

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ**

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

«До захисту в ЕК»
Директор інституту(декан факультету)
Наталія ГРЕГІРЧАК
(підпис) (ім'я та прізвище)

« » лютого 2022 р.

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

« » лютого 2022 р.

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ МАГІСТРА**

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код та назва спеціальності)
освітньо-професійної програми «Фармацевтична біотехнологія»

на тему: Досягнення біотехнології у виробництві лактулози

Виконав: здобувач ІІ курсу, групи 02

ПІДДУБНЯК Катерина Сергіївна
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник КАРЛАШ Юрій Васильович
(прізвище, ім'я та по батькові повністю) (підпис)

Консультанти
(ім'я та прізвище) (підпис)

(ім'я та прізвище) (підпис)

(ім'я та прізвище) (підпис)

Рецензент
(ім'я та прізвище) (підпис)

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

Здобувач _____
(підпис)

Київ – 2022 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

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

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

біотехнології і мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ

“ 03 ” листопада 2021 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

ПІДДУБНЯК Катерини Сергіївни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Досягнення біотехнології у виробництві лактулози
керівник роботи КАРЛАШ Юрій Васильович доц.,

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

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

2. Строк подання здобувачем роботи 1 лютого 2022 року

3. Вихідні дані до роботи Bacillus subtilis WB800, лактулоза, сироп лактулози

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити)
Особливості синтезу лактулози ; техніко-економічне обґрунтування випуску
субстанції для лікарського засобу (лз) та виробництва готової форми лз;
обґрунтування вибору технологічної схеми біосинтезу субстанції та
технологічної схеми виробництва лз; опис технологічного процесу
виробничого біосинтезу; опис технологічного процесу виділення та очищення
лактулози; опис технологічного процесу виробництва лз.

5. Перелік графічного матеріалу

Апаратурна схема – 4 аркуші А2, технологічна схема 4 аркуші А3

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 03 листопада 2021 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ п/п	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Особливості синтезу лактулози	03.11.2021 – 11.11.2021	
2	Техніко-економічне обґрунтування випуску субстанції для лікарського засобу (лз) та виробництва готової форми лз	11.11.2021- 21.11.2021	
3	Обґрунтування вибору технологічної схеми біосинтезу субстанції та технологічної схеми виробництва лз	21.11.2021- 01.12.2021	
4	Опис технологічного процесу виробничого біосинтезу	01.12.2021- 15.12.2021	
5	Опис технологічного процесу виділення та очищення лактулози	15.12.2021 - 24.12.2022	
6	Опис технологічного процесу виробництва лз	24.12.2022- 27.12.2022	

Здобувач

_____ (підпис)

Катерина ПІДДУБНЯК

_____ (ім'я та прізвище)

Керівник роботи

_____ (підпис)

Юрій КАРЛАШ

_____ (ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена розробленню технології виробництва лактулози за допомогою ферменту целобіозо-2-епімерази з *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* (CsCE), ген якого був експресований у *Bacillus subtilis* WB800, що синтезує 4,5 Од/мл ферменту за 16 год з подальшим його використанням для біоконверсії лактози порошку молочної сироватки в лактулозу. Розрахована потужність виробництва лактулози складає – 56 т/рік.

Технологічний процес включає допоміжні роботи та технологічний процес - вирощування посівного матеріалу: в колбах на качалці і виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 30 л для отримання фермента целобіозо-2-епімерази та біоконверсію лактози порошку молочної сироватки в ферментері об'ємом 1,25 м³ з ультрафільтраційним модулем для виділення лактулози з культуральної рідини. Особливості процесу культивування: температура 32⁰С, рН 7,0, тривалість – 26 год. Біоконверсія лактози проходить при температурі 70⁰С, тривалість – 26 год, кількість циклів біоконверсії -10. Етап очищення лактулози включає наступні технологічні процеси: концентрування розчину лактулози до концентрації 40%; процес сушіння; фасування, пакування та маркування цільового продукту.

Етап виготовлення ГЛЗ (сиропу з лактулозою) включає допоміжні роботи: (підготовка вентиляційного повітря, підготовка води) та технологічний процес (попереднє розчинення компонентів сиропу; варка сиропу; фільтрування сиропу; наповнення флаконів готовим сиропом; пакування флаконів у вторинну упаковку).

