювальних сушарок досягають десяти і більше метрів [90].

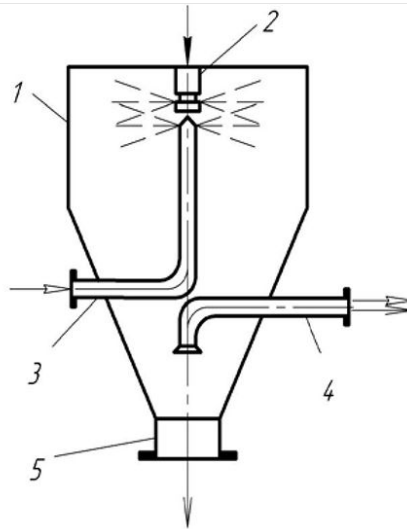


Рис 3.10 **Схема розпилювальної сушарки:**

1 – корпус; 2 - розпилювальне пристрій; 3 - введення теплоносія; 4 - виводок теплоносія; 5 - відведення готового продукту.

Висновок: під час вибору методу й режиму сушіння матеріалів різної природи основним критерієм є якість сухого продукту. Для висушування різних фармацевтичних препаратів частіше застосовується сублімаційний метод.

Сублімаційна сушарка була вибрана, оскільки сушка сублімацією є найкращим методом якісного консервування при виробництві цілого ряду нових лікарських засобів, що містять речовини біологічного походження. Сублімаційне сушіння захищає біологічні матеріали в процесі їхнього зберігання, тому що без вологи багато хімічних, фізичних і ферментаційних процесів гальмуються чи взагалі припиняються.

Так як об'єм отриманого продукту за цикл становить приблизно 175 г, оберемо лабораторну сублімаційну сушарку «LG-08» (рис. 3.11) – вона виготовлена для фармацевтичних цілей, згідно стандартів GMP. Призначена для сушіння термічного матеріалу такого як вакцини, антибіотики, пробіотики, ферментні препарати, гормони, продукти крові. Об'єм даної сушарки становить до 2 л, що задовольняє наші потреби стосовно техніко-економічним показникам проектованого виробництва.



MINIPRESS.RU

Рис. 3.11 Лабораторна сублимаційна сушарка «LG-08» [91]

Сублимаційне висушування вимагає перед етапом заморожування, етап внесення захисного середовища, яке повинно забезпечувати біопротекторний та структуроутворюючий ефект. Захисне середовище повинно мати високий протективний ефект, забезпечуючи необхідний рівень життєздатних клітин. Існує безліч захисних середовищ, які відрізняються за структуроутворюючим компонентом (желатин, натрій карбоксиметилцелюлоза, полівілпіролідон, крохмаль картопляний).

З розчинних речовин в захисних середовищах застосовуються цукри і продукти білкового походження. Вуглеводи зазвичай застосовують в поєднанні з колоїдами, рідше в якості простих захисних середовищ. Використовують різні їх концентрації від 1 до 10% і більше.

Проте, так як ми будемо використовувати отриманий фермент для фармацевтичного виробництва доцільним буде використовувати захисне середовище з желатином або бичачим сироватковим альбуміном, проте зважаючи на економічну доцільність обираємо желатин [87].

Співвідношення ферменту та желатину складатиме 1:0,2 з огляду на збереження високої активності ферменту. Спочатку ми переносимо отриманий фермент масою 175 г у колбу на 600 мл, потім доливаємо 200 мл 50 мМ фосфорного буферу (рН 7),

додаємо 35 г желатину та перемішуємо. Далі виливаємо все на піддони для подальшої сушки.

Отже, сушіння хондроїтинази здійснюватиметься за допомогою сублімаційної сушарки, оскільки вона забезпечує тривале збереження структури хондроїтинази та низький ризик забруднення продукту і з урахуванням витрат (4 %) ми отримуємо 168 г абсолютно сухого ферменту.

Після сушіння отриманий продукт потрібно подрібнити, просіяти та упакувати для подальшої реалізації.

Дробарки класифікують за багатьма критеріями: за призначенням, за функціями, за принципом (особливостями) роботи та за типом сировини, яку вони здатні переробляти.

Подрібнення може здійснюватися до середніх розмірів (на молотковому млині); до тонкого і дрібного стану (на дисмембраторі і кульовий дробарці); до надтонкого стану.

Найдоцільніше здійснювати подрібнення висушеного ферменту до надтонкого стану (приблизно 0,1 мкм) оскільки в подальшому субстанцію хондроїтинази будуть використовувати для отримання ЛПІ парентерального способу введення, тому ми маємо отримати порошок ліофілізованого ферменту щонайменшого розміру частинок.

Оберемо лабораторний вібраційний кульковий млин **ММ 200** [92] (*рис. 3.12*) – компактний універсальний лабораторний прилад, який був розроблений спеціально для сухого подрібнення невеликих об'ємів речовин до розміру в 10 мкм. Корисний об'єм даного млина становить 20 мл за одне завантаження, що задовольняє наші потреби в подрібненні 168 г ліофілізованого продукту.



Рис. 3.12 Лабораторний вібраційний кульковий млин MM 200

Після подрібнення необхідно здійснити просіювання ферменту, для того щоб відсіяти неподрібнені частинки, та забезпечити однорідність розмірів часток готового продукту, що дуже важливо для фармацевтичного виробництва.

Аналіз розмірів і розподілу часток дуже важливий для досліджень і розробки, виробництва, контролю якості та моніторингу продукції.

З огляду на невеликий об'єм матеріалу для просіювання (приблизно 166 г) обираємо невелику лабораторну просіваюльну машину **AS 200 jet** [93] (*рис. 3.13*), яка має такі переваги: короткий час просіювання, точність аналізу і зручність в роботі, а також відповідність вимогам стандарту ISO 9001, простота експлуатації, ергономічний дизайн, не потребує технічного обслуговування. Максимальна кількість продукту для просіювання: 100 г. Діапазон розділення до 10 мкм, що задовольняє наші потреби.



Рис. 3.13. Просіваюльна машина AS 200 jet

Після сушіння, подрібнення та просіювання необхідно упакувати сухий порошок у поліетиленові пакети. Фасовка порошку здійснюється у поліетиленові пакети. Так як маса порошку невелика (приблизно 164 г) доцільно здійснювати фасування у поліетиленові пакети по 5 г, задля зменшення ризику погіршення активності ферменту. Обираємо вакуумний пакувальний апарат **ІТА-08** [94] (рис. 3.14), який вакуумує продукт для більшого терміну зберігання.



MINIPRESS.RU

Рис. 3.14. Вакуумний пакувальний апарат ІТА-08

Загалом ми маємо отримати сухий порошок хондроїтинази масою приблизно 164 г за цикл з розміром часточок 10 мкм вакуумований у поліетиленові пакети.

Недоліки та переваги кожного етапу виділення та очистки ферменту хондроїтинази можна розглянути у *таблиці 3.5*.

Вибір способу виділення та очистки хондроїтинази

Метод	Переваги	Недоліки	Висновок
Етап 1. Відділення культуральної рідини від біомаси			
Флотація	<ul style="list-style-type: none"> Економічність 	<ul style="list-style-type: none"> Низька продуктивність щодо відділення бактерій 	<ul style="list-style-type: none"> Неможливість використання його для відділення бактеріальних клітин з культуральної рідини
Сепарування	<ul style="list-style-type: none"> Немає потреби в застосуванні фільтрувальних елементів 	<ul style="list-style-type: none"> Швидке забруднення мундштуків і міжтарільчатого простору механічними включеннями й мертвими клітинами 	<ul style="list-style-type: none"> Недоцільне використання через невеликий об'єм середовища
Фільтрація	<ul style="list-style-type: none"> Менш енергоємний 	<ul style="list-style-type: none"> Налипання клітин на фільтри, шар яких знижує швидкість потоку рідини в процесі фільтрування 	<ul style="list-style-type: none"> Труднощі із закупорюванням пор у фільтрах
Седиментація	<ul style="list-style-type: none"> Не потребує дорогівартісного обладнання Не енергоємний 	<ul style="list-style-type: none"> Розтягнута в часі операція Неможливість використання для виділення нестабільних продуктів 	<ul style="list-style-type: none"> Є недоцільним через довготривалість процесу Невисокий ступінь очищення культуральної рідини
Центрифугування	<ul style="list-style-type: none"> Висока продуктивність і високий ступінь концентрування Відносно низька тривалість процесу 	<ul style="list-style-type: none"> Висока вартість 	<ul style="list-style-type: none"> Обираємо цей метод через високу продуктивність процесу
Етап 2. Відділення високомолекулярних речовин з супернатанту			
Випарювання	<ul style="list-style-type: none"> Висока питома теплота конденсації Високий коефіцієнт тепловіддачі 	<ul style="list-style-type: none"> Громіздкість обладнання Складність регулювання процесу 	<ul style="list-style-type: none"> Втрата активності ферменту

Продовження табл. 3.5

Діаліз	<ul style="list-style-type: none"> Очищення від низькомолекулярних домішок 	<ul style="list-style-type: none"> Втрата активності ферменту Розведення ферментного розчину 	<ul style="list-style-type: none"> Невисока швидкість процесу та сильне розведення ферменту
Мікрофільтрація	<ul style="list-style-type: none"> Продукт не піддається тепловим і хімічним впливам Механічний вплив на біологічний матеріал незначний 	<ul style="list-style-type: none"> Часта заміна фільтрів Забивання пор мембран 	<ul style="list-style-type: none"> Неможливість розділення за рахунок неподходящий розмірів пор у фільтрі
Ультрафільтрація	<ul style="list-style-type: none"> Легко забезпечуються герметичність і асептичні умови Висока продуктивність процесу Продукт не піддається тепловим і хімічним впливам 	<ul style="list-style-type: none"> Низька швидкість процесу Висока вартість процесу 	<ul style="list-style-type: none"> Обираємо цей метод через широкі можливості відділення речовин різного розміру за рахунок зміни фільтрів з різним розміром пор
Етап 3. Очищення цільового продукту.			
Афінна хроматографія	<ul style="list-style-type: none"> Висока специфічність 	<ul style="list-style-type: none"> Складність синтезу адсорбентів 	<ul style="list-style-type: none"> Складність підбору специфічних молекул, що будуть з'єднуватися з біологічно активними молекулами
Гель-хроматографія	<ul style="list-style-type: none"> Простота методу 	<ul style="list-style-type: none"> Застосовується тільки для очистки невеликої кількості продукту 	<ul style="list-style-type: none"> Розділення проходить за рахунок різниці в молекулярній масі, що є недостатньо специфічною для фармацевтичних потреб

Іонообмінна хроматографія	<ul style="list-style-type: none"> • Висока селективність • Можливість автоматизації 	<ul style="list-style-type: none"> • Складність методу 	<ul style="list-style-type: none"> • Обираємо цей метод через високий коефіцієнт розділення суміші та виділення потрібного продукту за рахунок специфічного до нього адсорбенту
Етап 4. Кристалізація цільового продукту.			
Кристалізація охолодженням	<ul style="list-style-type: none"> • При високій температурі можна розчинити велику кількість речовини, що розчиняється 	<ul style="list-style-type: none"> • Чутливі до температури речовини, які розкладаються при підвищених температурах 	<ul style="list-style-type: none"> • Недостатня ефективність для використання у фармацевтичному виробництві
Кристалізація випарюванням	<ul style="list-style-type: none"> • Використовують якщо речовина має високу розчинність при низькій температурі 	<ul style="list-style-type: none"> • Появою пухирців газу, які можуть служити центрами нуклеації 	<ul style="list-style-type: none"> • Важко визначити точки затравки і параметри масштабування
Кристалізація висолуванням	<ul style="list-style-type: none"> • Простота методу 	<ul style="list-style-type: none"> • Підбір оптимальної речовини, що знижує розчинність потрібного компонента 	<ul style="list-style-type: none"> • Обираємо цей метод через високий коефіцієнт виділення ферменту

Отже, процес виділення та очистки хондроїтинази складається з таких етапів:

- 1) центрифугування;
- 2) ультрафільтрація;
- 3) осадження сульфатом амонію та відділення осаду центрифугуванням;
- 4) іонообмінна хроматографія;
- 5) ультрафільтрація;
- 6) кристалізація та відділення осаду центрифугуванням;
- 7) сушіння у сублімаційній сушарці;
- 8) подрібнення на вібраційному кульковому млині;
- 9) просіювання;
- 10) фасування сухого порошку у поліетиленові пакети.

Обґрунтування вибору допоміжних робіт

Допоміжними роботами при виділенні та очищенні хондроїтинази є приготування допоміжних розчинів:

- 1) буферу для іонообмінної хроматографії [95].

Приготування робочого 50 мМ фосфатного буферного розчину з рН 7,5:

0,89 г динатрію гідрофосфату дигідрату розчиняють в приблизно 80 мл води, коректують рН 8,5% (об / об) розчином фосфорної кислоти до значення 7,5 і доводять об'єм розчину дистильованою водою до 100,0 мл.

Так як нам потрібно 24 л буферу, тоді беремо 213,6 г динатрію гідрофосфату дигідрату замість 0,89 г порахувавши по пропорції. Перевіряють рН буферу і при необхідності підтитрують.

- 2) 25 мМ розчину NaCl для елюції хондроїтинази при іонообмінній хроматографії.

Розрахуємо концентрацію розчину:

$$25 \text{ мМ NaCl} = 0,025 \text{ М}$$

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

$$\text{В } 1 \text{ моль} - 58,5 \text{ г}$$

$$\text{В } 0,025 \text{ моль} - X$$

$$X = 58,5 \times 0,025 = 1,47 \text{ г}$$

Отже, концентрація розчину становить 1,47 г/л. Для приготування 25 мМ розчину NaCl 1,47 г NaCl розчиняють у 1 л дистильованої води. Нам потрібно приблизно 4,5 л для елюції, тому для приготування 25 мМ розчину NaCl 6,62 г NaCl розчиняють у 4,5 л дистильованої води.

3) Розрахунок кількості сульфату амонію для осадження.

Розрахуємо концентрацію розчину:

На кожен літр ферментного розчину необхідно 700 г сульфату амонію. Так як з попередньої стадії ультрафільтрації ми отримали 47 л концентрату, то нам знадобиться 32,9 кг сульфату амонію. Опираючись на цей об'єм будемо використовувати реактор-змішувач об'ємом 100 л, у якому здійснюється осадження хондроїтинази сульфатом амонію.

4) Розрахунок кількості поліетиленгліколю для кристалізації.

Розрахуємо концентрацію розчину:

Ми маємо отримати розчин з концентрацією поліетиленгліколю 15 %. Отриманий після ультрафільтрації розчин об'ємом 2,1 л ми переносимо в реактор-змішувач об'ємом 3 л та додаємо 0,32 кг поліетиленгліколю.

5) Приготування захисного середовища

Співвідношення ферменту та сахарози складатиме 1:0,4.

Спочатку ми переносимо отриманий фермент масою 175 г у колбу на 600 мл, потім доливаємо 200 мл 50 мМ фосфорного буферу (рН 7) та додаємо 70 г сахарози та перемішуємо.

3.4 Обґрунтування вибору класів чистоти виробничих приміщень виробництва

ЛЗ, вибору первинної упаковки та її підготовки

Обґрунтування вибору класів чистоти виробничих приміщень

Для стадій культивування та початкових стадій виділення немає потреби в підготовці вентиляційного повітря, оскільки всі процеси проходять в замкнутих комунікаціях. Підготовка приміщень є важливою на кінцевих стадіях кінцевого виділення цільового продукту, де є ризик забруднення сторонньою мікробіотою.

Лікарські засоби слід виробляти відповідно до правил належної виробничої практики – Good Manufacturing Practice (GMP). Основною вимогою під час організації виробництва стерильних препаратів наявність ізольованих приміщень і відповідних технологічних засобів. Так як даний проект присвячений розробці препарату для парентерального застосування, через небезпеку перехресної контамінації потрібно передбачити додаткові заходи, зокрема організацію виробництва за принципом окремих циклів роботи та використання закритих систем та забезпечити максимальну стерильність процесу. Конструкція обладнання має унеможливити зовнішню контамінацію, а також забезпечувати зручність і ефективність його очищення та стерилізації [96].

Характеристику виробничих приміщень для виробництва наведено у *табл. 3.6*

Таблиця 3.6

Характеристика виробничих приміщень

Найменування приміщень	Клас чистоти	Кількість КУО/м ³	Максимальна допустима кількість частинок в 1 м ³ повітря			
			Оснащений стан		Експлуатаційний стан	
			0,5 мкм	5,0 мкм	0,5 мкм	5,0 мкм
Зона для наповнення	A	не > 1	3500	0	3500	0
Приміщення для приготування лікарського препарату	B	не > 10	3500	0	350 000	2000

Ступінь чистоти приміщення (зони) забезпечується за рахунок створення високих асептичних умов. Для цього проводять підготовку вентиляційного повітря, підготовку приміщень та обладнання.

Стадії наповнення та закупорювання повинні здійснюватися в класах чистоти В з обмеженою зоною А, де буде розміщуватись основне та допоміжне технологічне обладнання для кінцевих стадій стерилізації та підготовки лікарського препарату та наповнення.

Контроль мікробної контамінації поверхонь виробничих приміщень проводить мікробіолог цеху: для приміщень класів чистоти В

(з локальними зонами класу А) та С - вибірково два рази на тиждень під час виробничого процесу і один раз на два тижні безпосередньо після обробки приміщень; для приміщень класу чистоти О - один раз на тиждень під час виробничого процесу та один раз на місяць після обробки дезінфікуючими засобами, мікробіолог відділу контролю якості (ВКЯ)- вибірково.

У виробничих приміщеннях класу чистоти В (з локальними зонами класу А) в процесі роботи у змивах з поверхонь приміщень площею 100 см допускається наявність не більше двох колоній неспоруотворюючих мікроорганізмів на двох паралельних чашках Петрі. Після обробки дезінфікуючими розчинами у змивах з поверхонь приміщень не допускається наявність життєздатних мікроорганізмів на двох паралельних чашках Петрі.

У виробничих приміщеннях класу чистоти С в процесі роботи у змивах з поверхонь приміщень площею 100 см² допускається наявність не більше п'яти колоній неспоруотворюючих мікроорганізмів на двох паралельних чашках Петрі. Після обробки дезінфікуючими розчинами у змивах з поверхонь приміщень не допускається наявність життєздатних мікроорганізмів на двох паралельних чашках Петрі.

У виробничих приміщеннях класу чистоти D в процесі роботи у змивах з поверхонь приміщень площею 100 см² допускається наявність не більше десяти колоній неспоруотворюючих мікроорганізмів на двох паралельних чашках Петрі. Після обробки дезінфікуючими розчинами у змивах з поверхонь приміщень не допускається наявність життєздатних мікроорганізмів на двох паралельних чашках Петрі.

Підготовка персоналу

Захист біотехнологічної продукції (особливо харчового, медичного та фармацевтичного призначення) від забруднень, джерелом яких служить людина, є однією з основних проблем технологічної гігієни; і вирішується вона, як правило, завдяки особистій гігієні співробітників і використанню технологічного одягу.

Організація та функціонування відповідної системи є й виготовлене виробництво лікарських засобів, які залишаються від людей. Тому необхідно мати достатню кількість персоналізованого персоналу для зменшення всіх завдань, які знають і справді важливі результати. Кожен співробітник повинен чітко виконувати індивідуальну надійність, яка має бути документована. У виробничих зонах носять захисний одяг. Не дозволяється їсти, пити, палити, зберігати її, напоїти, тютюнові вироби або особисті лікарські засоби у виробничих зонах. Працівники з відкритими ранами, а також з інформацією про конфліктну ситуацію, не існують у виробничих лікарських продуктах.

Персонал, що входить у виробниче приміщення, повинен бути одягненим у спеціальний одяг, який відповідає виконуваним виробничим операціям. Технологічний одяг персоналу має відповідати класу чистоти тієї зони, в якій він працює, тобто максимально захищати продукт виробництва від частинок, що виділяються людиною.

У приміщеннях класу чистоти А/В слід носити стерильний брючний костюм або комбінезон, головний убір, бахіли, маску, гумові або пластикові рукавички. Якщо це можливо, то слід використовувати одноразовий або спеціалізований технологічний одяг і взуття з мінімальним ворсовиділенням і пиломісткістю. Нижня частина штанів має бути захованою всередину бахіл, а рукави – у рукавички. Головний убір повинен повністю закривати волосся і бути вставленим у комір костюма. Важливе значення має тканина, з якої виготовляється технологічний одяг. Вона повинна мати мінімальні ворсовиділення, пиломісткість, пилепроникність, а також повітропроникність не нижче $300 \text{ м}^3/(\text{м}^2 \cdot \text{с})$, гігроскопічність — не менше 7 %, не накопичувати електростатичний заряд. За кордоном для технологічного одягу використовують тканини з поліестерних, поліпропіленових або поліалкідних волокон, в нашій країні — тканину з лавсану і бавовни. Багато значить і частота зміни одягу, що залежить від кліматичних умов і пори року. За наявності кондиційного повітря одяг рекомендується міняти не рідше 1 разу на день, а захисну маску — кожні 2 год. Гумові рукавички міняють після кожного контакту зі шкірою обличчя, а також у будь-якому разі, коли виникла небезпека їх забруднення. До працівників у «чистих» зонах висуваються жорсткі вимоги відносно їх особистої гігієни та чистоти. У

«чистих» приміщеннях забороняється носити наручні годинники, ювелірні вироби, косметику. Весь персонал (включаючи зайнятих складанням і технічним обслуговуванням), працюючий у «чистих» зонах, має проходити систематичне навчання щодо правильного виробництва стерильних продуктів, гігієни й основ мікробіології.

Визначення мікробної контамінації рук персоналу проводиться: для персоналу, що працює у виробничих приміщеннях класів чистоти В (з локальними приміщеннями класу А) і С - два рази на тиждень під час виробничого процесу і один раз на два тижні після обробки рук дезінфікуючим розчином вибірково у декількох робітників; для персоналу, що працює у виробничих приміщеннях класу чистоти D - один раз на тиждень під час виробничого процесу та один раз на місяць після обробки дезінфікуючими засобами.

У виробничих приміщеннях класу чистоти В (з локальними зонами класу А) після обробки дезінфікуючими розчинами у змивах з рук (рукавичок) не повинно міститися мікроорганізмів. У процесі роботи в змивах із рук (рукавичок) одного працюючого допускається наявність не більше двох колоній неспороутворюючих мікроорганізмів на двох паралельних чашках Петрі.

У виробничих приміщеннях С класу чистоти після обробки дезінфікуючими розчинами у змивах з рук (рукавичок) не повинно міститися мікроорганізмів. У процесі роботи в змивах з рук (рукавичок) одного працюючого допускається наявність не більше п'яти колоній неспороутворюючих мікроорганізмів на двох паралельних чашках Петрі.

Обґрунтування вибору дезінфікуючих засобів

Дезінфекція потрібна для знищення мікроорганізмів, надмірна кількість яких може призвести до зараження продукту.

Миючі та дезінфікуючі засоби слід контролювати на мікробіологічну чистоту. Їх розчини потрібно зберігати у попередньо очищеній тарі та суворо дотримуватись строків зберігання.

Для проведення обробки приміщень застосовують дезінфікуючі речовини, що відповідають наступним вимогам:

- широкий спектр антимікробної дії;
- мала токсичність для людини;
- відсутність псування об'єктів, що обробляються;
- хороша розчинність у воді;
- стабільність при зберіганні [наказ МОЗ України №275 від 15.05.2006].

При виборі дезінфікуючих речовин також необхідно враховувати їх вартість та витрати на обробку потрібної площі виробничого приміщення. На

1 м² витрачається приблизно 100 мл робочого розчину мийного чи дезінфікуючого засобу (згідно з методичними рекомендаціями щодо підготовки виробничих приміщень, наказ МОЗ України №502 від 14.12.2001).

Засоби для миття та дезінфекції стін, підлоги, вікон та дверей

Для уникнення набуття резистентності мікроорганізмів до дезінфікуючих засобів дуже важливо на підприємстві чергувати їх. Для щоденного прибирання доцільним є обрати засіб, який не містить в своєму складі хлору, задля зменшення ризику травмування персоналу на виробництві, так як він належить до небезпечних речовин, а генеральне прибирання приміщення слід засобом, який містить хлор.

Порівняємо 3 деззасоби: «Ексан-про-дез», "Хлорантоін" та "Полідез-А", які мають широкий спектр дії та досить часто використовуються в промисловості.

«Хлорантоін» - хлорактивний, багатоконпонентний, поліфункціональний дезінфекційний засіб з миючим ефектом. Видаляє механічні білкові, жирові забруднення, залишки крові, залишки лікарських засобів із зовнішніх поверхонь, внутрішніх каналів та порожнин виробів медичного призначення.

Водні розчини Хлорантоїну прозорі, безбарвні, мають помірний запах хлору, не ушкоджують об'єкти, які виготовлені із металу (неіржавіюча сталь, хром-нікелева сталь, алюміній тощо), скла, гуми, полімерних та комбінованих матеріалів, дерева, кахлю, порцеляни, фаянсу, поверхні медичних приладів і устаткування з лакофарбовим, гальванічним та полімерним покриттям, не фіксують білкові та жирові забруднення на поверхні виробів медичного призначення, добре змиваються, не залишають нальоту [97].

"Полідез" – засіб, що не містить хлору, для дезінфекції поверхонь предстерилізаційної очистки багатofункціонального призначення.

Дія. Має сильну бактерицидну, туберкулоцидну, фунгіцидну дію. Ефективний проти грам-позитивних і грам-негативних бактерій, аеробних, анаеробних мікроорганізмів. Зокрема, бактерій групи кишкової палички, стрептококів, стафілококів, сальмонел, а також біоценозів бактерій, грибів, водоростей і амеб.

Призначений для дезінфекції всіх видів технологічного обладнання, комунікацій, ємностей, інвентарю, тари, спецодягу, транспортних засобів і поверхонь виробничих, допоміжних, побутових приміщень [98].

Ексан-про-дез – мийно-дезінфікуючий засіб з антибактеріальною дією, для миття забруднених поверхонь устаткування і приміщень.

До складу входить: ПАР, гліцерин, етиловий спирт, антикорозійні, антибактеріальні добавки. Способи застосування: ручний (протирання, зрошення, замочування, занурення), механізований (із застосуванням машин для миття підлоги), в ультразвуковому і циркуляційному миючому обладнанні, з піногенератором, аерозольний. «Ексан-про-дез» належить до IV класу небезпеки (малонебезпечні речовина по ГОСТ 12.1.007-76) [99].

Порівнявши дані засоби в якості дезінфікуючого для виробництва доцільним буде обрати "Ексан-про-дез" та "Хлорантіон", через їх широкий дезінфікуючий спектр дії, низьку вартість робочого розчину, також їх можна застосовувати для оброблення об'єктів, що виготовлені з різних матеріалів. "Хлорантоін", оскільки він знищує практично всі потенційно небезпечні фактори забруднення доцільно використовувати для генерального прибирання, а "Ексан-про-дез" для щоденної дезінфекції.

Засоби для миття обладнання, інвентарю, комунікацій і тари

Миття обладнання, інвентарю, комунікацій від залишків поживного середовища та інших речовин можна здійснювати каустичною содою, миючим засобом «Біомой» та «Вімол».

Каустична сода (NaOH) безбарвна кристалічна речовина, має високу гігроскопічність. Добре розчиняється у воді. Водні розчини мають лужну реакцію.

Гарячі (1-2) % розчини каустичної соди добре обмилюють жири, гідролізують білки, розщеплюють вуглеводи. При зменшенні температури розчину мийні властивості засобу падають. Розчини каустичної соди кородують об'єкти, які виготовлені з алюмінію.

Засіб належить до високонебезпечних речовин (II клас небезпеки по ГОСТ 12.1.007). При попаданні на шкіру викликає хімічний опік. Подразнює слизову оболонку очей та верхніх дихальних шляхів.

Гарантійний термін зберігання 1 рік з дати виготовлення. Зберігають в пакуванні виробника в складських неопалюваних приміщеннях. Рекомендується використовувати 5% розчини каустичної соди для циркуляційного миття технологічного обладнання та комунікацій. Розчини каустичної соди не призначені для миття обладнання, комунікацій та інвентарю, які виготовлені з алюмінію.

«Біомой» – мийний засіб, що містить синтетичні поверхово-активні речовини та протеолітичні ферменти (лужна фосфатаза). Сипучий порошок від білого до світло жовтого кольору. Допускається наявність грудочок, які подрібнюються при натисканні, і забарвлених включень ензимів. Має характерний запах використаної сировини. Концентрація водневих іонів (рН) розчину з масовою часткою 1% 9,0-11,5 од. рН. Добре розчиняється у воді. Водні розчини засобу біомой прозорі, безбарвні, не псують вироби медичного призначення з металу, скла, полімерних матеріалів, гуми і комбінованих матеріалів. Засіб не сумісно з катіонними поверхнево-активними речовинами.

Являє собою порошок світлого кольору (від білого до світложовтого), який має помірний запах використаної сировини. Водні розчини біомою безбарвні, прозорі, виявляють мийні, емульгуючі та диспергуючі властивості, легко видаляють білково-жирову плівку з поверхонь технологічного обладнання, легко змиваються, не залишають нальоту.

На відміну від багатьох мийних засобів що представлені на ринку, Біомой виявляє високу мийну активність при температурі не вище +40 градусів Цельсія. Розчини біомою не ушкоджують об'єкти з нержавіючої сталі, чорного металоу з антикорозійним покриттям, алюмінію, скла, гуми, полімерних матеріалів, кахлю,

емалі. Добре змиваються не залишаючи нальоту. Засіб належить до малонебезпечних речовин (4 клас небезпеки по ГОСТ 12.1.007). Не спричиняє сенсibilізуючої дії.

Засіб мийний технічний «*Вітол*» володіє відмінними змочуючими, знежирюючими і очисними властивостями. «Вітол» ефективно розчиняє і видаляє білкові і жирові забруднення (переважно активного білка), а також з легкістю справляється з високодисперсними залишками продукту і механічними домішками на поверхнях, виготовлених з нержавіючої, хромонікелевої сталі, алюмінію, пластмаси, гуми, скла і різних полімерних матеріалів.

У рецептуру миючого технічного засобу «Вітол» входять синтетичні поверхнево-активні речовини неіоногенного типу, лужні і нейтральні солі.

Порівнявши вказані вище миючі засоби оберемо "Біомой", через його економічну доцільність. Даний засіб можна застосовувати для оброблення об'єктів, що виготовлені з широкого спектру матеріалів.

Обґрунтування стадій підготовки вентиляційного повітря

Вентиляційне повітря – це повітря, очищене від часток та мікроорганізмів у системі підготовки триступінчатої фільтрації, яке надходить до виробничих приміщень стерильних ЛЗ. Виробничі приміщення повинні мати ефективну систему припливної та витяжної вентиляції.

Системи підготовки вентиляційного повітря слід проектувати, виходячи зі спеціальних вимог до технологічних операцій, вимог до приміщень виробництва нестерильних лікарських засобів відповідно до приведеної класифікації в МР 64-1.1.-2001.

При визначенні місця забору повітря необхідно враховувати всі існуючі джерела забруднень (автотранспорт, газоподібні промислові викиди, димарі, квітучі рослини та ін.).

У системі подачі вентиляційного повітря у виробничі приміщення класу чистоти В та зони класу чистоти А застосовують трбулентний та ламінарний потік повітря відповідно.

Необхідні параметри температури та вологості мають забезпечуватись системами вентиляції та кондиціонування повітря. Вони мають бути обладнані

звуковбирними й віброгасячими пристроями, що знижують рівень шуму та вібрації до заданих меж, автоматичним регулюванням температури й вологості, блокуванням, сигналізацією [Наказ МОЗ України №502 від 14.12.2001].

Повітроводи слід періодично очищати та проводити їх дезінфекційну обробку. Очистка повітря у виробничих приміщеннях класу чистоти В та зони класу чистоти А має бути тріступінчастою. На кожному рівні очистки слід використовувати фільтри, що за ефективністю фільтрації відповідають вимогам європейських стандартів EN 779 та EN 1822.

На кожному рівні очистки слід передбачити штуцери з метою відбору проб повітря для визначення концентрації механічних часток до та після фільтрації.

Заміну фільтра тонкого очищення проводять по мірі його забруднення відповідно до даних різницевого манометра, який вимірює різницю тиску повітря, що надходить на фільтр і що виходить після фільтрації.

Кратність повітрообміну в виробничих приміщеннях В та А класів чистоти слід визначати з урахуванням особливостей технологічного процесу, розміру приміщення, обладнання, яке знаходиться в ньому, і кількості персоналу [Наказ МОЗ України №502 від 14.12.2001].

Обґрунтування вибору первинної упаковки

Основна мета первинної упаковки – забезпечення зручності та способу їх застосування, умов зберігання, а також здатності наближення фармацевтичної допомоги при використанні ліків.

Вибір упаковки та первинної тари проводиться індивідуально в кожному конкретному випадку і залежить від властивостей інгредієнтів, які входять до складу ЛП. Найважливішою вимогою щодо пакування та вибору пакувальних матеріалів є належний захист від дії зовнішніх факторів (вологи, кисню повітря, мікробного забруднення), властивостей складових ЛП.

Найголовніша складність виготовлення ферментних препаратів це збереження активності препарату, тому ліофілізований порошок для ін'єкцій є кращою лікарською формою у зв'язку зі збереженням активності на більш довгий термін, що є суттєвою перевагою перед розчинами для ін'єкцій. Тому в якості первинної

упаковки для ліофілізату є флакони об'ємом 5 мл, які закривається гумовою пробкою і алюмінієвим ковпачком типу К-2-20.

РОЗДІЛ 4. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ

4.1 Специфікація обладнання ділянки виробничого біосинтезу

Апаратурна схема (дод. 1) виконана на 1 листку формату А1 та відповідає процесам, зображеним на технологічній схемі із зазначенням точок контролю процесу.

Таблиця 4.1

Специфікація обладнання ділянки виробничого біосинтезу

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
1	2	3	4
ПЗ-1	Пристрій для забору повітря	1	Радіальний вентилятор ВЕЗА Вранов-3,55-1П Фірма: «Веца» (Україна)
Ф-2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтр G4. Фільтруючий матеріал – скловолокно Виробник: Компанія «Фармстрой» (Росія)
К-3	Компресор	1	Компресор Inversys 7 Plus з прямим приводом. Потужність 1000 л/хв. Максимальний робочий тиск 1,0 МПа. Виробник: «Далгакиран Компрессор Украина»
Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Охолоджувач повітря СWK 100-3-2,5. Максимальний робочий тиск 1,6 МПа, вихідна температура повітря 20 °С. Виробник: «Systemair» (Швеція)
РЕ-5	Ресивер	1	Ресивер РВ 500.600-19 Об'єм 500 л, робочий тиск 1,0 МПа. Виробник: «ДНТ-Прайм Група компаній, ООО» (Росія)
Т-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Водяний повітрянагрівник VBC. Максимальний робочий тиск 1,6 МПа (16 бар), макс. робоча температура 150 °С. Виробник: «Systemair» (Швеція)
Ф-7	Головний фільтр очистки повітря	1	Фільтр тонкої очистки NTR9 класу F9. Фільтруючий матеріал скловолокно. Максимальна робоча температура: 65 °С. Ступінь очищення становить 90- 99 % Виробник: ООО "ИНАКВА Технолоджис" (Росія)

НУХТ БТЕК 02.02.06 КР ПЗ

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 4. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ ВИРОБНИЧОГО	Літ.	Арк.	Акрюшів
Розроб.		<i>Іванов М.С.</i>					117	2420
Перевір.		<i>Пирог Т.П.</i>				Кафедра БТМ		
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		<i>Пирог Т.П.</i>						

Д-8 Д-9	Об'ємно-ваговий дозатор	2	Дозатор ваговий автоматичний GD1. Діапазон: 1–500 г (мл). Матеріал – Нержавіюча сталь. Виробник: Tschritter GmbH (Німеччина)
Д-10 Д-11	Об'ємно-ваговий дозатор	2	Дозатор ваговий напівавтоматичний. Діапазон: 50–10000 г (мл). Матеріал – Нержавіюча сталь. Виробник: TescoFluss» (Італія)
Д-12	Об'ємно-ваговий дозатор	1	Дозатор ваговий напівавтоматичний.VDD Діапазон: 0,1–50 кг (л). Матеріал – Нержавіюча сталь. Виробник: Rovema (Німеччина)
Ф-13 Ф-14 Ф-15	Індивідуальний фільтр очистки повітря	3	Фільтр абсолютної очистки повітря HIGH FLOW TETPOR HT Фільтруючий матеріал - фторопласт, Максимальна робоча температура: 150 °С., ступінь очищення повітря фільтром становить 99,995 % Виробник: ООО «Эир-Парт» (Росія)
Р-16 Р-17	Реактор для приготування та стерилізації титрувальних агентів	2	Реактор об'ємом 1 л для стерилізації в автоклаві. Матеріал – Боросилікатне скло. Розміри (ДхВ): 0,15х0,25 Виробник «Vuchiglasuster». (Швейцарія)
Р-18	Реактор-змішувач для приготування композиції Б	1	Реактор-змішувач об'ємом 5 л перемішувальним пристроєм (0-100 об/хв). Матеріал – Нержавіюча сталь sus316L Розміри (ДхВ): 0,29х0,4 Виробник «Vuchiglasuster». (Швейцарія)
І-19	Інокулятор	1	Інокулятор об'ємом 10 л, оснащений сорочкою, барботером, трубою перетискування, пробовідбірником, лопатевою мішалкою (до 0-250 об/хв) Розміри (ДхВ): 0,342х0,605 Матеріал – Нержавіюча сталь AISI 316L. Виробник: «BIOSTAT® Cplus» (Німеччина)
Р-20	Реактор-змішувач для приготування композиції Б	1	Реактор-змішувач об'ємом 60 л перемішувальним пристроєм (10-450 об/хв). Матеріал – Нержавіюча сталь sus316L Розміри (ДхВ): 0,4х0,61 Виробник: «Екафарм». (Україна)
Р-21	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації композиції А	1	Реактор-змішувач об'ємом 5 л, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (0-100 об/хв). Матеріал – Нержавіюча сталь sus316L Розміри (ДхВ): 0,29х0,4 Виробник «Vuchiglasuster». (Швейцарія)

Н-22	Насос відцентровий	1	Насос відцентровий. Продуктивність до 200 л/год. Виробник: «Vaterpass» (Україна)
Н-23	Насос відцентровий	1	Насос відцентровий. Продуктивність до 1000 л/год. Виробник: «Vaterpass» (Україна)
I-24	Інокулятор	1	Інокулятор об'ємом 100 л, оснащений сорочкою, барботером, трубою перетискування, пробовідбірником, лопатевою мішалкою (до 10-450 об/хв). Матеріал – Нержавіюча сталь AISI 316L. Розміри (ДхВ): 0,55х1,75 Виробник: «BIOSTAT® D-DCU» (Німеччина)
P-25	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації композиції А	1	Реактор-змішувач об'ємом 50 л, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (10-450 об/хв). Матеріал – Нержавіюча сталь sus316L Розміри (ДхВ): 0,35х0,85 Виробник: «Екафарм». (Україна)
P-26	Реактор-змішувач для приготування композиції Б	1	Реактор-змішувач об'ємом 600 л перемішувальним пристроєм (10-450 об/хв). Матеріал – Нержавіюча сталь sus316L Розміри (ДхВ): 0,9х2 Виробник: «Екафарм». (Україна)
ФР-27	Ферментер	1	Ферментер об'ємом 1000 л, оснащений сорочкою, барботером, пробовідбірником, лопатевою мішалкою (20-600 об/хв). Матеріал – Нержавіюча сталь AISI 316L. Розміри (ДхВ): 1,1х2,85 Виробник: «BioTechno Group» (Росія)

4.2 ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ

Технологічна схема біосинтезу включає допоміжні роботи (підготовка і стерилізація поживних середовищ) та технологічний процес (підготовка посівного матеріалу та культивування).

Креслення технологічної схеми (дод. 2) зроблене на аркуші формату А2, де зображені допоміжні роботи та технологічний процес.

Технологічну схему біосинтезу ферменту хондроїтинази наведено у графічній частині курсової роботи.

ДР 1. Підготовка аераційного повітря

ДР 1.1. Забір атмосферного повітря

Атмосферне повітря забирають через повітрозабірник (ПЗ-1) на висоті, як правило двох метрів над рівнем даху будівлі, де концентрація пилових часток і мікроорганізмів є мінімальною.

ДР 1.2. Попереднє грубе очищення повітря

Попередню очистку повітря здійснюють у фільтрі (Ф-2), що забезпечує ступінь очищення 80%. При проходженні повітря через фільтр грубого очищення, пил, механічні частки діаметром 5–10 мкм затримуються, знижується кількість контамінантів. Очищене повітря надходить у компресор (К-3).

ДР 1.3. Компресування повітря

Стиснення повітря відбувається за допомогою компресора (К-3), при цьому створюється тиск величиною 0,4 МПа, температура повітря підвищується від 120 до 250°C. Знищується значна кількість контамінуючої мікрофлори.

ДР 1.4. Охолодження повітря та видалення зайвої вологи

Для видалення вологи, що утворилася при компресуванні, повітря піддають швидкому охолодженню до 20 °С у теплообмінному апараті охолоджувачі (Т-4), далі видалену вологу подають на ресивер (РЕ-5), у якому відбувається видалення зайвої вологи до $W = 60-65 \%$.

ДР 1.5. Нагрівання повітря

Для забезпечення надійної роботи фільтрів та запобігання утворення конденсату пари, на волокнах головного та індивідуальних фільтрів, охолоджене повітря з ресивера (РЕ-5) у теплообміннику (Т-6) нагрівають до температури 30-40°C, при цьому допускається часткове підмішування гарячого повітря після компресора.

ДР 1.6. Очищення повітря в головному фільтрі

Повітря пропускають через головний фільтр (Ф-7), в якому фільтрувальним матеріалом є скловолокно. Охолоджене повітря, проходячи крізь фільтр, очищається від пилу та мікроорганізмів. Ступінь очищення становить $E = 95 \%$.

ДР 1.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

Перед кожним апаратом встановлюють індивідуальний фільтр (Ф-13, Ф-14, Ф-15), в якому фільтруючим матеріалом є фторопласт. Ступінь очищення становить $E = 99,995 \%$.

ДР 2. Приготування титрувальних агентів

ДР 2.1. Приготування стерильного 6-% розчину HCl

ДР 2.1.1 Приготування і стерилізація 6-% розчину HCl для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 10 л

У асептичних умовах у стерильну колбу об'ємом 100 мл стерильним циліндром наливають 4,1 мл стерильної дистильованої води, далі за допомогою мірного циліндру відміряють і додають 0,9 мл 35% розчину HCl та перемішують. Розчин роблять під витяжною шафою, відміряють за допомогою скляного мірного стакана та обов'язково саме до стерильної дистильованої води додають 35%-ву HCl, а не навпаки (для уникнення сильної екзотермічної реакції). Закривають скляною пробкою.

ДР 2.1.2 Приготування і стерилізація 6-% розчину HCl для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 100 л

У асептичних умовах у стерильну колбу об'ємом 200 мл стерильним циліндром наливають 41,4 мл стерильної дистильованої води, далі за допомогою

мірного циліндру відміряють і додають 8,6 мл 35% розчину HCl та перемішують. Розчин роблять під витяжною шафою, відміряють за допомогою скляного мірного стакана та обов'язково саме до стерильної дистильованої води додають 35%-ву HCl, а не навпаки (для уникнення сильної екзотермічної реакції). Закривають скляною пробкою.

ДР 2.1.3 Приготування і стерилізація 6-% розчину HCl для виробничого біосинтезу в ферментері об'ємом 1000 л

У попередньо простерилізований реактор (P-16) об'ємом 1 л у асептичних умовах стерильним циліндром наливають 373 мл стерильної дистильованої води, далі за допомогою мірного циліндру відміряють і додають 77,2 мл 35% розчину HCl та перемішують.

ДР 2.2. Приготування і стерилізація 6-% розчину NaOH

ДР 2.2.1 Приготування і стерилізація 6-% розчину NaOH для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 10 л

У колбу об'ємом 100 мл циліндром наливають 5 мл води для ін'єкцій, далі за допомогою вагів відміряють і додають 0,03 г кристалічного натрію та перемішують. Закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °C 40 хв.

ДР 2.2.2 Приготування і стерилізація 6-% розчину NaOH для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 100 л

У колбу об'ємом 200 мл циліндром наливають 50 мл води для ін'єкцій, далі за допомогою вагів відміряють і додають 0,3 г кристалічного натрію та перемішують. Закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °C 40 хв.

ДР 2.2.3 Приготування і стерилізація 6-% розчину NaOH для виробничого біосинтезу в ферментері об'ємом 1000 л

У реактор (P-17) об'ємом 1 л циліндром наливають 450 мл води для ін'єкцій, далі за допомогою вагів відміряють і додають 2,7 г кристалічного натрію та

перемішують. Закривають та стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С 40 хв.

ДР 3. Приготування та стерилізація поживного середовища

ДР 3.1 Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту об'ємом 570 мл в колбах на качалках

Для вирощування інокуляту необхідно приготувати 570 мл поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 570 мл середовища наведено у *табл. 4.2.*

Таблиця 4.2

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 570 мл середовища

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 0,57 л середовища, г (мл)	Композиція	Об'єм композиції (мл)
Хондроїтин сульфат	0,6	0,35	А	200,4
Вода		200		
М'ясний екстракт сухий	15	8,55	Б	270
Пептон	10	5,7		
Вода		255		
NaCl	5	2,85	В	100,5
CaCl ₂	0,01	0,01		
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,03	0,59		
Вода		97		
Разом:		570		570

ДР 3.1.1 Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах у колбі зважують 0,35 г хондроїтин сульфату, переносять в колбу об'ємом 500 мл, додають 200 мл води для ін'єкцій, перемішують. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при температурі 112 °С, 30 хв.

ДР 3.1.2 Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах у колбі зважують 8,5 г сухого м'ясного екстракту, 5,7 г пептону, переносять в колбу об'ємом 1 л, додають 256 мл води для ін'єкцій, перемішують. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при температурі 112 °С, 30 хв.

ДР 3.1.3 Приготування та стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 2,85 г NaCl, 0,01 г CaCl₂, 0,59 г MgSO₄·7H₂O, переносять у колбу об'ємом 200 мл, додають 97 мл води для ін'єкцій, закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С 40 хв.