Робота викладена на 172 сторінках друкованого тексту, містить таблиці, рисунки і складається зі вступу, 6 розділів, списку використаної літератури (126 джерел) та графічної частини.

Ключові слова: *Bacillus subtilis* WB800, *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* (CsCE), лактулоза, фермент, целобіозо-2-епімераза, лікарський засіб, біосинтез, біоконверсія.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	5
ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД	
РОЗДІЛ 1 .ОСОБЛИВОСТІ СИНТЕЗУ ЛАКТУЛОЗИ.....	6
ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА	
РОЗДІЛ 2. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ВИПУСКУ СУБСТАНЦІЇ ДЛЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ (ЛЗ) ТА ВИРОБНИЦТВА ГОТОВОЇ ФОРМИ ЛЗ.....	43
2.1. Передумови виробництва ЛЗ... ..	43
2.1.1.Аналіз фармакологічних властивостей цільового ЛЗ, галузей використання.....	45
2.1.2.Обсяг ринку та очікувані темпи його розвитку.....	52
2.1.3.Вибір форми випуску лікарського засобу.	53
2.1.4. Опис лікарського засобу згідно АНД (проект АНД).....	55
2.1.5. Розрахунок річної потужності виробництва ЛЗ та кількості серій на рік.....	73
2.2.Розрахунок потреби у субстанції для випуску ЛЗ.....	74
2.2.1.Перелік виробників кінцевого продукту і виробників (постачальників) субстанції.....	75
2.2.2.Розрахунок річної потужності виробництва субстанції, об'єму ферментера та кількості виробничих циклів.....	76
РОЗДІЛ 3. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ СУБСТАНЦІЇ ТА ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА ЛЗ.....	82
3.1. Обґрунтування вибору біологічного агенту, поживного середовища для його культивування.....	82
3.2. Обґрунтування вибору способу культивування і типу ферментера	91
3.3.Обґрунтування стадій виділення і очищення субстанції для виробництва ЛЗ.....	93

3.4. Обґрунтування вибору класів чистоти виробничих приміщень виробництва ЛЗ (підготовки персоналу, дезінфікуючих засобів, вентиляційного повітря), вибору первинної упаковки ЛЗ та її підготовки...	104
--	-----

РОЗДІЛ 4. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ	122
4.1. Специфікація обладнання ділянки виробничого біосинтезу.....	122
4.2. Опис технологічної схеми виробничого біосинтезу.....	124
4.3. Контроль ділянки біосинтезу.....	130

РОЗДІЛ 5. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ ЛАКТУЛОЗИ	140
5.1. Специфікація обладнання ділянки виділення та очищення лактулози.....	140
5.2. Опис технологічної схеми виділення та очищення лактулози.....	141
5.3. Контроль ділянки виділення та очищення лактулози.....	144

РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ ВИРОБНИЦТВА ЛЗ ..	150
6.1. Специфікація обладнання ділянки виробництва ЛЗ.....	150
6.2. Опис технологічного процесу виробництва ЛЗ.....	151

ВИСНОВКИ	156
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	157

ВСТУП

Лактулоза (4-О-β-D-галактопіранозил-D-фруктофураноза) - це дисахарид, що складається з галактози та фруктози, з'єднаних між собою β-1,4-глікозидним зв'язком. В останні роки лактулозі приділяється особлива увага через її широке використання в харчовій галузі, фармацевтичній промисловості та секторах кормів для тварин.

Лактулоза має кілька застосувань для лікування хронічних закрепів, енцефалопатії, гіперамонемії. Як пребіотичний вуглевод, він може сприяти росту деяких корисних для здоров'я бактерій у шлунково-кишковому тракті, таких як біфідобактерії та лактобактерії, та інгібувати патогенні бактерії, такі як сальмонела.