ДР 3.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 10 л

Для одержання посівного матеріалу на даному етапі необхідно приготувати 5,68 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 5,68 л поживного середовища наведено в табл.4.3.

Таблиця 4.3

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 5,68 л середовища

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 5,68 л середовища, г (л)	Композиція	Об'єм композиції (л)
М'ясний екстракт сухий	15	85,2	А	1,2
Хондроїтин сульфат	0,6	3,41		
Пептон	10	56,8		
Вода		1		
NaCl	5	28,4	Б	4,1
CaCl ₂	0,01	0,06		
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,03	5,85		
Вода		4,1		
Конденсат		0,4		0,4
Разом:		5,68		5,68

ДР 3.2.1 Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах у колбі зважують 3,41 г хондроїтин сульфату, 85,2 г сухого м'ясного екстракту, 56,8 г пептону переносять у колбу об'ємом 2 л, додають 1 л води для ін'єкцій, закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112 °С, 30 хв.

ДР 3.2.2 Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 28,4 г NaCl, 0,06 г CaCl₂, 5,85 г MgSO₄·7H₂O, вносять у збірник об'ємом 5 л (Р-18) через об'ємно-ваговий дозатор (Д-8) додають 4,1 л води для ін'єкцій, вмикають мішалку та подають пару в сорочку до температури 35-40 °С до повного розчинення солей. Після чого, розчин зі збірника подають в інокулятор (І-19). В сорочку ферментера подають пару до температури 80-90 °С, далі в апарат подають гостру пару та стерилізують при температурі 131 °С 40 хв.

ДР 3.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 100 л

Для вирощування інокуляту на даному етапі необхідно приготувати 56,16 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 56,16 л поживного середовища наведено в *табл. 4.4*.

Таблиця 4.4

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 56,16 л середовища

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 56,16 л середовища, г (л)	Композиція	Об'єм композиції (л)
М'ясний екстракт сухий	15	842,4	А	3,5
Хондроїтин сульфат	0,6	33,7		
Пептон	10	561,6		
Вода		2		
NaCl	5	280,8	Б	47,9
CaCl ₂	0,01	0,56		
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,03	57,85		
Вода		47,5		
Конденсат		4,8		4,8
Разом:		56,16		56,16

ДР 3.3.1 Приготування і стерилізація композиції А

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д-9) вносять 33,7 г хондроїтин сульфату, 842,4 г сухого м'ясного екстракту, 561,6 г пептону, вносять у реактор об'ємом 5 л (Р-21) також через об'ємно-ваговий дозатор (Д-9) додають 2 л води для ін'єкцій, вмикають мішалку та подають пару в сорочку до температури 35-40 °С до повного розчинення компонентів. Після чого, в сорочку реактора подають пару до температури 80-90 °С, далі в апарат подають гостру пару та стерилізують при температурі 112 °С, 30 хв.

ДР 3.3.2 Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 280,8 г NaCl, 0,56 г CaCl₂, 57,85 г MgSO₄·7H₂O, вносять у збірник об'ємом 60 л (Р-20) через об'ємно-ваговий дозатор (Д-10) додають 47,5 л води для ін'єкцій, вмикають мішалку та подають пару в сорочку до температури 35-40 °С до повного розчинення солей. Після чого, за допомогою насоса (Н-22) розчин зі збірника подають в інокулятор (І-24). В сорочку інокулятора подають пару до температури 80-90 °С, далі в апарат подають гостру пару та стерилізують при температурі 131 °С 40 хв.

ДР 3.4. Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу в ферментері об'ємом 1000 л

Для вирощування інокуляту на даному етапі необхідно приготувати 556,2 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 556,2 л поживного середовища наведено в *табл. 4.5*.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 556,2 л середовища

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 556,2 л середовища, г (л)	Композиція	Об'єм композиції (л)
М'ясний екстракт сухий	15	8343	А	34,3
Хондроїтин сульфат	0,6	333,72		
Пептон	10	5562		
Вода		20		
NaCl	5	2781	Б	466,3
CaCl ₂	0,01	5,56		
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,03	572,9		
Вода		463		
Конденсат		55,6		55,6
Разом:		556,2		556,2

ДР 3.4.1 Приготування і стерилізація композиції А

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д-11) додають 333,72 г хондроїтин сульфату, 8343 г сухого м'ясного екстракту, 5562 г пептону вносять у реактор об'ємом 50 л (Р-25) також через об'ємно-ваговий дозатор (Д-11) додають 20 л води для ін'єкцій, вмикають мішалку та подають пару в сорочку до температури 35-40 °С до повного розчинення компонентів. В сорочку реактора подають пару до температури 80-90 °С, далі в апарат подають гостру пару та стерилізують при температурі 112 °С, 30 хв.

ДР 3.4.2 Приготування і стерилізація композиції Б

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д-12) додають 2781 г NaCl, 5,56 г CaCl₂, 572,9 г MgSO₄·7H₂O, вносять у збірник об'ємом 600 л (Р-26) також через об'ємно-ваговий дозатор (Д-12) додають 463 л води для ін'єкцій, вмикають мішалку та подають пару в сорочку до температури 35-40 °С до повного розчинення солей. Після чого, за допомогою насоса (Н-23) розчин зі збірника подають у попередньо простерилізований ферментер (ФР-27). В сорочку ферментера подають пару до

температури 80-90 °С, далі в апарат подають гостру пару та стерилізують при температурі 131 °С 40 хв.

ТП 4. Підготовка посівного матеріалу

*ТП 4.1. Підтримання колекційної культури *Acinetobacter* sp. С26*

Колекційну культуру *Acinetobacter* sp. С26 зберігають в пробірках із скошеним середовищем МПА в холодильнику з пересівом через 2 – 3 місяці. Всі роботи з колекційною культурою проводять строго в асептичних умовах.

*ТП 4.2 Одержання робочої культури *Acinetobacter* sp. С26*

Колекційну культуру *Acinetobacter* sp. С26, що зберігалася в пробірках з середовищем МПА, розсівають петлею до ізольованих колоній на чашки Петрі із середовищем МПА і вирощують при температурі 24 °С 26 годин.

*ТП 4.3. Вирощування робочої культури *Acinetobacter* sp. С26 на агаризованому середовищі*

Ізольовані колонії пересівають мікробіологічною петлею в пробірки зі скошеним м'ясо-пептонним агаром та інкубують протягом 26 год.

ТП 4.4. Вирощування інокуляту в колбах на качалках

У колбу об'ємом 1 л з композицією Б (від ДР 3.1.2) в асептичних умовах вносять в асептичних умовах вносять композицію В (від ДР 3.1.3) та композицію А (від ДР 3.1.1), перемішують і розливають стерильним мірним циліндром (200 мл) по 150 мл у чотири качалочних колб об'ємом 750 мл.

У пробірку з робочою культурою *Acinetobacter* sp. С26, вирощеною на МПА, вносять 5 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини, піпеткою вносять одержану суспензію у колби з розлитим поживним середовищем. Для засіву однієї колби використовують суспензію, одержану з однієї пробірки.

Культивування *Acinetobacter* sp. С26 здійснюють в колбах на качалці (200 – 220 об/хв) впродовж 26 год при температурі 24 °С. По закінченню процесу культивування, орієнтовна концентрація біомаси має становити приблизно 0,7 г/л

так як ми культивуємо до експоненційної фази росту. Після вирощування інокуляту здійснюють мікробіологічний контроль в кожній колбі.

Перевіряють посівний матеріал на відсутність сторонньої мікробіоти.

ТП 4.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 10 л

В попередньо простерилізований інокулятор (I-19) який містить 4,5 л простерилізованого розчину композиції Б (від ДР 3.2.2) в асептичних умовах через засівну колбу переносять композицію А (від ДР 3.2.1). В лабораторному боксі посівний матеріал (від ТП 4.4) зливають в одну стерильну засівну колбу об'ємом 1 л.

Перед внесенням посівного матеріалу, відбирають пробу для проведення мікробіологічного контролю. Посівний матеріал (від ТП 4.4) подають в асептичних умовах через одну стерильну засівну колбу об'ємом 1 л.

Вмикають мішалку, подають стерильне повітря в барботер, подають пару в рубашку (для підтримання температури 24°C), та культивують впродовж 13 год. Для підтримання рН (на рівні 7,0) використовують приготовані 6% розчин HCl (від ДР 2.1.1) та 6% розчин NaOH (від ДР 2.2.1). Кожні 6 год відбирають проби для проведення мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси. По закінченню процесу, орієнтовна концентрація біомаси має становити 0,7 г/л, оскільки культивування проводимо тільки до експоненційної фази росту.

ТП 4.6. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 100 л

В попередньо простерилізований інокулятор (I-24) який містить 52,7 л простерилізованого розчину композиції Б (від ДР 3.3.2) в асептичних умовах самопливом переносять композицію А (від ДР 3.3.1). Перед внесенням посівного матеріалу, відбирають пробу для проведення мікробіологічного контролю. Посівний матеріал (від ТП 4.5) подають самопливом з інокулятора (I-19).

Вмикають мішалку, подають стерильне повітря в барботер, подають пару в рубашку (для підтримання температури 24°C), та культивують впродовж 13 год. Для підтримання рН (на рівні 7,0) використовують приготовані 6% розчин HCl (від

ДР 2.1.2) та 6% розчин NaOH (від ДР 2.2.2). Кожні 6 год відбирають проби для проведення мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси. По закінченню процесу, орієнтовна концентрація біомаси має становити 0,7 г/л, оскільки культивування проводимо тільки до експоненційної фази росту.

ТП 5. Біосинтез

ТП 5.1. Виробниче культивування

В попередньо простерилізований ферментер (ФР-27) зі стерильною композицією Б (від ДР 3.4.2) в асептичних умовах самопливом з реактора (Р-26) переносять композицію А (від ДР 3.4.1). Перед внесенням посівного матеріалу, відбирають пробу для проведення мікробіологічного контролю.

Посівний матеріал (від ТП 4.5) подають через трубу перетискування з інокулятора (І-24).

Для підтримання рН (на рівні 7,0) використовують приготовані 6% розчин HCl (від ДР 2.1.3) та 6% розчин NaOH (від ДР 2.2.3). Вмикають мішалку, подають стерильне повітря в барботер, подають пару в рубашку та культивують при температурі 24 °С та культивують впродовж 26 год. Кожні 12 год відбирають проби для проведення мікробіологічного контролю, визначення рівня біомаси та концентрації хондроїтинази. В кінці процесу культивування, орієнтовна концентрація біомаси має сягати 1,4 г/л, а концентрація хондроїтинази 0,5 г/л.

ЗВ 6. Знешкодження відходів

Стічні води біотехнологічних виробництв можуть містити живу мікрофлору та інші шкідливі речовини. На виході з цеху стічні води спрямовують на очисні споруди. Відпрацьоване аераційне повітря знешкоджують.

ЗВ 6.1. Знешкодження газоподібних відходів

Повітря, що видаляється з ферментера, містить велику кількість мікроорганізмів. Повітря має високу вологість. Для відділення вологи використовують тканинні сітки з нержавіючого матеріалу або термостійкого пластику. На них сепарується близько 99% вологи.

Для очищення і стерилізації повітря, що виходить з ферментера, використовують фільтруючі елементи з мікрОВОЛОКОН боросилікатного скла. Фільтр з такого матеріалу має високу стерилізуючу здатність (до 99,99 %) і добре вловлює частинки розміром більше 0,6 мкм.

Очищене повітря викидається через трубу розсіювання.

ЗВ 6.2. Знешкодження рідких відходів

Проводять очищення води шляхом електрофлотації та зворотнього осмосу. Ступінь очистки води – 99%.

4.3 КОНТРОЛЬ ДІЛЯНКИ БІОСИНТЕЗУ

Карту постадійного контролю виробництва наведено у *табл. 4.6.*

Таблиця 4.6

Карта постадійного контролю біосинтезу культуральної рідини

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>
ДР 1. Підготовка аераційного повітря				
Кт 1.2. Грубе очищення повітря	Повітря на виході з фільтра, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення	E = 80 %, тиск згідно паспорту
Кт 1.3 Компресування повітря	Стиснене повітря, температура, тиск	Манометр технічний, термометр	Після компресування повітря	P = 0,3-0,5 МПа t = 120-250 °C
Кт 1.4 Охолодження повітря та видалення зайвої вологи	Охоложене повітря, повітря після видалення зайвої вологи, температура	Термометр технічний, психометричний метод	Після охолодження повітря та видалення зайвої вологи	t = 20 °C, W = 60-65 %
Кт 1.5 Нагрівання повітря	Нагріте повітря, температура	Термометр технічний	Після нагрівання повітря	t = 30-40 °C
Кт 1.6. Очищення повітря в головному фільтрі	Очищене повітря, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі головного очищення	E = 95 %, тиск згідно паспорту
Кт 1.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі	Очищене повітря, ступінь очищення	Перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря в індивідуальному фільтрі	E = 99,995 %

ДР 2. Приготування та стерилізація титрувальних агентів				
Кх 2.1.1 Приготування 6-% розчину HCl	Концентрація розчину HCl	Хімічний метод	Концентрація визначається після приготування розчину	C = 6%
Кх 2.1.2 Приготування 6-% розчину HCl	Концентрація розчину HCl	Хімічний метод	Концентрація визначається після приготування розчину	C = 6%
Кх 2.1.3 Приготування 6-% розчину HCl	Концентрація розчину HCl	Хімічний метод	Концентрація визначається після приготування розчину	C = 6%
Кх, Кт 2.2.1 Приготування і стерилізація 6-% розчину NaOH	Концентрація розчину NaOH, температура, час, стерильність	Хімічний метод, Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Концентрація визначається після приготування розчину, тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	C = 6%, P=0,05 МПа, t=131 °C, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кх, Кт 2.2.2 Приготування і стерилізація 6-% розчину NaOH	Концентрація розчину NaOH, температура, час, стерильність	Хімічний метод, Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Концентрація визначається після приготування розчину, тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	C = 6%, P=0,05 МПа, t=131 °C, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кх, Кт 2.2.3 Приготування і стерилізація 6-% розчину NaOH	Концентрація розчину NaOH, температура, час, стерильність	Хімічний метод, Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Концентрація визначається після приготування розчину, тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	C = 6%, P=0,05 МПа, t=131 °C, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
ДР 3. Приготування та стерилізація поживного середовища				
ДР 3.1. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках				
Кт, Км 3.1.1. Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,05 МПа, t=112 °C, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти

Кт, Км 3.1.2. Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,05 МПа, t=112 °C, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.1.3. Приготування та стерилізація композиції В	Композиція В, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,15 МПа, t=131 °C, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
ДР 3.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 10 л				
Кт, Км 3.2.1. Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,05 МПа, t=112 °C, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.2.2. Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,15 МПа, t=131 °C, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
ДР 3.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 100 л				
Кт, Км 3.3.1. Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,05 МПа, t=112 °C, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.3.2. Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,15 МПа, t=131 °C, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
ДР 3.4. Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу в ферментері об'ємом 1000 л				

Кт, Км 3.4.1. Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,05 МПа, t=112 °С, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.4.2. Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,15 МПа, t=131 °С, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
ТП 4. Підготовка посівного матеріалу				
Кт, Км 4.4 Вирощування інокуляту в колбах на качалках	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури, концентрація біомаси	Термометр технічний, годинник, тахометр, спектрофотометричний метод, мікробіологічний контроль	Після вирощування культури в колбах на качалках	t = 24°С, τ = 13 год, n = 200 об/хв, X=0,7 г/л, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км, Кх 4.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 10 л	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, рН, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури, концентрація біомаси	Термометр технічний, годинник, датчик рН, спектрофотометричний метод, мікробіологічний контроль	Під час вирощування посівного матеріалу в інокуляторі і в кінці процесу	τ = 13 год, t = 24 °С, рН =7,0, X=0,7 г/л, n =20-250 об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти

Кт, Км, Кх 4.6. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 100 л	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, рН, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури, концентрація біомаси	Термометр технічний, годинник, датчик рН, спектрофотометричний метод, мікробіологічний контроль	Під час вирощування посівного матеріалу в інокуляторі і в кінці процесу	$\tau = 13$ год, $t = 24$ °С, $pH = 7,0$, $X = 0,7$ г/л, $n = 20-450$ об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти
ТП 5. Виробничий біосинтез				
Кт, Км, Кх 5.1 Виробниче культивування	Культуральна рідина, швидкість перемішування, температура, рН, тривалість культивування, мікробіологічна чистота культури, концентрація біомаси, концентрація ферменту	Термометр технічний, годинник, датчик рН, спектрофотометричний метод, ВВЕРХ, мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль та визначення рівня біомаси проводять кожні 9 годин, концентрація ферменту визначається після закінчення процесу культивування	$t = 24$ °С, $\tau = 26$ год, $pH = 7,0$, $n = 20-600$ об/хв, $X = 1,4$ г/л, Концентрація ферменту 0,5 г/л, відсутність сторонньої мікробіоти

З моменту засіву стерильного поживного середовища ведуть контроль за ростом дріжджів. Протягом 26 годин культивування продуценту *Acinetobacter* sp. C26, періодично в асептичних умовах відбирають проби культуральної рідини для мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси.

Всі показники росту культури та накопичення ферменту заносять у лабораторний журнал.

Відбір проби

Кожні 9 години здійснюється відбір проб культуральної рідини. Через пробовідбірник відбирається три проби по 100 мл культуральної рідини.

Пробу перевіряють на наявність сторонньої мікрофлори, та концентрації хондроїтинази.

Мікробіологічний контроль

Для визначення чистоти культури використовують одночасно два способи: мікроскопіювання та висів на поживні середовища.

Через тривалість отримання результатів методом висіву на щільні поживні середовища чистоту культури здебільшого контролюють мікроскопіюванням. Для цього готують препарат фіксованих забарвлених клітин і розглядають його з імерсією: за допомогою стерильної бактеріологічної петлі чи піпетки наносять на знежирене предметне скло краплю суспензії мікроорганізму. Матеріал рівномірно тонким шаром розподіляють на площі 1–2 см². Підсушують та фіксують. Після фіксації на мазок наносять 2–3 краплі метиленового синього для забарвлення клітин на 2–3 хв. Потім препарат дофарбовують фуксином, висушують на повітрі, і промокають фільтрувальним папером та мікроскопіюють з імерсією (рис. 4.2).

Розміри бактерій в логарифмічній фазі росту становлять 1,0-1,5 × 1,5-2,5 мкм, капсульні нерухомі палички. При зростанні на щільних середовищах утворюють гладкі опуклі колонії діаметром до 2-3 мм. *Acinetobacter* дає характерний ріст на хромогенному агарі (CHROMagar, UriSelect). В мазках розташовуються парами, короткими ланцюжками або безладними скупченнями. Джгутиків не мають (рис. 4.1).



Рис. 4.1. Колонії бактерій *Acinetobacter* sp. на селективному хромогенному агарі CHROMagar

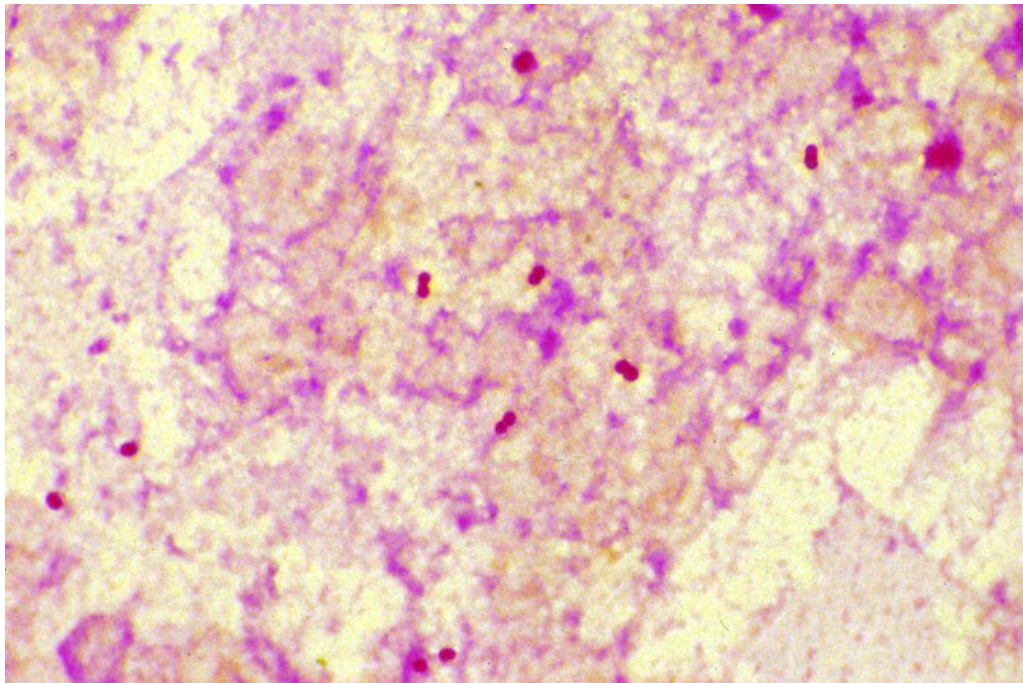


Рис. 4.2. Клітини *Acinetobacter* sp. (червоного кольору) у мікроскопі (x90)

Чистоту культур мікроорганізмів обов'язково перевіряють висівом на поживні середовища. При перевірці чистоти маточної культури та культуральної рідини під час основної ферментації, у пробах повинні виявлятися лише колонії біологічного агента – *Acinetobacter* sp. C26, в іншому випадку продукція вважається зіпсованою.

Результати мікроскопіювання:

- стерильного поживного середовища – відсутність мікробіоти;
- посівного матеріалу – відсутність сторонньої мікробіоти;

- культуральної рідини – відсутність сторонньої мікробіоти.

Для виявлення сторонньої мікрофлори культуральну рідину розсівають на чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром (МПА) для виявлення бактерій (культивують за температури 37 °С, протягом 24 годин) і з сусло-агаром (СА) для виявлення дріжджів та грибів (культивують за 30 °С, протягом 48-72 годин). Після закінчення терміну інкубації проводять перегляд чашок на наявність контамінуючої мікрофлори.

Показники росту і синтезу цільового продукту

Визначення концентрації біомаси

Біомасу визначають за оптичною густиною клітинної суспензії (непрямий метод) з наступним перерахунком на суху біомасу за допомогою калібрувального графіка. Визначення проходить наступним чином: відбирають пробу культуральної рідини (1 мл) для аналізу, додають 9 мл дистильованої води. Після чого проводять вимірювання оптичної густини за допомогою фотоелектроколориметра при 540 нм. Для визначення вмісту клітин користуються калібрувальною кривою [100].

Визначення кількості синтезованої хондроїтинази

Кількісне визначення проводять за допомогою високоефективної рідинної хроматографії на хроматографі WatersAlliance (Waters, Milford, MA, USA). Колонка для хроматографа заповнена силікагелем Sephadex G-100 (1,0 см × 100 см), врівноважена буфером Tris-HCl (20 мМ, рН 7,5). Елюювання хондроїтинази проводять буфером Tris-HCl (20 мМ, рН 7,5) при швидкості потоку 0,2 мл/хв⁻¹. Фракції аналізують УФ-детектором при довжині хвилі 232 нм [48].

Пробопідготовка:

Відбирають 100 мл культуральної рідини та центрифугують при 10000 об/хв протягом 10 хв. Фермент осаджують амоній сульфатом з супернатанту 16 год при 4 °С з подальшим центрифугуванням при 10000 об/хв протягом 15 хв 4 °С. Потім осад розчиняють в 20 мМ рН 7,5 буфера трис-НСl рівного об'єму до супернатанту з подальшим визначенням за допомогою ВВЕРХ [48].

Визначення активності отриманої хондроїтинази

Ферментативну реакцію проводять при 37 ° С з використанням хондроїтин сульфату А (2 мг / мл) як субстрату в буфері (20 мМ Трис-НСІ, рН 7,5), і 20 мкл зразка ферменту додають до реакційної суміші. Інкують при 37 ° С протягом 20 хв. Реакцію зупиняють нагріванням протягом 5 хв на киплячій водяній бані. Потім вимірюють за поглинанням (УФ-232 нм) отриманого розчину порівняно з відповідною порожньою сумішшю, що містить 20 мкл інактивованого розчину ферменту. Одна одиниця (Од) активності хондроїтинази визначають як кількість білка, необхідного для елімінативного розщеплення субстрату, що відповідають 1 мкмоль ненасиченої уронової кислоти в хв [48].

РОЗДІЛ 5. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ ВИРОБНИЦТВА ЛЗ

5.1 Специфікація обладнання ділянки виробництва ЛЗ

Специфікацію обладнання, зображеного на апаратурній схемі, наведено в *табл. 5.1.*

Таблиця 5.1

Специфікація обладнання ділянки виробництва ЛЗ

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
P-1	Реактор-змішувач для приготування буферного розчину	1	Реактор-змішувач об'ємом 30 л перемішувальним пристроєм (0-450 об/хв). Матеріал – Нержавіюча сталь sus316L Розміри (ДхВ): 0,3х0,76 Виробник: «Екафарм».(Україна)
Д-2 Д-5 Д-31 Д-44	Об'ємно-ваговий дозатор	4	Дозатор ваговий автоматичний GD1. Діапазон: 1–500 г (мл). Матеріал – Нержавіюча сталь. Виробник: Tschritter GmbH (Німеччина)
H-3	Насос відцентровий	1	Насос відцентровий. Продуктивність до 200 л/год. Виробник: «Vaterpass» (Україна)
P-4	Реактор-змішувач для приготування розчину хлориду натрію	1	Реактор-змішувач об'ємом 5 л перемішувальним пристроєм (0-100 об/хв). Матеріал – Нержавіюча сталь sus316L Розміри (ДхВ): 0,29х0,4 Виробник «Buchiglasuster». (Швейцарія)
H-6	Насос відцентровий	1	Насос відцентровий. Продуктивність до 200 л/год. Виробник: «Vaterpass» (Україна)
P-7	Збірник для культуральної рідини	1	Реактор-змішувач об'ємом 700 л перемішувальним пристроєм (10-450 об/хв) з рубашкою. Матеріал – Нержавіюча сталь sus316L Розміри (ДхВ): 0,9х2,3 Виробник: «Екафарм».(Україна)

					НУХТ БТЕК 02.02.06 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Іванов М.С.				РОЗДІЛ 5. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ ВИРОБНИЦТВА ЛЗ	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.	Пирог Т.П.						144	26
Консультант						Кафедра БТМ ¹⁴⁴		
Н. Контр.								
Затверд.	Пирог Т.П.							

Н-8 Н-10 Н-12	Насос відцентровий	3	Насос відцентровий. Продуктивність до 1000 л/год. Виробник: «Vaterpass» (Україна)
Ц-9	Центрифуга	1	Осаджувальна центрифуга Rousselet Robatel DRC60. Робочий об'єм: 60 л. Мішалка: 0-2600 об/хв. Виробник: Rousselet Robatel (Франція)
Р-11	Збірник для супернатанту	1	Реактор-змішувач об'ємом 700 л перемішувальним пристроєм (10-450 об/хв) з рубашкою. Матеріал – Нержавіюча сталь sus316L Розміри (ДхВ): 0,9х2,3 Виробник: «Екафарм».(Україна)
УФ-16 З-13 Н-14 Ф-15 УМ-16	Ультрафільтраційна установка	1	Ультрафільтраційна установка The MMS SW25 з горизонтальними фільтрувальними елементами, складається зі збірника (З-13) об'ємом 25 л, насоса (Н-14), попереднього фільтра (Ф-15) та ультра фільтраційного модуля (УМ-16), продуктивність установки – 450 л/год Виробник: «MMS AG Membrane Systems». (Швейцарія)
Р-17	Реактор-змішувач для осадження ферменту	1	Реактор-змішувач об'ємом 100 л перемішувальним пристроєм (10-450 об/хв) з рубашкою. Матеріал – Нержавіюча сталь sus316L Розміри (ДхВ): 0,55х1,75 Виробник: «Екафарм».(Україна)
Д-18	Об'ємно-ваговий дозатор	1	Дозатор ваговий напівавтоматичний.VDD Діапазон: 0,1–50 кг (л). Матеріал – Нержавіюча сталь. Виробник: Rovema (Німеччина)
Н-19	Насос відцентровий	1	Насос відцентровий. Продуктивність до 200 л/год. Виробник: «Vaterpass» (Україна)
Ц-20	Центрифуга фільтрувальна		Фільтруюча центрифуга Heinkel HF 600.1 Робочий об'єм: 52 л. Мішалка: 0-1940 об/хв. Виробник: Heinkel (Німеччина)
Р-21	Реактор-змішувач для приготування розчину для хроматографії	1	Реактор-змішувач об'ємом 40 л перемішувальним пристроєм (0-450 об/хв) з рубашкою. Матеріал – Нержавіюча сталь sus316L Розміри (ДхВ): 0,35х0,8 Виробник: «Екафарм».(Україна)

Н-22 Н-25	Насос відцентровий	2	Насос відцентровий. Продуктивність до 200 л/год. Виробник: «Waterpass» (Україна)
ХС-23	Хроматографічна система	1	Хроматографічна система Prochrom Varicol 6-110. Колонка ECO KNAUER ДхВ (110x450 мм). Наповнювач колонки - CM Sepharose Fast Flow Cytiva Продуктивність – 200 г/д Виробник: «BioTechno Group» (Росія)
Р-24	Збірник для фракції ферменту	1	Збірник об'ємом 30 л. Матеріал – Нержавіюча сталь sus316L Розміри (ДхВ): 0,3x0,76 Виробник: «Екафарм».(Україна)
УФ-29 З-26 Н-27 Ф-28 УМ-29	Ультрафільтраційна установка	1	Ультрафільтраційна установка The MMS SW18 з горизонтальними фільтрувальними елементами, складається зі збірника (З-26) об'ємом 10 л, насоса (Н-27), попереднього фільтра (Ф-28) та ультрафільтраційного модуля (УМ-29), продуктивність установки – 450 л/год Виробник: «MMS AG Membrane Systems». (Швейцарія)
Р-30	Реактор-змішувач для кристалізації ферменту	1	Реактор-змішувач об'ємом 5 л перемішувальним пристроєм (0-100 об/хв). Матеріал – Нержавіюча сталь sus316L Розміри (ДхВ): 0,29x0,4 Виробник «Buchiglasuster». (Швейцарія)
Н-32	Насос відцентровий	1	Насос PUMP DP-DIY. Продуктивність 100 мл/хв. Виробник: «Intllab» (Китай)
Ц-33	Центрифуга фільтрувальна	1	Фільтрувальна центрифуга Rousselet Robatel RC 30 Vx. Робочий об'єм: 2,75 л. Мішалка: 0-3000 об/хв. Виробник: Rousselet Robatel (Франція)
Р-34	Реактор-змішувач для приготування робочого розчину Біомою	1	Реактор-змішувач об'ємом 1000 л, оснащений перемішувальним пристроєм (100 об/хв). Виробник: «ГК ЕВРОХИММАШ К.О»
Н-35	Насос відцентровий	1	Відцентровий насос із нержавіючої сталі GTP 70 / 055D Продуктивність: до 1,2 м³/год, матеріал: нержавіюча сталь AISI 304, AISI 316. Виробник: Fujian Glong Electric Group (Китай)
ПЗ-36	Пристрій для забору повітря	1	Радіальний вентилятор ВЕЗА Вранов-3,55-1П Виробник: «Веца»

Ф-37	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтр G4. Фільтруючий матеріал – скловолокно. E = 90 % Виробник: «LUXfilter» (Росія)
В-38	Вентилятор	1	Вентилятор серії MB Продуктивність: 500-3000 м3/год Виробник: «Атон Сервіс» (Україна)
Т-39	Теплообмінник	1	Теплообмінник для нагрівання/охолодження повітря Systemair PGK. Робочий тиск 1,6 МПа Виробник: «Systemair» (Швеція)
Ф-40	Фільтр попередньої очистки	1	Фільтр тонкої очистки NTR9 класу F9. Фільтруючий матеріал скловолокно. Максимальна робоча температура: 65 °С. Ступінь очищення становить 90- 95 % Виробник: «General filter» (Італія)
Ф-41	Фільтр тонкої очистки	1	Фільтр очистки повітря HIGH FLOW TETPOR HT (H14) Фільтруючий матеріал - фторопласт, Максимальна робоча температура: 150 °С., ступінь очищення повітря фільтром становить 99,995 %.
Ф-42	Фільтр ультратонкої очистки	1	Фільтр абсолютної очистки повітря U17. Ступінь очищення повітря фільтром становить 99,9999995 %.
Р-43	Реактор для приготування розчину препарату	1	Реактор об'ємом 2 л. Матеріал – Боросилікатне скло. Розміри (ДхВ): 0,2х0,3 Виробник «Buchiglasuster». (Швейцарія)
Н-45	Насос відцентровий	1	Насос PUMP DP-DIY. Продуктивність 100 мл/хв. Виробник: «Intllab» (Китай)
Ф-46	Система стерилізуючої фільтрації	1	Стерилізаційні фільтри Propor PES. Матеріал – поліефірсульфурон. Максимальна робоча температура – 90 °С. Діапазон 0,1 – 0,22 мкм. Виробник «NewFilter». (Україна)
АДН-47	Апарат для наповнення флаконів	1	Апарат для наповнення флакоів Masofar LF 200. Апарат може зповнювати ампули об'ємом від 2 до 500 мл., за годину даний апарат може заповнити 12 тисяч ампул. Виробник: США
СС-48	Сублимаційна сушарка	1	Вертикальна сублимаційна сушарка LG-08. Температурний діапазон роботи від -50 до + 65 °С. Робочий об'єм – 2 л. Виробник: «Minipress» (Китай)
ЗА-49	Закупорювальний апарат	1	Апарат для закупорювання флаконів фірми CVC Technologies, модель CVC 1206- H2. Продуктивність 180 флаконів в хвилину. Виробник: (Китай)

Закінчення табл. 5.1

Ф-50	Фільтр піщаний	1	Фільтр MIF-1865, компанії «Pentair» призначений для видалення з води механічних забруднювачів. Фільтр представляє з себе балон із стекловолокна та поліетилена. Максимальна робоча температура: 40°C Виробник: США
Ф-51	Фільтр вугільний	1	Фільтр CF-1865, компанії «Pentair» призначений для видалення залишкового хлору, органічних сполук, запахів, привкусів, а також для покращення органо-лептичних показників. Фільтр представляє собою балон із стекловолокна та поліетилена, а в середині знаходиться вугілля. Максимальний робочий тиск – 8 бар. Виробник: США
Ф-52	Фільтр – пом'якшення	1	Фільтр DSF1054-CV-Twin виробництва "Clack Corporation". Полімерна катіонообмінна смола Dowex HCR-S. Продуктивність: 800-1300 л/год. Робоча температура: 30°C. Робочий тиск: 2-5 атм Виробник: США
УЗО-53	Установка-зворотнього осмосу	1	Установка Ecosoft MO-12. Продуктивність 1 м ³ /год, робочий тиск 7-10 бар, габаритні розміри – 2,1 × 4,2×1,4 м, вага - 1000 кг Виробник: Україна
Д-54	Дистилятор	1	Дистиляційна установка компанії Zhejiang, модель ROYAL-HEXIN, продуктивність 1200 л/год. Потужність 4,0 кВт Виробник: Китай

5.2 ОПИС ОСНОВНИХ СТАДІЙ ПРОЦЕСУ ВИРОБНИЦТВА ЛЗ

Технологічна схема отримання ферментного препарату включає допоміжні роботи (санітарна підготовка виробництва, підготовка води очищеної та ін'єкційної, підготовка флаконів, підготовка пробок, підготовка алюмінієвих ковпачків, приготування допоміжних розчинів), технологічний процес (виділення хондроїтинази, приготування розчину, ліофілізація) та стадія пакування маркування та відвантаження.

Технологічну схему біосинтезу наведено у графічній частині курсового проекту, 1 креслення формату А1.

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

ДР 1.1. Підготовка персоналу.

Навчання та інструктаж персоналу

Основні підходи до персоналу:

наявність достатньої кількості працівників, що володіють відповідною кваліфікацією і практичним досвідом;

система постійного і безперервного навчання, яка розповсюджується на всіх працівників заводу (щорічно внутрішнім навчанням захоплюється не менше 35 % всього персоналу, зовнішнім – не менше 35 % спеціалістів).

Перевірка знань персоналу

Здійснюється періодична атестація співробітників всіх рівнів та структурних підрозділів підприємства.

Особиста гігієна персоналу

В цеховій гардеробній підприємства персонал знімає верхній одяг, вуличне взуття та надягає на ноги тапочки. З іншої шафи персонал дістає та одягає спецодяг.

Кожний працівник повинен мати індивідуальний халат, шапочку, маску і тапочки.

Переодягнувшись персонал направляється до рукомийника. Для миття рук слід використовувати рідке мило. Руки миють гарячою водою за спеціальною методикою з милом та обробляють.

Контроль санітарного стану персоналу. Кожний працівник при прийомі на роботу повинен пройти медичний огляд. Після початкового медичного обстеження працівники повинні проходити медогляд у випадках, пов'язаних із виробництвом або станом здоров'я.

ДР 1.2. Приготування миючих та дезінфікуючих розчинів

ДР 1.2.1. Приготування робочого розчину Біомою

Необхідно приготувати робочий розчин Біомою, концентрацією 0,3 %. Через об'ємно-ваговий дозатор у реактор-змішувач (Р-34) об'ємом 1000 л вносять 24 кг препарату і додають 800 л води для ін'єкцій, вмикають перемішувальний пристрій (100 об/хв) до повного розчинення порошку.

ДР 1.2.2. Приготування робочого розчину Хлорантоїну

У переносну емальовану ємність об'ємом 12 л вносять 2,5 г порошку Хлорантоїну, додають 10 л води для ін'єкцій та перемішують до повного розчинення.

ДР 1.2.3. Приготування робочого розчину Ексан-про-дезу

У переносну емальовану ємність об'ємом 12 л вносять 200 мл Ексан-про-дезу, додають 10 л води для ін'єкцій та перемішують до повного розчинення.

ДР 1.3. Підготовка виробничих приміщень.

Контроль мікробної контамінації поверхонь виробничих приміщень проводить мікробіолог цеху: для приміщень класів чистоти В (з локальними зонами класу А) та С - вибірково два рази на тиждень під час виробничого процесу і один раз на два тижні безпосередньо після обробки приміщень; для приміщень класу чистоти D - один раз на тиждень під час виробничого процесу та один раз на місяць після обробки дезінфікуючими засобами.

ДР 1.3.1. Щоденне прибирання.

Щоденне прибирання приміщень відбувається 2 % розчином Ексан-про-дез (від ДР 1.2.3.). Здійснюється 1 раз на зміну, і включає в себе миття підлоги та протирання ззовні апаратури.

ДР 1.3.2. Генеральне прибирання

Для обробки виробничих приміщень при генеральному прибиранні використовують 0,2 % розчин Хлорантоїну (від ДР 1.2.2.). Генеральне прибирання проходить раз на місяць. Розчином обробляють поверхні лабораторних приміщень: стіни, підлогу, стіни, вікна та двері. Їх оброблення проводиться губкою, яка змочена дезінфікуючим розчином.

Для перевірки мікробіологічної чистоти проводять мікробіологічний контроль.

ДР 2. Підготовка вентиляційного повітря для цеху підготовки лікарського препарату

Контроль мікробної обнасіненості повітря виробничих приміщень проводять за допомогою «Прибору для бактеріологічного аналізу повітря» системи Кротова не рідше 2-3 разу в тиждень. Вміст аерозольних часток визначають за допомогою оптичного лічильника часток 1 раз в тиждень.

ДР 2.1. Забір атмосферного повітря

При визначенні місця забору зовнішнього повітря необхідно враховувати існуючі та можливі джерела аерозольних і газоподібних забруднень (димарі, автотранспорт, газоподібні промислові викиди, квітучі рослини та ін). Забір повітря проводиться за допомогою повітрязабірника (ПЗ-36). Забір атмосферного повітря відбувається на висоті близько 5 м.

ДР 2.2. Грубе очищення повітря

На стадії попереднього очищення повітря видаляється основна маса великих частинок пилу діаметром понад 10 мкм. В якості фільтрів попереднього очищення використовують – фільтри грубої очистки G 4 (Ф-37), злегка змащене пружне скловолокно спеціального плетіння. В середині фільтра розташовані дві решітки, між якими поміщають фільтруючий матеріал. Ступінь очищення становить $E = 90\%$.

ДР 2. 3. Стабілізація термодинамічних показників

Повітря за допомогою вентилятора (В-38) подається до кожухотрубного теплообмінника (Т-39), охолоджується за допомогою хладагенту фреону або

підігрівається до 17–18 °С в залежності від пори року, коли проводиться забір повітря.

ДР 2.4. Попередня фільтрація на фільтрах тонкої очистки

Попередня фільтрація відбувається на фільтрі F 9 (Ф-40), який призначений для попередньої очистки повітря від великодисперсних часток розміром більше 5 мкм (великий пил, продукти корозії), а також для захисту більш ефективного фільтру тонкої очистки. Ступінь очищення повітря 98%.

ДР 2.5. Очищення повітря на фільтрах тонкої очистки

Очищення повітря від пилу та мікроорганізмів здійснюється на фільтрах особливо тонкої очистки Н 14 (Ф-41). Після нього повітря направляється до приміщень класів чистоти В.

ДР 2.6. Очищення повітря на фільтрах ультратонкої очистки

Очищення повітря здійснюється на фільтрах особливо ультратонкої тонкої очистки U17 (Ф-42). Ступінь очищення повітря 99,999995%. Після нього повітря направляється до локальної зони класу чистоти А.

ДР 3. Підготовка води очищеної та ін'єкційної

Підготовка води для виробництва лікарських засобів повинна здійснюватися у відповідності до вимог ДФУ до води очищеної. Система водопідготовки призначена для отримання води очищеної з метою подальшого її використання в технологічному процесі.

ДР 3.1. Забір води

Забір води здійснюється з міського трубопроводу за допомогою забірників передається в систему.

ДР 3.2. Груба фільтрація

Груба фільтрація дозволяє видаляти з води частинки розміром більше 10-100 мкм. Як устаткування для грубої фільтрації використовуються фільтри з піщаним набиванням (Ф-50). Вибір сорту піску залежить від результатів аналізу води з урахуванням сезонних змін. Справність фільтра контролюється різницею тиску води до і після фільтру.

ДР 3.3. Фільтрування через вугільний фільтр

Після грубої очистки відфільтровують воду на фільтрі з активованим вугіллям (Ф-51) від найбільш шкідливих домішок, таких як вільний хлор, для подальшого пропускання її через системи зворотного осмосу.

ДР 3.4. Пом'якшення води

Пом'якшення дозволяє понизити жорсткість води за рахунок видалення іонів кальцію і магнію перед подачею води для очистки на мембранах зворотного осмосу. Як устаткування на цій стадії можуть служити автоматичні пом'якшувачі – іоннообмінні модулі (Ф-52), що працюють за принципом заміни іонів кальцію і магнію іонами натрію. Пом'якшувачі періодично регенеруються розчином хлориду натрію. Справність роботи пом'якшувача можна контролювати періодичним виміром жорсткості води на вході і на виході.

ДР 3.5. Одержання води очищеної на установці зворотного осмосу

Вода після попередньої очистки подається на колони зворотного осмосу, в яких відбувається очищення води від розчинених в ній солей із селективністю не менше ніж 99,00 %. Обладнання являє собою системи мембран. Мембрани мають розміри пор 0,0005–0,001 мкм.

Для перебігу процесу необхідно створити надлишковий тиск (тиск, вищий за осмотичний) для примусового фільтрування води крізь мембрану, що робиться за допомогою однопотокового насосу (УЗО-53). Величина осмотичного тиску прямо пропорційна до концентрації розчинених речовин та абсолютної температури (температури за шкалою Кельвіна). Для прісної води, що містить солей 0,5–1,0 г/л, осмотичний тиск дорівнює 0,2–0,3 мПа. Для збільшення ефективності процесу використовується тангенціальна подача води до поверхні мембрани при рециркуляції. Контроль систем зворотного осмосу здійснюється вимірюванням питомої електричної провідності води на виході з системи.

ДР 3.6. Одержання ін'єкційної води

Воду для ін'єкцій одержують з води очищеної шляхом чотирьохступеневої дистиляції (Д-54).

ДР 3.7. Зберігання води

Автоматична система моніторингу стану води очищеної в системі зберігання і розподілу води очищеної дозволяє в режимі реального часу контролювати поточні параметри води очищеної і керувати елементами системи водопідготовки (автоматичними вентилями, насосами циркуляції і т. п.).

ДР 4. Підготовка флаконів

Проводять візуальний перегляд і відбраковують флакони, що мають включення, відхилення від вимог НД за зовнішнім виглядом та геометричними параметрами. Брак збирають у контейнери, маркують етикетками і передають на утилізацію.

ДР 4.1. Миття флаконів

Флакони в трибортовій тарі передають на миття, яке проводиться очищеною водою за допомогою ультразвуку на машині атоматичного миття флаконів типу ПСК-2.

Температура води очищеної від 40 до 50 °С. Контроль температури за допомогою приладів контуру розподілу води очищеної. Тиск очищеної води на лінії – від 0,20 до 0,24 МПа.

ДР 4.2. Ополіскування флаконів

Флакони вручну подаються на накопичувальний стіл, потім за допомогою шнека ланцюгового транспортеру занурюються у ванну з водою. Ванна обладнана ультразвуковими магнітострикційними випромінювачами, що впливають на процес миття ультразвуком. Після чого флакони надходять до вузла ополіскування внутрішньої і зовнішньої поверхонь ін'єкційною водою (температурою від 80 до 95 °С), що надходить через форсунки.

ДР 4.3. Сушіння та стерилізація флаконів

Після ополіскування у флакони подається стиснуте повітря, за допомогою якого з флаконів видаляється залишкова волога і флакони переорієнтовуються «горлом вгору». Чисте стиснуте повітря попередньо проходить через фільтр з номінальною тонкістю фільтрації 0,2 мкм.

Зони тунельного стерилізатора знаходяться в зоні ламінарного потоку стерильного повітря. Повітря за допомогою вентилятора через попередній фільтр

подається на фільтр стерилізації «HEPA» при температурі 330-350 °С, що підтримується за допомогою регулюючого приладу пульта управління. Час перебування флаконів у зоні сушіння-стерилізації – 9 хв, у зоні охолодження-стабілізації – 5-7 хв. У зоні охолодження-стабілізації флакони охолоджуються стерильним повітрям до температури 50-60 °С.