Лактулозу можна синтезувати за допомогою хімічних чи ферментативних методів. Хімічні каталізатори (такі як борна кислота, карбонат кальцію тощо) можуть підвищити ефективність за рахунок збільшення швидкості ізомеризації. Однак використання сильного луку і борної кислоти може призвести до утворення побічних продуктів і коричневого кольору, що додає величезної складності етапам виділення та очищення продуктів, а також збільшує виробничі витрати та поживання енергії. Ці проблеми обмежують розвиток хімічного синтезу для виробництва лактулози, тому бажаним є використання ферментів для біоконверсії отримання лактулози

Новизна роботи: Розробка біотехнології отримання лактулози для виробництва лікарських препаратів, що використовуються для лікування гастроентерологічних захворювань є актуальним завданням на сьогоднішній день. Новий спосіб отримання лактулози за допомогою фермента целобіозо-2-епімерази з *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* (CsCE), ген якого був експресований у штамі *Bacillus subtilis* WB800.

					НУХТ БТЕК 02.02.08 КР ПЗ						
Змн.	Лист	Л	№ докум.	№	Підпис	Пі	Дата				
Розроб.		Піддубняк					РОЗДІЛ 1. ОСОБЛИВОСТІ СИНТЕЗУ ЛАКТУЛОЗИ		Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Карлаш								7	17
Консультант						Кафедра БТМ					
Н. Контр. Н.											
Затверд.Затве		Стабніков В.П.									

ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

РОЗДІЛ 1. ОСОБЛИВОСТІ СИНТЕЗУ ЛАКТУЛОЗИ

Лактулоза (4-0- β -D-галактопіранозил-D-фруктофураноза) – синтетичний дисахарид, що складається з молекул фруктози та галактози, зв'язаних β -1,4-глікозидним зв'язком

Лактулоза у 1,5 рази солодша за лактозу, може кристалізуватися із спиртового розчину. β -глікозидний зв'язок лактулози не гідролізується травними ферментами ссавців, тому при потраплянні в організм лактулоза проходить крізь шлунок і тонкий кишечник без деградації. Лактулоза ефективно споживається усіма видами біфідобактерій, які проживають в кишковому тракті людини.

У товстому кишечнику велика кількість бактерій метаболізує лактулозу, при цьому виробляючи молочну, оцтову та мурашину кислоти, і також вуглекислий газ. Ці кислоти забирають рідину в кишечник, тим самим пом'якшуючи стул, отже, лактулозу використовують як проносне.

Лактулоза має пребіотичні властивості, оскільки стимулює рост корисних бактерій в шлунково-кишковому тракті, таких як біфідобактерії (*Bifidobacteria bifidum*, *Bifidobacterialongum*, *Bifidobacteriainfantilis*, *Bifidobacteria adolescentis*) та лактобактерії (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus bulgaricus* та ін.) та в той же час пригнічує патогенні бактерії [1].

Окрім пребіотичної дії, лактулоза має багато інших ефектів, таких як посилення поглинання мінеральних речовин, вплив на кістки, зниження глюкози в крові, гіпохолестеринемічний ефект, профілактика інфекцій сечовивідних шляхів [2].

Лактулоза також застосовується для лікування системної енцефалопатії та гіперамонемії [3], профілактики пухлин, а також для підтримки рівня

					НУХТ БТЕК 02.02.08 КР ПЗ						
Змн.	ЛистЛ	№ докум.№	ПідписПі	Дата							
Розроб.	Піддубняк				РОЗДІЛ 1. ОСОБЛИВОСТІ СИНТЕЗУ ЛАКТУЛОЗИ			Літ.	Арк.	Акрушів	
Перевір.	Карлаш									8	36
Консультант								8			
Н. Контр. Н.								Кафедра БТМ			
Затверд.Затве	Стабніков В.П.										

глюкози та інсуліну в крові [4].

У харчовій промисловості лактулоза широко використовується як функціональний інгредієнт та біфідус фактор. Зокрема, лактулозу додають до дитячих сумішей для відтворення пребіотичного ефекту жіночого молока [2].

1.1. Синтез лактулози шляхом ізомеризації лактози з використанням каталізаторів

Лактулозу можна отримати шляхом ізомеризації лактози (рис. 1.1) шляхом перегрупування залишку глюкози до молекули фруктози. Велика кількість реагентів може бути використаний в якості каталізатора для ізомеризації лактози до лактулози. Каталізатор повинен мати такі властивості, як низька вартість, простота у використанні та видаленні із середовища, екологічна безпека, не токсичність [1].