Контроль температури здійснюється по реєструючому приладу, розташованому на пульті управління.

У разі потреби стерильні флакони можуть зберігатися в закритих кришками деках не більше 24 год в умовах, що виключають можливість порушення стерильності флаконів. Деки з флаконами маркують етикетками встановленого зразка із значенням назви матеріалу, номеру партії, кількості, дати та часу стерилізації, прізвища і підпису відповідального.

Тривалість операції підготовки флаконів – від 8,0 до 10,0 год.

ДР 5. Підготовка пробок

При надходженні на підприємство гумові пробки проходять вхідний контроль у ВКЯ і зберігаються на складі сировини та матеріалів в умовах, закладених у АНД.

Після розтарення проводять попередній перегляд і сортування гумових пробок, відбраковуючи гумові пробки з видимими дефектами: відхиленням та зовнішнім виглядом, відтінок кольору, геометричні розміри на фасувальному столі

Пара, що надходить у камеру стерилізації установки, проходить очищення на фільтрі з номінальною тонкістю фільтрації 10,0 мкм і на фільтрі з номінальною тонкістю фільтрації 0,2 мкм. Тиск пари на лінії від 0,15 до 0,20 МПа.

Очищена вода, яка подається в камеру миття, проходить очищення на фільтрі з номінальною тонкістю фільтрації 5,0 мкм. Тиск очищеної води на лінії від 0,20 до 0,25 МПа.

Процес підготовки пробок проходить у п'ять етапів: I етап – миття;

II етап – ополіскування; III етап – силіконування;

IV етап – стерилізація і сушіння.

ДР 5.1. Миття та ополіскування пробок

У камеру миття вручну порціями завантажують гумові. Для миття використовують миючий засіб «Біомой».

Процес I етапу миття ведеться при температурі очищеної води від 44 °С до 46 °С протягом 16 хв в автоматичному режимі. Контроль температури – за допомогою реєструючого приладку. Відцентровий насос перекачує пробки з водою з ємкості миття в ту ж ємкість (для видалення гумового пилу та інших механічних домішок). При температурі не вище 40 °С промивні води направляють у каналізацію. Промивні води зливають протягом 10 хв.

Ополіскування пробок очищеною водою ведуть протягом 32 хв з переливом через зливальний карман. Температура очищеної води від 44 °С до 46 °С, контроль температури – за допомогою приладу реєструючого.

ДР 5.3. Силіконування пробок

Процес силіконування проводять у камері миття. Апарат наповнюють водою для ін'єкцій до верхнього рівня. Для приготування розчину силіконової емульсії використовують мірний посуд 2 класу. Беруть 60-90 мл силіконової емульсії КЭ-10-16 і розчиняють у 700 мл води для ін'єкцій. Температура процесу силіконування від 80 °С до 95 °С. Контроль температури – за допомогою приладу реєструючого.

Загальна тривалість процесу ополіскування, починаючи, з досягнення заданої температури – 24 хв.

ДР 5.4. Стерилізація і сушіння пробок

У посудину подають пару для нагрівання пробок до температури від 120 °С до 124 °С при тиску від 0,11 до 0,13 МПа. Контроль тиску – за допомогою мановакууметра. Тривалість процесу стерилізації складає 48 хв. Після стерилізації починається процес сушіння.

Сушіння здійснюється стерильним стиснутим повітрям і вакуумом. Стерильне стиснене повітря надходить в апарат стерилізації підігрітим за допомогою ТЕНів до 70 °С. Посудина періодично обертається на 180°, у результаті чого стікає вода, що утримується в порожнинах пробок. Здійснюється контроль температури процесу сушіння та контроль тиску – за допомогою мановакууметра. Тривалість процесу сушіння складає 80 хв.

По закінченні сушіння подача повітря в апарат припиняється. Упевнившись у відсутності залишкового тиску в апараті стерилізації, відкривають люк вивантаження і перевантажують пробки в рухомі ємкості для стерильних пробок, що входять у комплект установки. Ємкості попередньо обробляють розчином перекису водню (3,0%) і розчином спирту етилового (76%).

ДР 6. Підготовка алюмінієвих ковпачків

Після розтарення проводять перегляд і сортування ковпачків, відбраковуючи ковпачки з порушеною формою, забруднені, темні чи в плямах, такі, що мають вм'ятини, зрізи та інші дефекти. Брак збирають в контейнери, маркують етикетками і відправляють на утилізацію.

ДР 6.1. Миття і ополіскування ковпачків

Очищена вода для миття ковпачків, нагріта в теплообміннику до 60 °С. Далі очищена вода проходить крізь фільтр з номінальною тонкістю фільтрації 5,0 мкм. Тиск очищеної води на лінії від 0,20 до 0,25 МПа.

Використовують миючий розчин «Біомой». Температура миття від 35 до 60 °С. Миття продовжується 22 хв і задається програмою. Через 22 хв включається клапан доливання очищеної води. Ополіскування проводять водою очищеною з температурою від 35 до 60 °С протягом 45 хв.

ДР 6.2. Стерилізація ковпачків

Проводяться в апараті для повітряної термообробки при температурі від 178 до 182 °С протягом 60 хв. Здійснюється контроль температури – за допомогою приладу реєструючого. Після стерилізації деки з ковпачками вивантажують у приміщення для охолодження класу чистоти В. Термін зберігання стерильних алюмінієвих ковпачків – не більше 24 год.

Тривалість операції підготовки алюмінієвих ковпачків – від 7,5 до 8,0 год.

ДР 7. Приготування допоміжних розчинів

ДР 7.1. Приготування розчину фосфатного буферу

Для того, щоб приготувати 24 л 50 мМ фосфатного буферного розчину, необхідно 213,6 г динатрію гідрофосфату дигідрату, 8,5% (об / об) розчин фосфорної кислоти для корекції рН і 24 л дистильованої води.

У реактор-змішувач (Р-1) об'ємом 30 л подають через об'ємно-ваговий дозатор (Д-2) 213,6 г динатрію гідрофосфату дигідрату, через цей же дозатор додають 22 л дистильованої води, потім коректують рН 8,5% (об / об) розчином фосфорної кислоти до значення 7,5, далі доливають 2 л дистильованої води та вмикають перемішуючий пристрій.

ДР 7.2. Приготування розчину хлориду натрію

Для того, щоб приготувати 4,5 л 25 мМ розчину хлориду натрію, необхідно 6,62 г хлориду натрію і 4,5 л дистильованої води.

У реактор-змішувач (Р-4) об'ємом 5 л додають через об'ємно-ваговий дозатор (Д-5) 4,5 л дистильованої води та 6,62 г хлориду натрію та вмикають перемішуючий пристрій.

ДР 7.3. Приготування 6-% розчину HCl для етапу кристалізації

У колбу об'ємом 200 мл циліндром наливають 83 мл дистильованої води, далі за допомогою мірного циліндру відміряють і додають 17,2 мл 35% розчину HCl та перемішують. Розчин роблять під витяжною шафою, відміряють за допомогою скляного мірного стакана та обов'язково саме до стерильної дистильованої води додають 35%-ну HCl, а не навпаки (для уникнення сильної екзотермічної реакції). Закривають скляною пробкою.

ТП 8. Відділення біомаси

ТП 8.1. Центрифугування культуральної рідини

Культуральна рідина об'ємом 550,62 л з ферментеру подається в збірник культуральної рідини об'ємом 700 л (Р-7). В рубашку збірника подається вода охолоджена для охолодження культуральної рідини до 5-10 °С, для зберігання перед центрифугуванням.

Зі збірника (Р-7) відцентровим насосом (Н-8) культуральна рідина подається у осаджувальну центрифугу (Ц-9), де здійснюється центрифугування при 2600 об/хв, тривалість центрифугування становить 40 хв за температури 5 °С.

Супернатант, що утворився після закінчення процесу центрифугування, за допомогою відцентрового насоса (Н-10) подається у збірник об'ємом 700 л (Р-11)

для подальшого процесу ультрафільтрації. В рубашку збірника подається вода охолоджена для підтримання температури 4-6 °С.

Вивантаження біомаси продуцента здійснюється в ручну. Біомаса подається на знешкодження відходів (ЗВ 16.1).

ТП 9. Концентрування супернатанту

ТП 9.1. Ультрафільтрація

Ультрафільтрація супернатанту (від ТП 8.1) здійснюється на ультрафільтраційній установці (УФ-16) для концентрування супернатанту та очищення розчину хондроїтинази від низькомолекулярних речовин.

Супернатант зі збірника (Р-11) подається у збірник УФ (Р-13) за допомогою відцентрового насоса (Н-12) звідки за допомогою відцентрового насоса (Н-14) через фільтр попередньої очистки (Ф-15) подається на ультрафільтраційний модуль (УФ-16) де протягом 80 хв при температурі 5 °С здійснюється ультрафільтрація на мембранах з діаметром пор 2 нм. Промивання мембран здійснюють водою для ін'єкцій.

Після ультрафільтрації концентрат ферменту об'ємом 47 л подається у реактор (Р-17) для подальшого осадження. В рубашку збірника подається вода охолоджена для підтримання температури 4-6 °С.

Пермеат відводиться по центральній трубі і передається на знешкодження відходів (ЗВ 16.2).

ТП 10. Осадження хондроїтинази

ТП 10.1. Осадження ферменту сульфатом амонію

Концентрат об'ємом 47 л після ультрафільтрації (від ТП 9.1) подають у реактор-змішувач об'ємом 100 л (Р-17), у якому здійснюється осадження хондроїтинази сульфатом амонію. Осадження здійснюють при концентрації сульфату амонію 70% за температури 5 °С. В рубашку збірника подається вода охолоджена для охолодження концентрату до 4-6 °С.

Вмикають перемішувачий пристрій. Через ваговий дозатор (Д-18) подають 32,9 кг сульфату амонію окремими порціями при постійному перемішуванні і залишається на 16 годин.

ТП 10.2. Центрифугування для відділення осаду

Після осадження розчин ферменту (від ТП 10.1) за допомогою відцентрового насосу (Н-19) розчин подається для подальшого осадження у фільтруючу центрифугу (Ц-20), де здійснюється центрифугування при 1940 об/хв протягом 80 хв за температури 5 °С.

Суспензія ферменту надходить через живильну трубу всередину ротора, де за рахунок дії відцентрової сили суспензія відкидається до стінок ротора і проходячи через фільтрувальну тканину поділяється на тверду і рідку фази. Рідка фаза, проходячи через отвори в роторі, видаляється, а осад ферменту залишається на стінках ротора. Осад видаляється автоматично за допомогою ножа, зрізаючого осад, який подається до розвантажувального бункера, а далі переноситься у збірник об'ємом 40 л для подальшої хроматографії (Р-21).

Фільтрат після центрифугування направляється на знешкодження відходів (ЗВ 16.2).

ТП 11. Очищення хондройтінази

ТП 11.1. Іонообмінна хроматографія

Процес іонообмінної хроматографії відбуватиметься на хроматографічній системі (ХС-23) на катіонообмінній смолі КМ-целюлозі.

Хроматографічна установка складається з чотирьох послідовно з'єднаних хроматографічних колонок.

Спочатку колонки промивають 50 мМ фосфатним буферним розчином з рН 7,5. Далі до осаду хондройтінази (від ТП 10.2) у реакторі (Р-21) завантажуються через відцентровий насос (Н-3) розчин буферу з реактора (Р-1), вмикається перемішування та розчиняється у попередньо приготовленому фосфатнобуферному розчині рН 7,5 (від ДР 7.1).

Буферний розчин з ферментом з реактора-змішувача (Р-21) подається за допомогою відцентрового насосу (Н-22) на хроматографічну систему (ХС-23) і циркулюється протягом 30 хв.

Після проходження процесу сорбції на смолі, потім елюють 25 мМ NaCl в тому ж буфері зі швидкістю потоку 50 мл / хв упродовж 90 хв при 5°С, який

подається з реактора (Р-4) за допомогою відцентрового насоса (Н-6) (від ДР 7.2). Після елюції ферменту, чисті фракції хондроїтинази подаються у збірник (Р-24).

ТП 11.2. Ультрафільтрація ферментного розчину

Ультрафільтрація ферментного розчину здійснюється на ультрафільтраційній установці (УФ-29) для концентрування ферментного розчину та очищення розчину хондроїтинази від хлориду натрію, за допомогою якого здійснювалася елюція ферменту з хроматографічної системи (ХС-23).

Ферментний розчин (від ТП 11.1) зі збірника об'ємом 30 л (Р-24) подається у збірник УФ (Р-25) за допомогою відцентрового насоса (Н-25) звідки за допомогою відцентрового насоса (Н-27) через фільтр попередньої очистки (Ф-28) подається на ультрафільтраційний модуль (УФ-29) де протягом 10 хв при температурі 5 °С здійснюється ультрафільтрація на мембранах з діаметром пор 2 нм. Промивання мембран здійснюють водою для ін'єкцій.

Після ультрафільтрації концентрат ферменту об'ємом 2,1 л за допомогою відцентрового насоса подається у реактор об'ємом 5 л (Р-30) для подальшої кристалізації хондроїтинази.

Пермеат відводиться по центральній трубі і передається на знешкодження відходів (ЗВ 16.2).

ТП 12. Кристалізація хондроїтинази

ТП 12.1. Кристалізація

Кристалізацію здійснюють за допомогою додавання поліетиленгліколю (молекулярна маса 4000) до його концентрації у розчину 15 % та залишають стояти у реакторі-змішувачі знизивши температуру до 4-6 °С знижуючи рН порціями 6% розчину HCl (від ДР 7.3) тричі на приблизно 0,5 рН кожні 3 години протягом 12 годин, отримуючи білі або безбарвні голкоподібні або призматичні кристали хондроїтинази.

У реактор-змішувач об'ємом 5 л (Р-30) з концентратом ферменту об'ємом 2,1 л у якому буде здійснюється кристалізація хондроїтинази додають 8,5% (об / об) розчин фосфорної кислоти для корекції рН до 7,5 (вимір рН-метром). Вмикають перемішувачий пристрій. Через ваговий дозатор (Д-31) подають 320 г

поліетиленгліколю при постійному перемішуванні та затравку готового ферменту 0,5-2 г. Подають в рубашку холодну воду знижуючи температуру розчину до 4-6 °С. Через тричі через кожні 3 години ступінчасто знижують рН розчину до 5,5 розчином 6 % хлоридної кислоти (від ДР 7.3). Загальний час кристалізації 12 годин. За рахунок постцпового зниження рН фермент кристалізується більш повно.

ТП 12.2. Центрифугування для відділення осаду

Після кристалізації розчин ферменту за допомогою відцентрового насоса (Н-32) подається у фільтруючу центрифугу (Ц-33), де здійснюється центрифугування при 3000 об/хв протягом 60 хв.

Суспензія ферменту надходить через живильну трубу всередину ротора, де за рахунок дії відцентрової сили суспензія відкидається до стінок ротора і проходячи через фільтрувальну тканину поділяється на тверду і рідку фази. Рідка фаза, проходячи через отвори в роторі, видаляється, а осад ферменту залишається на стінках ротора. При досягненні заданої товщини шару осаду подача суспензії автоматично припиняється, після чого відбуваються промивка осаду.

Осад видаляється автоматично, який далі передають на змішування із захисним середовищем.

Фільтрат після центрифугування направляється на знешкодження відходів (ЗВ 16.2).

ТП 13. Приготування розчину препарату

ТП 13.1. Приготування розчину препарату

Утворений осад переносять у реактор-змішувач об'ємом 2 л (Р-43) та розчиняють в 1 л води для ін'єкцій при 30 °С. За допомогою рН-метра вирівнюють рН до 7 додаванням 50 мМ фосфорного буферу (рН 7) та додають попередньо простерилізовану наважку сахарози як компонент захисного середовища для подальшої ліофілізації при 150 об/хв мішалки протягом 60 хв. При завершенні процесу, проводять мікробіологічний контроль та інші тести.

ТП 13.2. Стерилізація розчину препарату

Готовий розчин проходить стадію холодної стерилізації за допомогою системи фільтрів з діаметром пор 0,45 мкм та 0,22 мкм. Потім розчином препарату

наповнюють попередньо простерилізовані флакони (*від ДР 4.3*) в апараті для наповнення флаконів (АДН-47) які потім йдуть на етап ліофілізації.

ТП 14. Отримання ліофілізату

ТП 14.1. Заморожування препарату

Заморожування препарату у флаконах відбувається в стерильній сублімаційній сушарці (СС-48), створюється температура для заморожування, яка складає $-47 \pm 3^{\circ}\text{C}$, тривалість процесу складає 30-32 години.

ТП 14.2 Сублімаційне сушіння

Перед сушінням відкривають вакуумний вентиль, включають вакуумний насос і створюють в сушильній камері необхідний тиск (9 Па), відстежуючи його за показаннями вакуумметра.

За допомогою теплоносія поступово підіймають температуру в камері де знаходиться заморожений продукт до $40 \pm 3^{\circ}\text{C}$, тривалість сушіння складає 25-30 годин.

Після ліофільного висушування флакони передаються на стадію закупорювання. Ліофільне висушування проводиться в приміщенні класу А. Після закінчення ліофільного висушування відбувається стадія охолодження флаконів в середині машини до температури 4-8 °С.

ПМВ 15. Пакування, маркування, відвантажування

ПМВ 15.1 Закупорювання

Флакони після ліофільного висушування передаються на апарат для закупорювання (ЗА-49). На флакон одягається гумова пробка та алюмінієва кришка (*від ДР 4*), а також наноситься маркування. Після чого флакони переходять на стадію пакування.

ТП 15.2 Пакування

Флакони поступають на пакувальну машину, яка запаковує кожен флакон в окрему первину тару, в первину тару. Окрім флакону кладеться інструкція для застосування (лист-вкладиш). Після чого запакована партія відправляється в карантинну зону, де чекає рішення з її реалізації. Під час пакування в первину тару

контролюється цілісність флаконів, якість нанесення етикетки, правильність і чіткість маркування, а також комплектність упаковки.

Отримавши рішення з реалізації утворена партія відправляється на конвеєр в якому оператори запаковують первину тару у вторину і відправляють на склад для реалізації.

ЗВ 16. Знешкодження відходів

ЗВ 16.1. Знешкодження твердих відходів

Утилізацію твердих відходів найкраще здійснювати або аеробним, або анаеробним біологічним методом, за допомогою яких відбувається не тільки утилізація відходів, а й утворюються цінні продукти (біогаз), покращуються властивості ґрунту.

Перетворення біомаси у вторинний енергоносіє відбувається за допомогою мікроорганізмів. При анаеробному бродінні біомаси під впливом різних груп бактерій відбувається утворення біогазу, який складається в основному з метану (55-70%) і вуглекислого газу (25-35%).

ЗВ 16.2 Знешкодження рідких відходів

Вибір конкретної схеми утилізації рідких відходів визначається групою факторів: витратою стічної води, складом і концентрацією забруднень, вимогами до якості очищеної води.

Пропонована схема очищення рідких відходів містить у собі наступні стадії:

1) усереднення та освітлення стічних вод від механічних домішок (усереднювачі, пісковловлювачі, відстійники) – на даному етапі відбувається інтенсивне перемішування стоків з різним якісним і кількісним складом. Перемішування, як правило, здійснюється за рахунок барботажу повітря. У разі потреби в усереднювач також подаються біогенні елементи в потрібних концентраціях і аміачна вода для створення певного значення рН.

2) біологічне очищення освітлених стічних вод (за допомогою біофільтра) – фільтрація здійснюється через шар крупного зернистого матеріалу, покритого біологічної плівкою аеробних мікроорганізмів. Забруднюючі речовини стічних вод сорбуються біоплівкою і, під впливом організмів, з яких вона складається,

піддаються процесу окислення. Реакція окислення відбувається в присутності повітря. Для очищення невеликої кількості стічних вод застосовують біофільтри з природною подачею повітря. В якості фільтруючого матеріалу для біофільтрів використовують щебінь, гальку, керамзит, пластмасові елементи і т.д.

3) доочищення стічних вод – система більш повного біологічного доочищення може складатися з безлічі елементів, що визначаються подальшим призначенням стічної води.

4) обробка осадів – частки мікробної плівки, що відірвалися, після відокремлення їх у вторинному відстійнику не повертаються назад у біофільтр, а спрямовуються на мулові площадки.

Ця схема очистки має перевагу, що можна використовувати при порівняно невеликих об'ємах відходів виробництва та застосування біофільтрів має переваги в тому, що при їх використанні мікроорганізми здатні до практично повного видалення органічних домішок з рідких відходів.

5.3 КОНТРОЛЬ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЦТВА ЛЗ

Таблиця 5.2

Карта постадійного контролю стадій ділянки виробництва ЛЗ

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
1	2	3	4	5
ДР 1. Санітарна підготовка виробництва				
ДР 1.2. Підготовка миючих та дезінфікуючих засобів				
Кх 1.2.1. Приготування робочого розчину Біомою	Концентрація розчину Біомою	Хімічний метод	Після приготування розчину	C = 0,3%
Кх 1.2.2. Приготування робочого розчину Хлорантоїну	Концентрація розчину Хлорантоїну	Хімічний метод	Після приготування розчину	C = 0,2%
Кх 1.2.3. Приготування робочого розчину Ексан-про-дезу	Концентрація розчину Ексан-про-дезу	Хімічний метод	Після приготування розчину	C = 2%
ДР 1.3. Підготовка виробничих приміщень				
Кт 1.3.1. Щоденне прибирання приміщень	Підлога, ззовні апаратура. Чистота	Візуальний огляд	Після прибирання	Чисте приміщення, відсутність пилу та бруду
Кт 1.3.2. Геренальне прибирання приміщень	Підлога, стіни, двері, вікна, ззовні апаратура. Чистота	Візуальний огляд, мікробіологічний контроль	Після прибирання	Чисте приміщення, відсутність пилу та бруду КУО < 300/см ²
ДР 2. Підготовка вентиляційного повітря				

Кт 2.2. Грубе очищення повітря	Повітря на виході з фільтра, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення	E = 90 %, тиск згідно паспорту
Кт 2.3 Стабілізація термодинамічних показників	Стиснене повітря, температура, тиск	Манометр технічний, термометр	Після охолодження повітря	t = 17-18 °C
Кт 2.4. Очищення повітря на фільтрах тонкої очистки	Очищене повітря, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі головного очищення	E = 98 %, тиск згідно паспорту
Кт 2.5. Очищення повітря на фільтрах тонкої очистки	Очищене повітря, ступінь очищення	Перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря в індивідуальному фільтрі	E = 99,995 %
Кт 2.6. Очищення повітря на фільтрах ультратонкої очистки	Очищене повітря, ступінь очищення	Перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря в індивідуальному фільтрі	E = 99,9999995 %
ДР 3. Підготовка води очищеної та ін'єкційної				
Кт 3.2. Груба фільтрація	Температура, тиск	Манометр технічний, термометр	Після очистки	d менше 10-100 мкм
Кт 3.3. Фільтрування через вугільний фільтр	Температура, тиск	Манометр технічний, термометр	Після очистки	Відсутність хлору
Кх, Кт 3.4. Пом'якшення води	Температура, тиск, хімічний склад	Манометр технічний, термометр, хімічний метод	Після очистки	Вода заданого складу
Кт 3.5. Одержання води очищеної	Температура, тиск, діаметр мембран	Манометр технічний, термометр, мембрани	Після очистки	d = 0,0005–0,001 мкм, W = 0,5–1,0 г/л P = 0,2–0,3 МПа

Продовження табл. 5.2

Кт 3.6. Одержання води ін'єкційної	Температура, тиск, час	Манометр технічний, термометр, годинник	Після очистки	Вода ін'єкційна згідно GMP
Кт 3.7. Зберігання води	Температура, час	Годинник технічний, термометр	В процесі	T = 70 °C, t = 24 год
ДР 4. Підготовка флаконів				
Кт 4.1. Миття флаконів	Температура, тиск, час	Манометр технічний, термометр, годинник	В процесі	T = 40-50 °C, t = 45 хв, P = 0,20 - 0,24 МПа.
Кт 4.2. Ополіскування флаконів	Температура, час	Годинник технічний, термометр	В процесі	T = 80-90 °C, t = 30 хв
Кт 4.3. Сушіння та стерилізація флаконів	Температура, час, стерильність	Годинник технічний, термометр, мікробіологічний контроль	В процесі	T = 330-350 °C, t = 15 хв, відсутність мікробіоти
ДР 5. Підготовка пробок				
Кт 5.1. Миття та ополіскування пробок	Температура, час	Годинник технічний, термометр	В процесі	T = 44-46 °C, t = 45 хв
Кт 5.2. Силіконування пробок	Температура, час	Годинник технічний, термометр	В процесі	T = 80-95 °C, t = 24 хв
Кт 5.3. Стерилізація і сушіння пробок	Температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,11-0,13 МПа, t=124 °C, τ = 48 хв, відсутність мікробіоти
ДР 6. Підготовка алюмінієвих ковпачків				
Кт 6.1. Миття і ополіскування ковпачків	Температура, тиск, час	Манометр технічний, термометр, годинник	В процесі	T = 35-60 °C, t = 60 хв, P = 0,20 - 0,25 МПа.