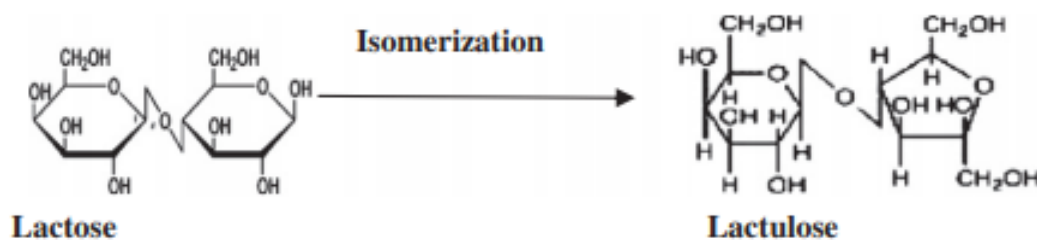


Рис. 1.1. Схема ізомеризації лактози у лактулозу

Багато вчених досліджують синтез лактулози з використанням різних технологій, наприклад, технології електроактивації [5-10], мікрохвильового нагрівання [11], та хімічних каталізаторів, таких як 3-(тригідроксигерміл)-пропанова кислота [12], алюмінат натрію [13], водний етанол [14], гідроксид натрію [15-16, 19-20, 23], карбонат натрію [17], карбонат амонію [18], свержстиий полістирол і модифікованого борною кислотою оксид заліза [21-22].

Вчені на чолі з Karim [5] використали сироватковий пермеат як субстрат для отримання лактулози шляхом ізомеризації лактози, присутньої в ньому, в лужних умовах. Було отримано лактулозу з використанням технології електроактивації (ЕА) та порівняно продуктивність ЕА із звичайною хімічною ізомеризацією з додаванням гідроксиду калію (KOH). Лактулозу

традиційно синтезують хімічною ізомеризацією лактози в сильнолужних умовах, що потребує тепла та каталізаторів. Цей процес, як правило, є дорогим через низьку ефективність процесу. Подолати незручності процесу хімічної ізомеризації лактози в лактулозу можна за допомогою електроактивації.

Реакція електролізу води поєднана з адекватно розміщеними іонообмінними мембранами дозволяє створити сильні лужні умови без використання хімічних каталізаторів. Електроізомеризацію проводили при різній інтенсивності струму 300, 600 і 900 мА протягом 60 хв з 5-хвилинним інтервалом, використовуючи 6, 12 та 18% розчини сироваткового пермеату. Результати дослідження показали, що синтез лактулози з використанням ЕА є набагато ефективнішим за хімічну ізомеризацію, при цьому вихід лактулози становить 36% (при чистоті 98%) за 50 хв ЕА при інтенсивності струму 900 мА, використовуючи 6% розчин сироваткового пермеату як субстрат, тоді як максимальний вихід лактулози - 25,47% був досягнутий при хімічній ізомеризації.

Також цими вченими [6] було застосовано метод ЕА для ізомеризації лактози в лактулозу в реакторі електроактивації, модульованому аніоно- і катіонообмінними мембранами. Досліджувався вплив концентрації лактози (5, 10, 15 та 20%), електричного поля (300, 600 і 900 мА), а також час реакції (0-60 хв) на швидкість електроізомеризації лактози (утворення лактулози) та утворення побічного продукту (глюкоза, галактоза, та фруктоза).

Встановлено, що найвищий вихід лактулози складав 38% за 40 хв ізомеризації з використанням інтенсивності струму 900 мА в 10% розчині лактози. Отже, за допомогою електроактивації було досягнуто більш високого виходу лактулози протягом короткого часу реакції порівняно з хімічною ізомеризацією (27% лактулози за 60 хв).

Aider зі співавторами [7] також вивчали вплив концентрації лактози (5 і 10%) та прикладеного постійного електричного поля (100 і 200 мА) на електроізомеризацію лактози у лактулозу. Молочний сироватковий пермеат

(містить $4,7 \pm 0,15\%$ лактози), отриманий ультрафільтрацією, використовувався як субстрат в реакторі електроактивації. В результаті через 60 хв електроактивації при температурі $23 \pm 1^\circ\text{C}$, концентрації лактози 5% та електричному струмі 200 мА отримано 25% лактулози. Чистота лактулози становила $96,28 \pm 0,18\%$, що відповідає фармакопейним вимогам. Серед побічних продуктів утворювалася незначна кількість галактози (1,5%) та фруктози (0,31%), епілактоза не утворювалася.

Науковці з Канади [8] провели дослідження синтезу лактулози за допомогою електроактивації. Експерименти проводили при температурі навколишнього середовища ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), а вихідну концентрацію лактози постійно підтримували на рівні 5% (мас./Об.). ВЕРХ використовували для дослідження утворення дисахаридів (лактуюлози та лактози) та побічних продуктів виробництва лактулози (глюкоза, галактоза та фруктоза) за різних експериментальних умов, таких як різниця електричного потенціалу, концентрація електроліту в центрі клітини та час електроактивації. Встановлено, що найвищий вихід лактулози становив 30% при напрузі 28 В, концентрації електроліту $C_{\text{Na}_2\text{SO}_4} = 0,5 \text{ М}$, температурі 26°C , рН середовища 10,79 і тривалості 20 хв.

Незначну кількість побічного продукту - галактози - отримували в слаболужному середовищі, що має рН 9,84–11,77 при температурі 22–32 $^\circ\text{C}$, тоді як у лужному середовищі з рН 11,77–12,18 і при температурі 32–43 $^\circ\text{C}$ утворювалося значно більше галактози, а ери рН 12,39–12,75 та температурі 52–87 $^\circ\text{C}$ утворювалося багато глюкози та фруктози.

Пізніше ці вчені [9] провели багатфакторний експеримент для вивчення впливу температури (0, 10, 20 $^\circ\text{C}$), конфігурації реактора та електричного струму (100, 200, 300 мА) на перетворення лактози в лактулозу в реакторі з електроактивацією. Встановлено, що оптимальним за конфігурацією є реактор, який містить катіонообмінну мембрану МС-40, що розділяє центральний відсік від катодного відсіку, в якому проходить реакція

електроізомеризації. Відповідно до оптимізованих умов лактоза перетворювалася в лактулозу на рівні $30,19 \pm 1,37\%$ через 30 хв електроактивації при 200 мА та при 10 °С; вихід галактози не перевищував 6% від загального виходу. При чому утворення галактози зменшилось при зниженні температури електроізомеризації до 0 °С.

Також цими дослідниками [10] було проведено синтез лактулози ізомеризацією лактози з використанням реактору електроактивації, в якому лужні умови контролювались за допомогою іонообмінної мембрани в прохолодних умовах. На відміну від отримання лактулози хімічними методами; які представляють багато проблем при очищенні лактулози, електроактивація - це дуже чистий, безпечний та екологічний електромембранний метод отримання лактулози. Реактор електроактивації являє собою реактор, розділений на 3 відсіки – катодний, анодний та центральний. Катодний відсік заповнювали 60 мл розчину лактози і 0,05 М/л хлориду натрію, який використовується для забезпечення проходження струму. Анодний і центральні відсіки заповнювали електролітом (Na_2SO_4 , 0,3 М/л). Центральний відсік з'єднаний з анодним і катодним відсіком через аніоно- і катіонообмінну мембрани відповідно.

У даній роботі досліджувався вплив числа Фруда (Fr), робочої температури (0, 5, 10, 15, 20, 30° С) та концентрації лактози (5, 10, 15, 20%) на вихід лактулози. Встановлено, що найвищий вихід лактулози становить $25 \pm 1,28\%$ з чистотою $95 \pm 1,34\%$ при $\text{Fr} = 2,05 \cdot 10^{-2}$, температурі 0 - 10 ° С, концентрації лактози 10%, часу реакції 2 хвилини, рН = 10,30, силі струму 4,86 мА / см² та напрузі 30 В.

Однак, звичайний процес ізомеризації лактози до лактулози є трудомістким та енергоємним, тому було знайдено альтернативу та додатковий шлях швидкої ізомеризації лактози до лактулози за допомогою мікрохвильового нагрівання.