Кт 6.2. Стерилізація ковпачків	Температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P=0,11-0,13$ МПа, $t=178-182$ °С, $\tau = 60$ хв, відсутність мікробіоти
ДР 7. Приготування допоміжних розчинів				
Кх 7.1 Приготування фосфатного буферного розчину	Концентрація буферного розчину	Хімічний метод	Концентрація визначається після приготування розчину	$pH = 7,5$ $C = 0,05$ М
Кх 7.3. Приготування 6-% розчину HCl	Концентрація розчину HCl	Хімічний метод	Концентрація визначається після приготування розчину	$C = 6\%$
ТП. Стадії виробництва ЛЗ				
Кт 8.1 Центрифугування культуральної рідини	Культуральна рідина, частота обертання, час, температура	Годинник, датчик обертів, Термометр технічний	Під час процесу центрифугування	$t = 5$ °С $n=2600$ об/хв $\tau = 40$ хв
Кт 9.1 Ультрафільтрація	Супернатант, температура, час, діаметр пор мембрани	Термометр технічний, годинник, перевірка діаметру пор згідно паспорту мембрани	Під час процесу ультрафільтрації	$t = 5$ °С $\tau = 80$ хв, $d \text{ пор} = 2$ нм
Кт 10.1 Осадження ферменту сульфатом амонію	Концентрат, концентрація сульфату амонію, температура, час	Термометр технічний, дозатор, годинник	Температура визначається під час осадження, концентрація сульфату амонію перед початком процесу	$t = 5$ °С, $C = 70\%$ $\tau = 16$ год
Кт 10.2 Центрифугування для відділення осаду	Осад ферменту, частота обертання, час, температура	Годинник, датчик обертів, термометр технічний	Під час процесу центрифугування	$t = 5$ °С, $n=1940$ об/хв $\tau = 80$ хв

Продовження табл. 5.2

Кт, Кх 11.1 Іонообмінна хроматографія	Елюат, рН, час, швидкість потoku	Датчик рН, годинник, система хроматографа	Під час процесу іонообмінної хроматографії	рН=7,5 τ = 2 год, V = 50 мл/хв
Кт 11.2 Ультрафільтрація ферментного розчину	Елюат, температура, час, діаметр пор мембрани	Термометр технічний, годинник, перевірка діаметру пор згідно паспорту мембрани	Під час процесу ультрафільтрації	t = 5 °C τ = 10 хв, d пор = 2 нм
Кт, Кх 12.1 Кристалізація	Концентрат, концентрація поліетиленгліколю, температура, час, рН	Термометр технічний, дозатор, годинник, рН датчик	Температура, рН визначається під час кристалізації, концентрація поліетиленгліколю перед початком процесу	C = 15%, t = 18 °C τ = 7 днів рН = 7
Кт 12.2 Центрифугування для відділення осаду	Кристалічний осад ферменту, частота обертання, час, температура	Годинник, датчик обертів, температура	Під час процесу центрифугування	t = 5 °C, n = 3000 об/хв τ = 30 хв
Кт 13.1 Приготування розчину препарату	Частота обертання, час, температура, рН	Термометр технічний, дозатор, годинник, рН датчик, датчик обертів	Під час процесу	t = 30 °C, n = 150 об/хв τ = 60 хв, рН = 7
Кт 13.2 Стерилізація розчину препарату	Час, діаметр пор мембрани	Годинник, перевірка діаметру пор згідно паспорту мембрани	Під час процесу	τ = 60 хв, d пор = 0,22-0,45 мкм
Кт 14.1 Заморожування препарату	Температура заморожування, час	Термометр технічний, годинник	Під час заморожування	t = -47 ± 3 °C, τ = 30-32 год

Закінчення табл. 5.2

Кт 14.2 Сублімаційне сушіння	Температура, тривалість, тиск	Технічний термометр, годинник, манометр	Під час висушування	$P=9$ Па, $t=40\pm 3$ °С, $\tau = 25-30$ год
Кт 15.2 Пакування	Кількість препарату	Ваги	Під час пакування	Цілісність флаконів, якість нанесення етикетки, правильність і чіткість маркування, а також комплектність упаковки

ВИСНОВКИ

1. В результаті аналізу літературних джерел, виявили, що фермент хондроїтиназа, що синтезують представники роду *Acinetobacter* мають перспективи у використанні при лікуванні травм спинного мозку.

2. В ході вибору біологічного агента за допомогою даних з наукових статей, було встановлено, що найкращим продуцентом є *Acinetobacter sp. C26*, за рахунок найбільшої активності синтезуємого ферменту 346 Од/мг та температури за якої фермент є найактивнішим – 37 °С.

3. Для отримання хондроїтинази було розглянуто методи культивування бактерій, в результаті чого було обрано глибинний спосіб культивування *Acinetobacter sp. C26* при температурі 24 °С, рН 7, 26 год. Середовище для культивування для виробничого ферментера (1000 л) складається з 2 композицій. За один цикл виробництва за даних умов можна отримати 550,62 л культуральної рідини.

4. Так як робота присвячена отриманню ліофілізованого ферменту хондроїтинази, а це ЛЗ для парентерального способу введення, тому є необхідність проводити виробництво ЛЗ в класифікованих приміщеннях, а саме приготування проводити в класі чистоти В, а розлив у флакони в зоні класу чистоти А, так як препарат вводиться внутрішньом'язево, то необхідно створити всі необхідні умови (підготовка виробництва та персоналу) для отримання продукту найвищої якості.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

- 1 Srivastava S., Srivastava A.K. Biological phosphate removal by model based continuous cultivation of *Acinetobacter calcoaceticus*. *Process. Biochem.* 2006, 41 (3): 624-630.
- 2 Kim J.M., Jeon C.O. Isolation and Characterization of a New Benzene, Toluene, and Ethylbenzene Degrading Bacterium, *Acinetobacter sp.* B113. *Current. Microbiol.* 2008, 58 (1): 70-75.
- 3 Kang S.-M., Joo G.-J., Hamayun M., Na C.-I., Shin D.-H., Kim H.Y., Hong J.-K., Lee I.-J. Gibberellin production and phosphate solubilization by newly isolated strain of *Acinetobacter calcoaceticus* and its effect on plant growth. *Biotechnol. Lett.* 2009, 31: 277-281.
- 4 Bach H., Berdichevsky Y., Gutnick D. An exocellular protein from oil-degrading microbe *Acinetobacter venetianus* RAG-1 enhances the emulsifying activity of the polymeric bioemulsifier emulsan. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003, 69 (5): 2608-2615.
- 5 Ghodake G.S., Kalme S.D., Jadhav J.P., Govindwar S.P. Purification and partial characterization of lignin peroxidase from *Acinetobacter calcoaceticus* NCIM 2890 and its application in decolorization of textile dyes. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2009, 152 (1): 6–14.
- 6 Bayer E.A., Rosenberg E., Gutnick D.L. The isolation of cell surface mutants of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1. *J. Gen. Microbiol.* 1981, 127 (2):295-300.
- 7 Mujumdar S., Joshi P., Karve N. Production, characterization, and applications of bioemulsifiers (BE) and biosurfactants (BS) produced by *Acinetobacter spp.*: A review. *J. Basic Microbiol.* 2019, 1-11.
- 8 Muthukamalam S., Sivagangavathi S., Dhrishya D., Sudha S. Characterization of dioxygenases and biosurfactants produced by crude oil degrading soil bacteria. *Braz. J. Microbiol.* 2017, 48 (4): 637-647.
- 9 Bao M., Pi Y., Wang L., Sun P., Li Y., Cao L. Lipopeptide biosurfactant production bacteria *Acinetobacter sp.* D3-2 and its biodegradation of crude oil. *Environ. Sci.:Processes Impacts.* 2014, 16 (4): 897–903.
- 10 Zou C., Wang M., Xing Y., Lan G. Characterization and optimization of biosurfactants produced by *Acinetobacter baylyi* ZJ2 isolated from crude oil-contaminated soil sample toward microbial enhanced oil recovery applications. *Biochem. Eng. J.* 2014, 90: 49–58.
- 11 Khan A., Tanveer S., Alia S., Anees M. Role of nutrients in bacterial biosurfactant production and effect of biosurfactant production on petroleum hydrocarbon biodegradation. *Ecol. Eng.* 2017, 104: 158–164.
- 12 Ohadi M., Dehghannoudeh G., Forootanfar H., Shakibaie M. Investigation of the structural, physicochemical properties, and aggregation behaviour of lipopeptide

biosurfactant produced by *Acinetobacter junii* B6. *Int. J. Biol. Macromol.* 2018, 112: 712-719.

13 Chen J., Huang P.T., Zhang K.Y., Ding F.R. Isolation of biosurfactant producers, optimization and properties of biosurfactant produced by *Acinetobacter sp.* from petroleum-contaminated soil. *J. Appl. Microbiol.* 2012, 112: 660–671.

14 Dong H., Xia W., Dong H., She Y. Rhamnolipids produced by Indigenous *Acinetobacter junii* from petroleum reservoir and its potential in enhanced oil recovery. *Front. Microbiol.* 2016, 7: 1710.

15 Devaraj S., Abitha B., Ram G., Allen J.H. Isolation, characterization of glycolipid type biosurfactant from endophytic *Acinetobacter sp.* ACMS25 and evaluation of its biocontrol efficiency against *Xanthomonas oryzae*. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 2017, 11: 252-258.

16 Punniyakotti P., Punniyakotti E., Kuppusamy S., Devaraj S. Biosurfactant and enzyme mediated crude oil degradation by *Pseudomonas stutzeri* NA3 and *Acinetobacter baumannii* MN3. *Biotech.* 2017, 7: 278.

17 Zhao Z., Wong J.W.C. *Acinetobacter calcoaceticus* BU03 enhance the solubility and biodegradation of phenanthrene. *Environ. Technol.* 2009, 30: 3291–3299.

18 Yuan H., Yao J., Masakorala K., Wang F. Isolation and characterization of a newly isolated pyrene-degrading *Acinetobacter* strain USTB-X. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2014, 21: 2724–2732.

19 Karlapudi A.P., Venkateswarulu T.C., Krupanidhi S., Rohini K.K. Evaluation of anti-cancer, anti-microbial and anti-biofilm potential of biosurfactant extracted from an *Acinetobacter indicus* M6 strain. *J. King Saud. Univ. Sci.* 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2018.04.007>.

20 Пирог Т. П., Шевчук Т.А., Конон А.Д., Шулякова М.А., Иутинская Г.А. Синтез поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 і *Rhodococcus erythropolis* ІМВ АС-5017 у середовищі з гліцерином. *Мікробіол. журнал.* 2012, 74 (1): 20-27.

21 Пирог Т.П., Антонюк С.И., Карпенко Е.В., Шевчук Т.А. Влияние условий культивирования штамма *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 на синтез поверхностно-активных веществ. *Прикл. биохимия и микробиология.* 2009, 45 (3): 304-310.

22 Білець І.В., Конон А.Д., Пирог Т.П. Вплив молярного співвідношення концентрацій моносубстратів у суміші на синтез поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* К-4. *Наукові праці НУХТ.* 2013, 48: 69-74.

23 Pirog T.P., Konon A.D., Shevchuk T.A., Bilets I.V. Intensification of Biosurfactant Synthesis by *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 on a Hexadecane–Glycerol Mixture. *Mikrobiologiya.* 2012, 81 (5): 611-619.

24 Pirog T., Shulyakova M., Sofilkanych A., Shevchuk T., Mashchenko O. Biosurfactant synthesis by *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMV

B-7241 and *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 on byproduct of biodiesel production. *FBP*. 2015, 93: 11–18.

25 Статистика виробництва біопалива. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.iea.org/tcep/transport/biofuels/>

26 Статистика виробництва харчових олій на 2019 рік. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.statista.com/statistics/263978/global-vegetable-oil-production-since-2000-2001/>

27 Пирог Т.П., Покора Х.А., Софилканич А.П., Шевчук Т.А., Иутинская Г.А. Синтез поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 і *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 на промислових відходах. *Мікробіол. журнал*. 2014, 76 (2): 17-23.

28 Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Мащенко О.Ю. Шляхи підвищення біоконверсії технічного гліцерину у поверхнево-активні речовини *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 і *Nocardia vaccinii* IMB B-7405. *Мікробіол. журнал*. 2015, 77 (1): 2-8.

29 Павлюковец І.Ю., Никитюк Л.В., Берегова Х.А., Пирог Т.П. Биоконверсия подсолнечного масла в поверхностно-активные вещества *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 и *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241. *Пищевая промышленность*. 2014, 16: 23-27.

30 Пирог Т.П., Павлюковец І.Ю., Ивахнюк Н.А., Савенко І.В, Биотрансформация бактериями рода *Acinetobacter* отработанного подсолнечного масла в поверхностно-активные вещества и экзополисахариды. *Национальная академия наук Беларуси - ЦНБ НАН Беларуси*. 2015, 4: 116-122.

31 Пирог Т.П., Никитюк Л.В., Антонюк С.І., Шевчук Т.А., Іутинська Г.О. Інтенсифікація синтезу поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 на відпрацьованій соняшниковій олії. *Мікробіол. журнал*. 2018, 80 (1): 15-26.

32 Пирог Т.П., Конон А.Д., Береговая К.А., Шулякова М.А. Антиадгезивные свойства поверхностно-активных веществ *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017 и *Nocardia vaccinii* IMB B-7405. *Микробиология*. 2014, 83 (6): 631–639.

33 Пирог Т.П., Савенко І.В., Шевчук Т.А. Влияние условий культивирования *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 на антиадгезивные свойства поверхностно-активных веществ. *Мікробіол. журнал*. 2016, 78 (1): 2-12.

34 Пирог Т.П., Савенко І.В., Шевчук Т.А. Вплив Zn²⁺ на синтез поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 з антимікробними та антиадгезивними властивостями. *Мікробіол. журнал*. 2016, 78 (4): 48-58.

35 Пирог Т.П., Луцай Д.А., Шевчук Т.А., Іутинська Г.О., Ельперін І.В. Антимікробна та антиадгезивна активність поверхнево-активних речовин,

синтезованих *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 на технічному гліцерині. *Mikrobiol. Z.* 2018, 80 (2): 14-27.

36 Pirog T.P., Lutsai D.A., Antonuk S.I., Elperin I.V. The properties of surfactants synthesized by *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 on refined and waste sunflower oil. *Biotechnologia Acta.* 2018, 11 (6): 82-91.

37 Пирог Т.П., Савенко І.В., Шевчук Т.А., Крутоус Н., Іутинська Г.А. Антимікробні властивості поверхнево-активних речовин, синтезованих в різних умовах культивування *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241. *Мікробіол. журнал.* 2016, 78 (3): 2-12.

38 Пирог Т.П., Никитюк Л.В., Сидор І., Палійчук О.І., Петренко Н.В. Антимікробна активність поверхнево-активних речовин, синтезованих *A. calcoaceticus* IMB B-7241, *R. erythropolis* IMB Ac-5017 і *N. Vaccinii* IMB B-7405 на промислових відходах. *Наукові праці Національного університету харчових технологій.* 2017, 5 (2): 8-16.

39 Пирог Т.П., Савенко І.В., Луцай Д.А., Шевчук Т.А., Іутинська Г.А. Роль поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 у руйнуванні біоплівки. *Мікробіол. журнал.* 2017, 79 (4): 21-29.

40 Hayder H.N. Production, characterization and antimicrobial activity of a bioemulsifier produced by *Acinetobacter baumannii* AC5 utilizing edible oils. *Iraq. J. Biotechnol.* 2015, 14: 55–70.

41 Zhao Y.H., Chen L.Y., Tian Z.J., Sun Y. Characterization and application of a novel bioemulsifier in crude oil degradation by *Acinetobacter beijerinckii* ZRS. *J. Basic. Microbiol.* 2016, 56: 184–195.

42 Vázquez-Vázquez J.L., Ortega-de N.D., Huerta-Ochoa S., Gimeno M. Novel exopolysaccharide produced by *Acinetobacter bouvetii* UAM25: production, characterization and PAHs bioemulsifying capability. *Revis. Mexic. Ingen. Quimica.* 2017, 16: 721–733.

43 Jagtap S., Yavankar S., Pardesi K., Chopade B. Production of bioemulsifier by *Acinetobacter* sp. from healthy human skin of tribal population. *Ind. J. Expt. Biol.* 2010, 48: 70–76.

44 Adetunji A.I., Olaniran A.O. Production and characterization of bioemulsifiers from *Acinetobacter* strains isolated from lipid-rich wastewater. *3 Biotech.* 2019, 9 (4): 151.

45 Bharathi D., Rajalakshmi G. Microbial lipases: An overview of screening, production and purification. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology.* 2019. doi:10.1016/j.bcab.2019.101368

46 Fang Y., Yang S., Fu X., Xie W., Li L., Liu Z. Expression, purification and characterization of chondroitinase AC II from marine bacterium *Arthrobacter* sp. CS01. *Mar. Drugs.* 2019, 17 (3).

-
- 47 Leema Roseline T., Sachindra N. Characterization of extracellular agarase production by *Acinetobacter junii* PS12B, isolated from marine sediments. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2016, 6: 219–226.
- 48 Zhu C., Zhang J., Zhang J., Jiang Y., Shen Z., Guan H., Jiang X. Purification and characterization of chondroitinase ABC from *Acinetobacter* sp. C26. *Int. J. Biol. Macromol.* 2017, 95: 80-86.
- 49 Ahmed E.H., Raghavendra T., Madamwar D. An alkaline lipase from organic solvent tolerant *Acinetobacter* sp. EH28: Application for ethyl caprylate synthesis. *Bioresource Technology*. 2010, 101 (10): 3628–3634.
- 50 Gururaj P., Ramalingam S., Nandhini D.G., Gautam P. Process optimization for production and purification of a thermostable, organic solvent tolerant lipase from *Acinetobacter* sp. AU07. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2016, 47 (3): 647–657.
- 51 Wang H.K., Shao J., Wei Y.J., Zhang J., Qi W. A Novel Low-Temperature Alkaline Lipase from *Acinetobacter johnsonii* LP28 Suitable for Detergent Formulation. *Food Technology and Biotechnology*. 2011, 49 (1).
- 52 Zheng X., Chu X., Zhang W., Wu N., Fan Y. A novel cold-adapted lipase from *Acinetobacter* sp. XMZ-26: gene cloning and characterisation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2011, 90 (3):971–980.
- 53 Lakshmikanth M., Manohar S., Lalitha J. Purification and characterization of β -agarase from agar-liquefying soil bacterium, *Acinetobacter* sp., AG LSL-1. *Process Biochemistry*. 2009, 44 (9): 999–1003.
- 54 Sang-Mo K., Gil-Jae J., Hamayun M., Chae I.N., Dong-Hyun S., Hak Y.K., Jin-Kyu H., In-Jung L. Gibberellin production and phosphate solubilization by newly isolated strain of *Acinetobacter calcoaceticus* and its effect on plant growth. *Biotechnol. Lett.* 2009, 31: 277-281.
- 55 Gulati A., Vyas P., Rahi P., Kasana R.C. Plant growth-promoting and rhizosphere competent *Acinetobacter rhizosphaerae* strain BIHB 723 from the cold deserts of the Himalayas. *Curr Microbiol.* 2009, 58 (4): 371-377.
- 56 Peix A., Lang E., Verbarq S., Spröer C., Rivas R., Santa-Regina I., Velázquez E. *Acinetobacter* strains IH9 and OCI1, two rhizospheric phosphate solubilizing isolates able to promote plant growth, constitute a new genomovar of *Acinetobacter calcoaceticus*. *Systematic and Applied Microbiology*. 2009, 32 (5): 334–341.
- 57 Пирог Т.П., Леонова Н.О., Шевчук Т.А., Иутинская Г.А. Синтез фитогормонов бактериями *Acinetobacter calcoaceticus* IMB В-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMB Ас-5017 и *Nocardia vaccinii* IMB В-7405 – продуцентами поверхностно-активных веществ. *Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия биологических наук*. 2016, 1: 111–116.
- 58 Hamayun M., Khan S.A., Khan A.L., Rehman G., Kim Y.-H., Iqbal I., Lee I.-J. Gibberellin production and plant growth promotion from pure cultures of *Cladosporium*

sp. MH-6 isolated from cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Mycologia*. 2010, 102 (5): 989–995.

59 Weselowski B., Nathoo N., Eastman A.W., MacDonald J., Yuan Z.-C. Isolation, identification and characterization of *Paenibacillus polymyxa* CR1 with potentials for biopesticide, biofertilization, biomass degradation and biofuel production. *BMC Microbiology*. 2016, 16 (1): 244. doi: 10.1186/s12866-016-0860-y.

60 Muthukamalam S., Sivagangavathi S., Dhrishya D., Sudha S. Characterization of dioxygenases and biosurfactants produced by crude oil degrading soil bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2017, 48 (4): 637–647.

61 Пирог Т.П., Софилканич А.П., Гриценко Н.А. Деструкция нефтяных загрязнений в присутствии поверхностно-активных веществ *Acinetobacter calcoaceticus* IMB В-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMB Ас-5017 и *Nocardia vaccini* IMB В-7405. *Биотехнология. Теория и практика (Казахстан)*. 2015, 2: 42–50.

62 Pidgorskyi V.S., Nogina T.M. Biodegradation of petroleum hydrocarbons by actinobacteria and acinetobacteria strains producing biosurfactant. *Mikrobiol. Z.* 2016, 78 (6): 92–103.

63 Jiang L., Ruan Q. Li R., Li T. Biodegradation of phenol by using free and immobilized cells of *Acinetobacter* sp. BS8Y. *Journal of Basic Microbiology*. 2012, 53 (3): 224–230.