Nooshkam зі співавт. [11] здійснили ізомеризацію лактози до лактулози шляхом мікрохвильового нагрівання та здійснили очистку лактулози за

допомогою метанольної процедури. Синтез проводили, використовуючи як субстрат розчин лактози (40 г/л), рН 9, колбу з розчином герметично закривали і поміщали в мікрохвильову піч і опромінювали 2450 МГц, потужність 600 Вт протягом 50 та 60 с. Вихід лактулози склав 10,7 та 10,89 % відповідно. Очищення лактулози проводили наступним чином: ізомеризований розчин сушили на роторному вакуумному випарнику при 50 °С, а потім переносили змішували з 10 мл метанолу, перемішували в інкубаційному шейкері при 150 об/хв і 30 °С 48 год, потім витримували протягом 24 годин без струшування і кристалізовану лактозу відокремлювали центрифугуванням, а метанол випаровували нагріванням під вакуумом. Після очистки було отримано лактулозо-збагачений продукт з вмістом лактулози приблизно 72%.

Менше 25% лактози перетворюється в лактулозу за допомогою трансформації при нагріванні, тоді як конверсія збільшується до 80% за рахунок додавання приблизно еквімолярної концентрації органогерманового з'єднання 3-(тригідроксигерміл)-пропанової кислоти (THGP) до реакційної суміші. Nagasawa зі співавт. [12] у своєму дослідженні проаналізували та встановили спорідненість між THGP та ізомерами цукру, використовуючи ¹H ядерну магнітно-резонансну спектроскопію. Вихід лактулози збільшується з 24% до 80% при додаванні THGP до реакційної суміші при молярному співвідношенні лактози до THGP 0,9 та більше. Встановлено, що THGP захищає лактулозу від лужної деградації, що призводить до високого виходу лактулози.

У статті [13] було описано ефективну стратегію синтезу лактулози високої чистоти (95%) шляхом хімічної ізомеризації лактози з використанням каталізатора алюмінату натрію. При цьому максимальний вихід лактулози ($85,45 \pm 1,79\%$) був отриманий з 35% (мас./об.) лактози.

Нова технологія синтезу лактулози - обробка лактози водним етанолом. У цьому методі використовується суміш етанол-вода під тиском при температурі між звичайною температурою кипіння і критичною

температурою. Даний спосіб має ряд переваг, таких як одномоментне виконання та використання нескладної реакторної системи. Крім того, відновлення каталізатора після обробки не є необхідним, а видалення етанолу здійснюється простим випаровуванням. Водний етанол може виступати як ефективний розчинник, так і каталізатор.

У роботі [14] розповідається про те, що лактулоза може бути отримана з високою продуктивністю шляхом ізомеризації лактози у водному етанолі. Максимальний вихід лактулози (34%) був отриманий при обробці лактози 60% (мас./мас.) водним етанолом при 200 °C.

Nahla зі співавт. [15] синтезували лактулозу у присутності гідроксиду натрію в якості каталізатора. Оцінку синтезу лактулози проводили при різних концентраціях натрію гідроксиду (1, 2 та 3 М), і при різних температурах (30, 50, 70 та 90 ° C). Було зроблено висновок, що максимальний вихід лактулози становить приблизно 30,9% при 90 °C у присутності 1М гідроксиду натрію і 20% концентрації лактози.

Hashemi зі співавт. [16] дослідити кінетику ізомеризації лактози у лактулозу у присутності гідроксиду натрію при постійному та змінному рН. Експерименти проводили при трьох температурах (50, 60 та 70°C) та трьох значеннях рН (10, 10,5 та 11). Було досліджено вплив різних параметрів, таких як температура, рН і час на швидкість реакції та конверсію лактози в лактулозу. Вихідна концентрація лактози у середовищі складала 10%. Встановлено, що при збільшенні температури та рН вихід лактулози збільшується, при чому температура має більший вплив на вихід лактулози. При змінному значенні рН максимальна конверсія лактози у лактулозу складала 25,4% за 60 хв при рН 11 та температурі 70°C, а при постійному значенні рН максимальна конверсія лактози у лактулози дорівнювала 27,9% за 10 хв при рН 11 та температурі 70°C.