64 Liu Z., Xie W., Li D., Peng Y., Li Z., Liu S. Biodegradation of Phenol by Bacteria Strain *Acinetobacter Calcoaceticus* PA Isolated from Phenolic Wastewater. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2016, 13 (3): 300.

65 Silambarasan S., Vangnai A.S. Biodegradation of 4-nitroaniline by plant-growth promoting *Acinetobacter* sp. AVL2 and toxicological analysis of its biodegradation metabolites. *Journal of Hazardous Materials*. 2016, 302: 426–436.

66 Hongsawat P., Vangnai, A.S. Biodegradation pathways of chloroanilines by *Acinetobacter baylyi* strain GFJ2. *Journal of Hazardous Materials*. 2011, 186 (2-3): 1300–1307.

67 Пирог Т.П., Конон А.Д., Софилканич А.П., Шевчук Т.А., Иутинская Г.А. Деструкция нефти в присутствии Cu^{2+} и поверхностно-активных веществ *Acinetobacter calcoaceticus* IMB В-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMB Ас-5017 и *Nocardia vaccini* IMB В-7405. *Мікробіол. журнал*. 2015, 77 (2): 2–8.

68 Пирог Т.П., Конон А.Д., Парфенюк С.А. Роль поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* IMB В-7241 у деструкції комплексних з важкими металами нафтових забруднень. *Наукові праці НУХТ*. 2014, 20 (2): 8–14.

69 DePaul M.A., Lin C.Y., Silver J., Lee Y.S. Combinatory repair strategy to promote axon regeneration and functional recovery after chronic spinal cord injury. *Sci. Rep.* 2017, 7 (1).

70 Tran A.P., Warren P.M., Silver J. The Biology of Regeneration Failure and Success After Spinal Cord Injury. *Physiol. Rev.* 2018, 98(2): 881-917.

-
- 71 Bradbury E.J., Carter L.M. Manipulating the glial scar: Chondroitinase ABC as a therapy for spinal cord injury. *Brain. Res. Bull.* 2011, 84 (4): 306–316.
- 72 Muir E., De Winter F., Verhaagen J., Fawcett J. Recent advances in the therapeutic uses of chondroitinase ABC. *Experimental Neurology.* 2019, 113032.
- 73 Global Market Study On Spinal Cord Trauma Treatment: Surgery To Remain The Most Attractive Treatment Type For Spinal Cord Trauma. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.persistencemarketresearch.com/market-research/spinal-cord-trauma-treatment-market.asp>
- 74 Лич І.В., Антонюк М.М. Промислова технологія лікарських засобів: лабораторний практикум для студентів напряму 6.051401 «Біотехнологія» денної форми навчання. — К.: НУХТ, 2011. — 111 с.
- 75 Заклади охорони здоров'я та захворюваність населення України. [Електронний ресурс] — Режим доступу: http://www.ukrstat.gov.ua/druk/publicat/kat_u/2018/zb/06/zb_zoz_17.pdf
- 76 Hong S.W., Kim B.T., Shin H.Y., Kim W.S., Lee K.S., Kim Y.S., Kim D.H. Purification and characterization of novel chondroitin ABC and AC lyases from *Bacteroides stercoris* HJ-15, a human intestinal anaerobic bacterium. *Eur. J. Biochem.* 2002, 269 (12): 2934-2940.
- 77 Fu J., Jiang Z., Chang J., Han B., Liu W., Peng Y. Purification, characterization of Chondroitinase ABC from *Sphingomonas paucimobilis* and in vitro cardiocytoprotection of the enzymatically degraded CS-A. *International Journal of Biological Macromolecules.* 2018, 115: 737–745.
- 78 Пирог Т. П., Ігнатова О. А. Загальна біотехнологія // Підручник. – К.: НУХТ. – 2009. – 336 с.
- 79 Карлаш Ю. В. Основи проектування біотехнологічних виробництв: Конспект лекцій для студентів напряму 6.051401 «Біотехнологія» денної та заочної форм навчання / Уклад. : Ю.В.Карлаш - К: НУХТ, 2013. – 143 с.
- 80 Сидоров Ю.І., Влязло Р.Й., Новіков В.П. Процеси і апарати мікробіологічної та фармацевтичної промисловості. Основи проектування: Навчальний посібник. – Львів: Інтелект-Захід, 2008. – 736 с.
- 81 Новіков Д.А. Выделение и очистка продуктов биотехнологии. Методическое пособие – Минск.: БГУ, 2014. – 256 с.
- 82 Сидоров Ю.І., Влязло Р.Й., Новіков В.П. Процеси і апарати мікробіологічної промисловості. Технологічні розрахунки. Приклади і задачі. Частина 2. – Львів: Львівська політехніка, 2004.- 296 с.
- 83 Основи проектування біотехнологічних виробництв: метод. Рекомендації до практ. Занять для студ. Напр. Підгот. 6.051401 «Біотехнологія» ден. Форми навч. / уклад. Ю.В.Карлаш – К.: НУХТ, 2016. – 87 с.

-
- 84 Климova М.А., Епринцев А.Т. Очистка ферментов и методы исследования их каталитических свойств: учебно-методическое пособие для вузов (Практикум). – 2008. – 36 с.
- 85 Сова В.В., Кусайкин М.И. Методическое пособие к практическим занятиям по очистке белков - Владивосток: Изд-во Дальневост. ун-та, 2006. - 42 с.
- 86 Cummins P.M., Dowling O., O'Connor B.F. Ion-Exchange Chromatography: Basic Principles and Application to the Partial Purification of Soluble Mammalian Prolyl Oligopeptidase. *Protein Chromatography*. 2010, 215–228. doi:10.1007/978-1-60761-913-0_12
- 87 RU 2144833C1. Хондроитиназа, способ ее получения и включающие ее фармацевтические композиции / Хасимото Нобуказу, Мотизуки Хидео, Хамаи Акио, Исикава Синити, Торикаи Мисако, Мияти Исао. – Опубл. 27.01.2000.
- 88 Система Prochrom Varicol Multicolumn для непрерывной хроматографии. [Электронный ресурс] – режим доступа: <https://biotechno.ru/catalog/khromatografiya/sistema-prochrom-varicol-multicolumn/>
- 89 Универсальная фильтрующая центрифуга Rousselet Robatel RC20. [Электронный ресурс] – режим доступа: <https://biotechno.ru/catalog/separatsiya-tsentrifugirovanie/laboratornaya-filtruyushchaya-tsentrifuga-rousselet-robotel-rc-30-vx/>
- 90 Конструкции сушильных аппаратов. [Электронный ресурс] – режим доступа: http://chemanalytica.com/book/novyy_spravochnik_khimika_i_tekhnologa/10_protseyy_i_apparaty_khimicheskikh_tekhnologiy_chast_II/7076
- 91 Лабораторная вакуумная сублимационная лиофильная сушилка LG-08 [Электронный ресурс] – режим доступа: <https://minipress.ru/katalog/sublimatsionnye-lyofilnye-vakuumnye-sushki/laboratornaya-vertikalnaya-sublimatsionnaya-sushilka-lg-08/>
- 92 Вибрационная шаровая мельница MM 200. [Электронный ресурс] – режим доступа: <https://www.retsch.ru/ru/products/milling/ball-mills/mixer-mill-mm-200/function-features/>
- 93 Воздухоструйная просеивающая машина AS 200 jet. [Электронный ресурс] – режим доступа: <https://www.retsch.ru/ru/products/sieving/sieve-shakers/as-200-jet/function-features/>
- 94 Настольный вакуумный упаковщик ИТА-08. [Электронный ресурс] – режим доступа: https://minipress.ru/katalog/upakovochnoe_oborudovanie/vakuumnye-upakovochnye-mashiny-paketov/nastolnyj-vakuumnyj-upakovshhik-dlya-paketov-ita-08/
- 95 Розчини та буферні розчини. [Электронный ресурс] – режим доступа: <http://www.eurasiancommission.org/ru/act/tehnreg/deptexreg/LS1/Documents/4.1.3%20%D0%A0%D0%B0%D1%81%D1%82%D0%B2%D0%BE%D1%80%D1%8B%20%D0%B8%20%D0%B1%D1%83%D1%84%D0%B5%D1%80%D0%BD%D1%8B%D0>

%B5%20%D1%80%D0%B0%D1%81%D1%82%D0%B2%D0%BE%D1%80%D1%8
V%20%D0%BE%D0%BA%D0%BE%D0%BD%203.pdf

96 *Надлежащая* производственная практика лекарственных средств. Активные фармацевтические ингредиенты. Готовые лекарственные средства. Руководства по качеству. Рекомендации PIC/S / Под ред. Н.А. Ляпунова, В.А. Загория, В.П. Георгиевского, Е.П. Безуглой. — К.: МОРИОН, 2001. — 472 с.

97 Методичні вказівки (інструкція) щодо застосування засобу "Хлорантоін" з метою дезінфекції об'єктів та достерилізаційного очищення виробів медичного призначення. [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://farmakos.nethouse.ua/static/doc/0000/0000/0082/82184.jtby47bitk.pdf>

98 Методичні вказівки (інструкція) щодо застосування засобу "Полідез-А" з метою дезінфекції об'єктів та достерилізаційного очищення виробів медичного призначення. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.kin.kiev.ua/prep/dezinfektanti/polidez-sredstvo-dla-dezinfekcii/>

99 Эксан Про Дез [Електронний ресурс] – режим доступу: <http://novahim.com.ua/eksan-pro-dez-mojushchee-sredstvo-dlja-udalenija-zhirovyh-zagrjaznenij-2>

100 Блиева Р. К. Новый метод длительного культивирования и селекции продуцентов ферментов. *Микробные технологии: фундаментальные и прикладные аспекты*. 2013, 5 (7): 29-35.

АПРОБАЦІЯ РОБОТИ

Тези: Іванов М.С., Пирог Т.П. Представники роду *Acinetobacter* як продуценти біоемульгаторів // Матеріали 87 Міжнародної конференції молодих учених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у ХХІ столітті» – подана до друку.

Міністерство освіти і науки України

Національний університет харчових технологій

86

**Міжнародна наукова
конференція молодих учених,
аспірантів і студентів**

**"Наукові здобутки молоді –
вирішенню проблем
харчування людства у ХХІ
столітті"**

2–3 квітня 2020 р.

Частина 1

Київ НУХТ 2020

18. Представники роду *Acinetobacter* як продуценти поверхнево-активних речовин

Микита Іванов, Тетяна Пирог

Національний університет харчових технологій, Київ, Україна

Поверхнево-активні речовини мікробного походження останніми роками привертають значну увагу, оскільки є продуктами мікробного синтезу мультифункціонального призначення. Так, завдяки емульгуювальним та поверхнево-активним властивостям поверхнево-активні речовини використовуються в природоохоронних технологіях, завдяки антимікробним і антиадгезивним – є перспективними для застосування у біології та медицині як альтернатива синтетичним дезінфікуючим засобам або лікарським препаратам [1].

Бактерії роду *Acinetobacter* не є традиційними продуцентами низькомолекулярних поверхнево-активних речовин [2, 3]. Перші повідомлення про здатність бактерій роду *Acinetobacter* до їх синтезу з'явилися у 2009 р. На теперішній час відомо близько 15 представників роду *Acinetobacter*, які синтезують поверхнево-активні речовини різної природи: гліколіпіди, ліпопептиди, рамноліпіди. Переважна більшість цих поверхнево-активних речовин розглядаються авторами як потенційні деструктори ксенобіотиків (нафта, парафіни, нафталін, фенантрен, пірен тощо).

Так, поверхнево-активні речовини штаму *Acinetobacter baumannii* MN3 розкладають низькомолекулярні вуглеводні сирої нафти (октан, декан, пентадекан) на 78 % за початкової концентрації 10 г/л через 7 днів [3]. За наявності поверхнево-активних речовин штаму *Acinetobacter bouvetii* BP18 ступінь деструкції поліциклічних ароматичних вуглеводнів дизельного палива (вихідна концентрація 20 г/л) становив 93 % на 30 добу [2]. Від відомих у світі вигідно відрізняється вітчизняний штам *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241, який, окрім здатності до комплексної деструкції вуглеводнів, проявляє високу антимікробну та антиадгезивну активність, а також синтезує фітогормони (ауксини, цитокініни, гібереліни).

Висновки. Отже, представники роду *Acinetobacter* здатні до синтезу нетрадиційних для них поверхнево-активних речовин, перспективних для використання в природоохоронних технологіях.

Література

1. Пирог Т.П., Антонюк С.И., Карпенко Е.В., Шевчук Т.А. (2009), Влияние условий культивирования штамма *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 на синтез поверхностно-активных веществ, *Прикл. биохимия и микробиология*, 45 (3), с. 304-310.
2. Khan A., Tanveer S., Alia S., Anees M. (2017), Role of nutrients in bacterial biosurfactant production and effect of biosurfactant production on petroleum hydrocarbon biodegradation, *Ecol. Eng.*, 104, p. 158-164.
3. Punniyakotti P., Punniyakotti E., Kuppusamy S., Devaraj S. (2017), Biosurfactant and enzyme mediated crude oil degradation by *Pseudomonas stutzeri* NA3 and *Acinetobacter baumannii* MN3, *Biotech*, 7:278.

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ПОЛТАВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
Академія WSB
Опольський університет
Національний аграрний університет Вірменії
Азербайджанський державний аграрний університет
Азербайджанський університет кооперації

Перспективи еко-інноваційного розвитку сільськогосподарського виробництва

Матеріали

*II Міжнародної науково-практичної конференції
20 листопада 2020 року*

Полтава
2020

Іванов Микита Сергійович
магістрант
Пирог Тетяна Павлівна
д-р біол. наук, професор
Національний університет харчових технологій
м. Київ

ПЕРСПЕКТИВИ ВИКОРИСТАННЯ МЕТАБОЛІТІВ БАКТЕРІЙ РОДУ *ACINETOBACTER* У СІЛЬСЬКОМУ ГОСПОДАРСТВІ

Значення мікроорганізмів в оптимізації продукційного процесу сільськогосподарських культур важко переоцінити, оскільки існування рослин без участі мікроорганізмів неможливе. Мікробні перетворення поживних речовин є ключовим фактором росту і розвитку рослин, що сприяє збільшенню продуктивності екосистем [1]. Здатність до стимуляції росту рослин і збільшення продуктивності сільськогосподарських культур встановлена для бактерій багатьох родів (*Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Azospirillum*, *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Paenibacillus*) [2, 3]. Окрім стимуляції росту, важливою є роль фосфатмобілізувальних бактерій у життєдіяльності рослин, оскільки у цьому разі відбувається перетворення важкорозчинних органічних і неорганічних сполук фосфору у доступну для засвоєння рослинами форму [4].

Бактерії роду *Acinetobacter* широко поширені в ґрунті і здатні до синтезу біологічно-активних речовин (гіберелінів, ауксинів) [5–8], які стимулюють ріст рослин, деякі представники здатні до солубілізації фосфатів завдяки синтезу органічних кислот [5, 6], що робить їх перспективними для використання у рослинництві для збільшення врожайності сільськогосподарських культур.

У роботі [5] встановлено, що штам *Acinetobacter calcoaceticus* SE370 синтезує біологічно-активні гібереліни ГК₁, ГК₃ і ГК₄ (0,45; 6,25 і 2,83 нг/100 мл культуральної рідини відповідно). Gulati із співавт. [6] показали, що штам *A. rhizosphaerae* ВІНВ 723 утворює інший фітогормон стимулювальної дії ауксиної природи (індолілоцтову кислоту) в кількості 15,6 нг/мл. У 2016 р. встановлено здатність штаму *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 [7] синтезувати комплекс позаклітинних фітогормонів при культивуванні на гліцерині і станолі. Концентрація індолоцтової кислоти становила 25 мкг/л, цитокинінів (3,5–364 мкг/л). У роботі [8] показано, що штами *Acinetobacter sp* ІН9 і ОСІІ стимулювали ріст нуту та ячменю, проте природу ріст-стимулювальних речовин автори не досліджували. Обробка ячменю культуральною рідиною цих штамів супроводжувалося збільшенням ваги сухої речовини на 56–66 % порівняно з контролем.

Здатність до солубілізації фосфатів бактеріями роду *Acinetobacter* розглядається у роботах [5, 6]. Так, у процесі культивування *A. calcoaceticus* SE370 відбувалося утворення органічних кислот (глюконової та 2-кетоглюконової), знижувалося рН культуральної рідини, що супроводжувалося перетворенням нерозчинного фосфату на розчинний [5]. Здатність до синтезу органічних кислот (глюконова, щавлева, 2-кетоглюконова, молочна, яблучна, мурашина) встановлено і для штаму *A. rhizosphaerae* ВІНВ 723, завдяки чому відбувається солубілізація трифосфату кальцію [6]. Автори зазначають, що залежно від форми нерозчинних фосфатів у середовищі культивування штаму ВІНВ 723 спостерігається зміна якісного і кількісного складу синтезованих органічних кислот.

Наведені дані щодо синтезу представниками роду *Acinetobacter* фітогормонів стимулювальної дії та здатності до мобілізації фосфатів свідчать про потенційну можливість їх використання у сільському господарстві для підвищення врожайності рослин.

Бібліографічний список

1. Jacoby R., Peukert M., Succurro A., Koprivova A., Kopriva S. The Role of Soil Microorganisms in Plant Mineral Nutrition—Current Knowledge and Future Directions. *Frontiers in Plant Science*. 2017, 8: 1–16.
2. Egamberdieva D., Wirth S. J., Alqarawi A. A., Abd Allah E. F., Hashem A. Phytohormones and Beneficial Microbes: Essential Components for Plants to Balance Stress and Fitness. *Frontiers in Microbiology*. 2017, 8: 1–21.
3. Figueiredo M. D. V. B., Seldin L., Araujo F. F., Mariano R. D. L. R. Plant growth promoting rhizobacteria: fundamentals and applications. *Plant growth and health promoting bacteria*. 2010, 18: 21–43.
4. Alori E. T., Glick B. R., Babalola O. O Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. *Frontiers in Microbiology*. 2017, 8: 9–17.

**УНІВЕРСИТЕТ ДЕРЖАВНОЇ ФІСКАЛЬНОЇ СЛУЖБИ УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ІНФОРМАЦІЙНИХ ТЕХНОЛОГІЙ
КАФЕДРА ТОВАРОЗНАВСТВА
ТА ТЕХНОГЕННО-ЕКОЛОГІЧНОЇ БЕЗПЕКИ**



До 100-річчя навчального закладу

**ТЕХНОГЕННО-ЕКОЛОГІЧНА БЕЗПЕКА УКРАЇНИ:
СТАН ТА ПЕРСПЕКТИВИ РОЗВИТКУ /
ТЕБ-2020**

*Матеріали
X Всеукраїнської науково-практичної
Інтернет-конференції*

20 – 29 жовтня 2020 р.

м. Ірпінь

**ПРЕДСТАВНИКИ РОДУ *ACINETOBACTER*
ЯК ДЕСТРУКТОРИ КСЕНОБІОТИКІВ**

Іванов М.С., студент
Пирог Т.П., д.б.н., професор,
завідувач кафедри біотехнології і мікробіології
Національний університет харчових технологій

Розливи нафти постійно загрожують водному середовищу, незважаючи на суттєві технічні розробки в галузі безпеки видобутку та транспортування сирої нафти. Ці розливи створюють і спричиняють сильні, з наслідками на десятиліття, загрози морським та прибережним екосистемам та організмам, які їх підтримують. Наприклад, за період 2010-2014 рр. через розливи внаслідок аварій, операцій з очищення чи інших причин було втрачено 5 тис. тонн з 10 млрд. тонн нафти, що перевозиться морем щорічно. Вдосконалені методи видобутку нафти різко скоротили великі розливи (обсягом 7-700 т і понад 700 т) упродовж останніх десятиліть до середнього рівня (5,2%) для розливів 7-700 т і невисокого (1,8%) – понад 700 т/рік. Невеликі розливи (менше 7 т нафти), що становлять 80% від усіх зареєстрованих випадків, відбуваються непомітно і про них навіть не повідомляють. За 2019 рік було зафіксовано один великий розлив (> 700 т) та два середніх (7–700 т). Таким чином, три розливи обсягом 7 тонн і більше – це найнижчий річний показник за останні п'ять десятиліть [1].

Основними методами знешкодження нафти, як ксенобітика є видалення легких фракцій нафти природнім шляхом; здебільшого випаровуванням, фотоокисленням та геохімічними реакціями. Натомість важкі фракції диспергуються або розчиняються, і лише незначна частина може бути видалена в процесі біодеградації. Хоча хіміко-фізичні процеси

відіграють важливу роль у процесі детоксикації нафти, остаточно і повна деградація в основному здійснюється морською мікробіотою [2].

Ефективним біологічним способом очищення є біоаугментація, тобто використання мікроорганізмів, що використовувати ксенобіотик як єдине джерело вуглецю та енергії. До цих видів бактерій належать *Pseudomonas putida*, *Rhodococcus erythropolis*, *Bacillus subtilis*, *Arthrobacter citreus*, *Alcaligenes faecalis*, *Sphingomonas* та *Acinetobacter* [3]. Проте багато факторів, таких як толерантність до ксенобіотиків, конститутивна експресія катаболічних генів, специфічність субстрату, кінетика та стабільність кодованого ферменту, можуть впливати на ефективність біоаугментації [4]. У зв'язку з цим більш ефективним є інший спосіб очищення – біостимуляція, що передбачає використання різних речовин, стимулюючих природну мікробіоту. Ефективними стимуляторами природної нафтоокиснювальної мікробіоти можуть бути мікробні поверхнево-активні речовини (ПАР) [5].

У роботі [6] визначали ступінь біодеструкції вуглеводнів (керосин, н-гексадекан, дизельне паливо, сира нафта, 500 мг/л), використовуючи їх як ростові субстрати. Ступінь розкладання за 120 год культивування штаму *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7013 на цих субстратах становив: н-гексадекану (82,1%), керосину (72,5%), дизельного палива (70,1%) і сирі нафти (63,5%).

Однак мікроорганізми, інтродуковані в забруднені нафтою екосистеми, потребують певного часу для адаптації до нових умов існування. У зв'язку з цим більш ефективним (в порівнянні з біоаугментацією) є використання мікробних ПАР. Так, дослідження впливу ПАР *A. calcoaceticus* IMB B-7241 у вигляді культуральної рідини або супернатанту (5-15 %) на деструкцію нафти у воді (3-6 г/л) та ґрунті (20 мл/кг) показало, що найвищий рівень деструкції (92,3%) через 30 діб

спостерігався за концентрації культуральної рідини 5%. Дослідники встановили, що основним механізмом є активація ПАР автохтонної мікробіоти [5], а додавання катіонів міді стимулювало розкладання нафти з 75% до 90%. Це явище зумовлене тим, що катіони міді активують алкангідроксилази штаму-продуцента ПАР і природної нафтоокиснювальної мікробіоти [7]. У подальших дослідженнях встановлено, що за наявності ПАР і суміші катіонів металів (Cu^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+}) деструкція нафти (3 г/л) досягала 90-92% [8].

У роботах [3, 9] досліджували здатність до деструкції фенолу бактеріями роду *Acinetobacter*. Встановлено, що штам *Acinetobacter* sp. BS8Y розкладав 99,2% фенолу (600 мг/л) за 24 год. При іммобілізації клітин ефективність деградації фенолу (800 мг/л) підвищувалася до 96% упродовж 30 год [9]. Ступінь деструкції фенолу за 48 год (початкова концентрація 800 мг/л) штамом *Acinetobacter calcoaceticus* PA досягав майже 92% [3]. У роботі [10] встановлено ефективність використання *Acinetobacter* sp. AVLB2 для деструкції пестицидів, зокрема похідних аніліну. Автори виявили новий шлях деградації 4-нітроаніліну (основний забрудник, утворюваний в результаті промислового виробництва та трансформації пестицидів). Виділений штам *Acinetobacter* sp. AVLB2 здатний до деградації 82% 4-нітроаніліну з початковою концентрацією 25мг/л за 7 діб.

Отже, представники роду *Acinetobacter* є ефективними та перспективними деструкторами ксенобіотиків, а саме: нафти, н-гексадекану, фенолу, аніліну. Так, підвищенню деструкції вуглеводнів представниками *Acinetobacter* сприяють поверхнево-активні речовини, що в природніх умовах є активаторами автохтонної мікробіоти.

Перелік використаних джерел:

1. Конюшенко В.В. Негативний вплив діяльності з видобутку нафти на стан природного середовища. Бізнес-аналітика в управлінні зовнішньоекономічною діяльністю: Матеріали VII Міжнародної науково-практичної конференції, 17 березня 2020 року / Упоряд. О. А. Іващенко. Київ: ДП «Інформаційно-аналітичне агентство». 2020. С. 216-220.
2. Santisi S., Cappello S., Catalfamo M., Mancini G., Hassanshahian M., Genovese L., Yakimov M.M. Biodegradation of crude oil by individual bacterial strains and a mixed bacterial consortium. *Braz. J. Microbiol.* 2015, 46 (2): 377–387.
3. Liu Z., Xie W., Li D., Peng Y., Li Z., Liu S. Biodegradation of Phenol by Bacteria Strain *Acinetobacter Calcoaceticus* PA Isolated from Phenolic Wastewater. *Int. J. Environ. Res. Public. Health.* 2016, 13 (3): 300.
4. Goyal P., Basniwal R.K. Environmental Bioremediation: Biodegradation of Xenobiotic Compounds. *Xenobiotics in the Soil Environment.* 2017, 347–371.
5. Пирог Т.П., Софилканич А.П., Гриценко Н.А. Деструкция нефтяных загрязнений в присутствии поверхностно-активных веществ *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017 и *Nocardia vaccinii* IMB B-7405. *Биотехнология. Теория и практика (Казахстан).* 2015. № 2. С. 42–50.
6. Pidgorskyi V.S., Nogina T.M. Biodegradation of petroleum hydrocarbons by actinobacteria and acinetobacteria strains producing biosurfactant. *Mikrobiol. Z.* 2016, 78 (6): 92–103.
7. Пирог Т.П., Конон А.Д., Софилканич А.П., Шевчук Т.А., Иутинская Г.А. Деструкция нефти в присутствии Cu^{2+} и поверхностно-активных веществ *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017 и *Nocardia vaccinii* IMB B-7405. *Мікробіол. журнал.* 2015. № 77, 2. С. 2–8.
8. Пирог Т.П., Конон А.Д., Парфенюк С.А. Роль поверхностно-активных речовин *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 у деструкції комплексних з важкими металами нафтових забруднень. *Наукові праці НУХТ.* 2014. № 20, 2. С. 8–14.
9. Jiang L., Ruan Q. Li R., Li T. Biodegradation of phenol by using free and immobilized cells of *Acinetobacter* sp. BS8Y. *Journal of Basic Microbiology.* 2012, 53 (3): 224–230.
10. Silambarasan S., Vangnai A.S. Biodegradation of 4-nitroaniline by plant-growth promoting *Acinetobacter* sp. AVL2 and toxicological analysis of its biodegradation metabolites. *Journal of Hazardous Materials.* 2016, 302: 426–436.

Статті:

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
И ПРОДОВОЛЬСТВИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

Учреждение образования
«БЕЛОРУССКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ ОРДЕНОВ ОКТЯБРЬСКОЙ
РЕВОЛЮЦИИ И ТРУДОВОГО КРАСНОГО ЗНАМЕНИ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ АКАДЕМИЯ»

АГРОНОМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

КАФЕДРА СЕЛЕКЦИИ И ГЕНЕТИКИ

СЕЛЕКЦИЯ И ГЕНЕТИКА: ИННОВАЦИИ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Сборник статей по материалам
Международной научно-практической конференции,
посвященной 100-летию кафедры селекции и генетики
(г. Горки, 20 ноября 2020 г.)

Горки
БГСХА
2020

**ДЕЙСТВИЕ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ
ACINETOBACTER CALCOACETICUS ИМВ В-7241
НА ФИТОПАТОГЕННЫЕ БАКТЕРИИ**

Иванов Н. С. – магистрант; **Пирог Т. П.** – д. б. н., профессор
Национальный университет пищевых технологий, Киев, Украина

Контроль и предотвращение заболеваний растений – одна из основных задач в сельском хозяйстве. Это связано с тем, что такие заболевания могут приводить к значительным экономическим потерям. Так, например, по данным Продовольственной и сельскохозяйственной организации ООН, из-за инфицирования патогенами потери урожая фруктов и овощей в поле и в послеуборочный период составляют до 30 %.

На сегодняшний день для борьбы с заболеваниями растений применяются несколько подходов. Традиционный способ – использование таких химических веществ, как синтетические пестициды (в том числе фунгициды, бактерициды, вируциды, нематоциды и инсектициды). Несмотря на достаточно высокую эффективность синтетических пестицидов, их применение часто ассоциируется с загрязнением окружающей среды и потенциальным риском для здоровья человека и животных. Более того, ряд фитопатогенов вирусной и бактериальной природы нечувствителен к доступным на рынке препаратам, а некоторые патогенные грибы, нематоды, акариды и насекомые могут со временем приобретать устойчивость, что позволяет им переносить большие дозы химических пестицидов без значительных повреждений. Альтернативным подходом является применение так называемых микробных пестицидов (биомасса определенных штаммов бактерий, грибов и их метаболиты) [1].

Цель работы – оценить перспективы использования поверхностно-активных веществ, синтезируемых *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241, в качестве антимикробных агентов по отношению к фитопатогенным бактериям.

Штамм *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241, изолированный из загрязненной нефтепродуктами почвы, синтезирует поверхностно-активные вещества (ПАВ), представляющие собой комплекс глико-,

амино- и нейтральных липидов. В работах [2, 3] установлено антимикробное действие препаратов *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 в виде супернатанта и раствора очищенных ПАВ на фитопатогенные бактерии родов *Pseudomonas* и *Xanthomonas*, являющихся возбудителями пятнистых бактериозов пасленовых и крестоцветных растений. Препараты ПАВ в концентрации 0,1–0,15 мг/мл снижали количество живых клеток *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 8003, *Xanthomonas vesicatoria* 7790 после 1 ч обработки на 80–82,3 %, а *Pseudomonas corrugata* 9070, *Pseudomonas syringae* 8511 – 25,3–74,3 % соответственно.

Растворы ПАВ оказались более эффективными антимикробными агентами по отношению к фитопатогенным бактериям родов *Pseudomonas* и *Xanthomonas*, чем супернатанты с аналогичной концентрацией поверхностно-активных веществ. Так, выживаемость клеток фитопатогенных бактерий после обработки раствором ПАВ была в среднем на 25 % ниже, чем в присутствии соответствующего супернатанта. Кроме того, эффективность препаратов ПАВ как антимикробных агентов повышалась при увеличении экспозиции. В последующих экспериментах антимикробную активность ПАВ *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 оценивали по показателю минимальной ингибирующей концентрации, которая составляла 0,01 мг/мл для возбудителя бактериоза овса *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens* УКМ В-1154.

В табл. 1 приведена обобщенная информация о влиянии ПАВ *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241 на некоторые фитопатогенные бактерии родов *Xanthomonas* и *Pseudomonas*.

Таблица 1. Влияние ПАВ *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241 на фитопатогенные бактерии родов *Xanthomonas* и *Pseudomonas*

Тест-культура	Препарат*	Выживаемость клеток, %	
		через 1 ч.	через 2 ч.
<i>Pseudomonas carotovorum</i> 8982	1	94	57
	2	100	33
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>coronafaciens</i> УКМ В-1154	1	87	35
	2	39	33
<i>Pseudomonas corrugate</i> 9070	1	93	н. о.
	2	75	25
<i>Pseudomonas syringae</i> 8511	1	27	18
	2	35	9
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> 8003	1	20	н. о.
	2	18	37
<i>Xanthomonas vesicatoria</i> 7790	1	2	0
	2	0	0

Примечание. * – 1 – супернатант, содержащий ПАВ; 2 – раствор ПАВ; н. о. – не определяли.

Кроме антимикробных, ПАВ *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 обладают антиадгезивными свойствами и способностью к деструкции биопленок [4]. Установлено, что независимо от природы источника углерода в среде культивирования штамма ИМВ В-7241 (этанол, н-гексадекан, глицерин) синтезируемые ПАВ в концентрации 0,003–0,12 мг/мл снижали адгезию некоторых, дрожжей и грибов на абиотических поверхностях на 75–90, 50–80 та 20–40 % соответственно. Препараты в виде супернатанта и растворов очищенных ПАВ концентрации 0,04–1,28 мг/мл эффективно (на 50–85 %) разрушали биопленки патогенных и условно патогенных бактерий.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что поверхностно-активные вещества *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241, обладающие антимикробными и антиадгезивными свойствами, являются перспективными для разработки экологически безопасных биопрепаратов для контроля численности фитопатогенных бактерий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алешин, В. Н. Контроль заболеваний растений за счет индуцированной резистентности с помощью некоторых химических веществ и биоагентов / В. Н. Алешин, Г. В. Першакова, Г. А. Купин // Плодоводство и виноградарство Юга России. – 2018. – № 53 (5). – С. 113–143.
2. Пирог, Т. П. Действие поверхностно-активных веществ *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241, *Rhodococcus erythropolis* ИМВ Ас-5017 и *Nocardia vaccinii* К-8 на фитопатогенные бактерии / Т. П. Пирог, А. Д. Конон, А. П. Софилканич, Г. А. Иутинская // Прикладная биохимия и микробиология. – 2013. – № 49 (4). – С. 364–371.
3. Panasyuk, K. Effect of extracellular metabolites *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 and *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 on phytopathogenic bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens* УКМ В-1154 / K. Panasyuk, T. Pirog // Scientific Works of NUFT. – 2015. – № 21 (2). P. 22–28.
4. Pirog, T. P. Microbial surface-active substances as antiadhesive agents / T. P. Pirog, I. V. Savenko, D. A. Lutsay // Biotechnologia acta. – 2016. – № 9 (3). P. 7–22.

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
КАФЕДРА ТЕХНОЛОГІЇ ЛІКІВ
КАФЕДРА ЗАВОДСЬКОЇ ТЕХНОЛОГІЇ ЛІКІВ**



МАТЕРІАЛИ

**V Міжнародної науково-практичної
інтернет - конференції**

**«ТЕХНОЛОГІЧНІ ТА БІОФАРМАЦЕВТИЧНІ АСПЕКТИ СТВОРЕННЯ
ЛІКАРСЬКИХ ПРЕПАРАТІВ РІЗНОЇ НАПРАВЛЕНОСТІ ДІЇ»**

**«TECHNOLOGICAL AND BIOPHARMACEUTICAL
ASPECTS OF DRUGS DEVELOPING WITH
DIFFERENT ORIENTATION OF ACTION»**

26 листопада 2020 р.

м. Харків

Перспективи використання мікробних метаболітів

для лікування травм спинного мозку

Іванов М.С, Пирог Т.П.

Кафедра біотехнології і мікробіології

Національний університет харчових технологій,

м. Київ, Україна

nikita.ivanov00@gmail.com

Щорічно в Україні понад 2500 постраждалих отримують травми спинного мозку. 87% з них – особи працездатного віку, 80-85% з них стають інвалідами I і II групи. Хребетно-спинномозкові травми є поширеною причиною смерті людей у віці від 5 до 44 років в країнах, що розвиваються. Рівень смертності серед даної групи пацієнтів становить 17%. Щорічно фіксується від 19 до 88 випадків переломів хребта на 100 000 чоловік і від 14 до 53 випадків травм спинного мозку на мільйон. Згідно бази Trauma Audit and Reserch Network (TRAN) за період з 1988 по 2009 рр., з 250 584 пацієнтів 24 000 (9,6%) мали переломи хребта і / або зміщення хребців, а у 4489 осіб (1,8%) виявлено пошкодження спинного мозку з переломами / зміщеннями або без них [1].

У сучасній практиці є шість основних принципів лікування травм спинного мозку: лікування дихальної недостатності, підтримка нормальних функцій серцево-судинної системи, неврологічні дослідження, радіологічні обстеження, медикаментозне лікування і вибір тактики хірургічного втручання [1]. Останніми роками з'явилась інформація про синтез деякими представниками роду *Acinetobacter* унікальних ферментів хондроїтинази, які є перспективними для лікування травм спинного мозку [2].

Мета статті: аналіз сучасної літератури щодо можливих проблем та перспектив використання ферменту хондроїтинази *Acinetobacter* sp. C26 [18], *Flavobacterium heparinum* [15], *Bacteroides stercoris* HJ-15 [5], *Arthrobacter* sp. CS01 [4], *Proteus vulgaris* [11].

Викладення основних результатів дослідження. Травма спинного мозку є руйнівним станом, при якому в даний час немає ефективного лікування. Захворювання виникає через нездатність нейронів центральної нервової системи відновити пошкодження після травми [6]. Це частково пов'язано з наявністю молекул в середовищі пошкодженого спинного мозку, які блокують процес відновлення. Однією з багатьох реактивних змін, що відбуваються після пошкодження спинного мозку, є утворення *гліального рубця*, реактивного клітинного процесу, за допомогою якого гліальні клітини накопичуються і оточують місця пошкодження центральної нервової системи (ЦНС), щоб заблокувати ураження [3]. Гліальний рубець відіграє важливу роль у стабілізації тканин ЦНС шляхом відновлення фізичної та хімічної

цілісності ЦНС та закриття гематоенцефалічного бар'єру для зменшення інфільтрації не-ЦНС тканини, мінімізації інфекцій та поширення клітинних пошкоджень [2]. Однак гліальний рубець також створює як фізичний, так і молекулярний бар'єр для регенерації пошкоджених аксонів, запобігаючи повторному зростанню та відновленню.

Хондроїтин сульфати як основні речовини гліального рубця. Фізична наявність реактивних гліальних клітин може блокувати ріст нейронів, тоді як хімічні фактори, присутні в позаклітинному матриксі гліального рубця, можуть активно гальмувати зростання аксонів. Одним класом інгібуючих молекул, асоційованих із позаклітинним матриксом гліального рубця, є протеоглікани хондроїтинсульфату. Протеоглікани хондроїтинсульфату складаються з білкового ядра з одним або кількома ковалентно приєднаними ланцюгами хондроїтинсульфату глікозаміноглікану. Хондроїтин сульфат, що належить до класу природних складних полісахаридів з назвою глікозаміноглікани, складається з дисахаридних одиниць [(1→4) β-D-глюкуронової кислоти (GlcA) - (1→3) β-N-ацетил-D-галактозамін]. Хондроїтин сульфат широко поширений у людей, інших ссавців та безхребетних. Як вуглеводні компоненти протеогліканів вони беруть участь у регуляції різних клітинних процесів, таких як адгезія, диференціація, міграція та проліферація [18].

Хондроїтиназа як можлива терапія. Продуцентами хондроїтинази, яка може використовуватися для деградації хондроїтин сульфатів [11], є *Flavobacterium heparinum* [15], *Bacteroides stercoris* HJ-15 [5], *Arthrobacter* sp. CS01 [4], *Proteus vulgaris* [11]. Субстратами хондроїтинази є хондроїтин сульфати типу А, В, С, гіалуронова кислота є каталізатором реакції, в результаті якої утворюються ненасичені дисахариди [17], що сприяє регенерації нервів та їх функціональному відновленню. В результаті підвищення пластичності неушкоджені нейрони проростають та виконують функцію пошкоджених. Позитивні результати терапевтичного використання цього ферменту одержані в багатьох незалежних лабораторіях світу на кількох моделях тварин [7, 8]. Крім використання хондроїтинази у лікуванні гострих травм, нещодавно виявилось, що цей фермент ефективний також і при хронічних травмах [16].

Шляхи підвищення ефективності хондроїтинази. Складнощі терапевтичного використання хондроїтинази зумовлені такими причинами: *по-перше*, наявність висококваліфікованих лікарів, здатних виконувати відповідні ін'єкції; *по-друге*, нестабільність хондроїтинази за температури тіла та її розподіл у спинномозковій рідині, що призводить до локалізації препарату далеко від цільового місця; *по-третє*, повторна ін'єкція недоцільна через високу інвазивність та біль, що виникає під час кожного введення [14].

Хоча фермент, синтезований *Acinetobacter* sp. C26 [18] є стабільним при 37 °С, розробка методів для підвищення стабільності ферментів та їх доставки є необхідним кроком до

отримання лікарської речовини. Так, одним з методів підвищення стабільності є введення ферменту в агар-карбомерний гідрогель [14]. Цей гель характеризувався здатністю захоплювати молекули ферменту і виявляв когерентні механічні властивості, які легко вводяться в цільову тканину. Крім того, гідрогелеве навантаження не спричиняло зниження активності і денатурації хондроїтинази. Іншим методом, який застосовується для підвищення стабільності ферментів, є додавання співрозчинників. Так, трегалоза підвищує термостабільність ферментів [10], а нещодавно було показано, що цей дисахарид забезпечує захист від протеолітичної деградації та інактивації шляхом окислення [9]. За наявності трегалози активність хондроїтинази *in vitro* не змінювалася упродовж 14 днів, що достатньо для зменшення гліозу та посилення регенерації аксонів [12].

У 2019 р. опубліковані перші результати досліджень щодо ефективності використання хондроїтинази для лікування травм спинного мозку у приматів [13]. У процесі досліджень мавпам, що мали травми шийного відділу спинного мозку, робили ін'єкції хондроїтиназою нижче місця травми та оцінювали відновлення провідності та рухливості кінцівок упродовж 4 тижнів. Стан мавп, що отримували ін'єкції хондроїтинази ставав кращим, ніж контрольних особин, упродовж наступних 6 тижнів за рахунок регенерації аксонів у місцях травми.

Висновки

За останні 10 років досягнуто значного прогресу у дослідженні механізмів дії та функції хондроїтинази у лікуванні травм спинного мозку. Встановлено здатність до синтезу хондроїтинази у представників різних родів бактерій і розроблено підходи до забезпечення стабільності ферментів мікробного походження та їх доставки до місця ураження. Встановлена на моделі приматів ефективність хондроїтинази засвідчує можливість використання цього ферменту у комбінованій терапії.

Література:

1. Згуров А.С., Хрущ А.В., Сон А.С. Современное состояние лечения позвоночно-спинномозговой травмы. *Международ. неврол. журн.* 2013, 3 (57): 9-19.
2. Bradbury E.J., Carter L.M. Manipulating the glial scar: Chondroitinase ABC as a therapy for spinal cord injury. *Brain. Res. Bull.* 2011, 84 (4): 306–316. doi: 10.1016/j.brainresbull.2010.06.015.
3. Cregg J.M., Depaul M.A., Filous A.R., Lang B.T., Tran A., Silver J. Functional Regeneration Beyond the Glial Scar. *Exp. Neurol.* 2014, 253: 197-207. doi: 10.1016/j.expneurol.2013.12.024.
4. Fang Y., Yang S., Fu X., Xie W., Li L., Liu Z. Expression, purification and characterization of chondroitinase AC II from marine bacterium *Arthrobacter sp.* CS01. *Mar. Drugs.* 2019, 17 (3). doi: 10.3390/md17030185.

-
5. Hong S.W., Kim B.T., Shin H.Y., Kim W.S., Lee K.S., Kim Y.S., Kim D.H. Purification and characterization of novel chondroitin ABC and AC lyases from *Bacteroides stercoris* HJ-15, a human intestinal anaerobic bacterium. *Eur. J. Biochem.* 2002, 269 (12): 2934-2940. doi: 10.1046/j.1432-1033.2002.02967.x.
 6. Lee B.B., Cripps R.A., Fitzharris M., Wing, P.C. The global map for traumatic spinal cord injury epidemiology: update 2011, global incidence rate. *Spinal Cord.* 2014, 52: 110–116. <https://doi.org/10.1038/sc.2012.158>.
 7. Lee H.J., Bian S., Jakovcevski I., Wu B., Irintchev A., Schachner M. Delayed applications of L1 and chondroitinase ABC promote recovery after spinal cord injury. *J. Neurotrauma.* 2012, 29: 1850–1863. <https://doi.org/10.1089/neu.2011.2290>.
 8. Mondello S.E., Jefferson S.C., Tester N.J., Howland D.R. Impact of treatment duration and lesion size on effectiveness of chondroitinase treatment post-SCI. *Exp. Neurol.* 2015, 267: 64–77. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.02.028>.
 9. Nazari-Robati M., Golestani A., Asadikaram G. Improvement of proteolytic and oxidative stability of chondroitinase ABC I by cosolvents. *Int. J. Biol. Macromol.* 2016, 91: 812–817. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.06.030>.
 10. Nazari-Robati M., Khajeh K., Aminian M., Fathi-Roudsari M., Golestani A. Cosolvent mediated thermal stabilization of chondroitinase ABC I form *Proteus vulgaris*. *Int. J. Biol. Macromol.* 2012, 50: 487–492. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.01.009>.
 11. Prabhakar V., Capila I., Bosques C.J., Pojasek K., Sasisekharan R. Chondroitinase ABC I from *Proteus vulgaris*: cloning, recombinant expression and active site identification. *Biochem. J.* 2005, 386 (1): 103-112. doi: 10.1042/BJ20041222.
 12. Raspa A., Bolla E., Cuscona C., Gelain F. Feasible stabilization of chondroitinase abc enables reduced astrogliosis in a chronic model of spinal cord injury. *CNS Neurosci. Ther.* 2019, 25: 86–100. <https://doi.org/10.1111/cns.12984>.
 13. Rosenzweig E.S., Salegio E.A., Liang J.J., Weber J.L., Weinholtz C.A., Brock J.H., Moseanko R., Hawbecker S., Pender R., Cruzen C.L., Iaci J.F., Caggiano A.O., Blight A.R., Haenzi B., Huie J.R., Havlon L.A., Nout-Lomas Y.S., Fawcett J.W., Ferguson A.R., Beattie M.S., Bresnahan J.C., Tuszynski, M.H. Chondroitinase improves anatomical and functional outcomes after primate spinal cord injury. *Nat. Neurosci.* 2019, 22: 1269-1275. <https://doi.org/10.1038/s 41593-019-0424-1>.
 14. Rossi F., Veglianese P., Santoro M., Papa, S., Rogora C., Dell'Oro V., Perale G. Sustained Delivery of Chondroitinase ABC from Hydrogel System. *Journal of Functional Biomaterials.* 2012, 3 (1): 199–208.
 15. Tkalec A.L., Fink D., Blain F., Zhang-Sun G., Laliberte M., Bennett D.C., Gu K., Zimmermann J.J., Su H. Isolation and expression in *Escherichia coli* of cslA and cslB, genes coding