Seo зі співавт. [17] було розроблено економічний метод отримання лактулози з сирної сироватки із застосуванням карбонату натрію. Було визначено вплив трьох параметрів, таких як температура (60, 90, 120 °C), час

реакції (10, 20, 30 хв) та концентрація карбонату натрію (0,1%, 0,5%, 1%), на вихід лактулози. Максимальний вихід лактулози - 29,6% (8 г/л) - було отримано при часі реакції 20,41 хв, концентрації карбонату натрію 0,51% та при температурі 90 °С. Щоб подолати обмеження синтезу лактулози через перетворення лактулози в галактозу, здійснювали процес синтезу з підживленням, додаючи кожні 30 хв висушену сирну сироватку як джерело лактози. За допомогою даного режиму обмеження синтезу було подолано, і за годину утворювалося 15,8 г/л лактулози, а через 90 хв – приблизно 23 г/л, в той час як вихід галактози становив приблизно 10%, як і при періодичному способі.

У хімічному синтезу лактулози переважно використовуються гідроксид кальцію, гідроксид натрію та карбонат кальцію як каталізатори. Ці реагенти ефективні, проте їх потрібно спочатку видалити перед очищенням лактулози, що призводить до складності та збільшення вартості процесу очищення. Карбонат амонію може бути одним з альтернативних каталізаторів. Він має каталітичну активність, порівнянну з вищезазначеними хімічними речовинами, але він розкладається до NH_3 та CO_2 при низькій температурі ($> 58^\circ\text{C}$), завдяки чому крок видалення каталізатору непотрібний. До того ж оскільки ці два гази можуть бути легко захоплені та використані повторно, собівартість лактулози може бути значно знижена.

Seota співавт. [18] використовували карбонат амонію $((\text{NH}_4)_2\text{CO}_3)$ як лужний каталізатор для отримання лактулози з сирної сироватки. Максимальний вихід лактулози - 29,6% - був отриманий за 28,44 хв, при додаванні 0,76% $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ при 97°C .

Існує великий інтерес у розробці придатних альтернатив утилізації сирної сироватки - побічного продукту виробництва сиру, що містить високу концентрацію лактози. Перспективною альтернативою є використання сироватки для утворення нових продуктів, наприклад лактулози, тим самим зменшуючи викиди сироватки у навколишнє середовище.

Awad зі співавт. [19] обробляли пермеат для збільшення синтезу лактулози шляхом процесу ізомеризації лактози. Пермеат поміщали в круглодонну колбу, додавали гідроксид натрію при перемішуванні, поки значення рН не досягло 11. У цей момент в якості каталізатора додавали 40 г/л порошку ячної шкаралупи. Колбу, що містить пермеат та порошок ячної шкаралупи, занурювали у водяну баню при 70 °С на 3 години з періодичним перемішуванням. Через годину додавали 3% порошку активованого вугілля і залишають у суміші до кінця процесу ізомеризації на 2 години до зміни кольору. Отриманий пермеат, збагачений лактулозою, використовували для отримання йогурту. Встановлено, що кількість пробіотичних бактерій у йогурті, отриманому з пермеату, збагаченого лактулозою, була вищою.

Вчені на чолі з Zimmer [20] проводили дослідження з метою оптимізації синтезу лактулози з пермеату молочної сироватки. Було досліджено ефект двох параметрів - часу реакції (90, 135 та 180 хв) та спосіб ізомеризації лактози (перший спосіб - за допомогою сульфіту натрію та гідроксиду натрію у концентрації 10%, рН 11, температура 70°C; другий спосіб – з використанням борної кислоти та триетиламіну, рН 11, температура 70°C; третій спосіб – за допомогою ферменту β -галактозидази *Kluyveromyces fragilis*, температура 35-37°C), на вихід лактулози. Визначено, що найкращі експериментальні умови синтезу лактулози (50,06 г лактулози на 100 г сироватки) включали час реакції 180 хв з використання ферментативної ізомеризації. В той час найнижчі концентрації лактулози отримували при ізомеризації за допомогою борної кислоти (3,46-3,9 г лактулози на 100 г сироватки за 90 хв, 6,34-6,39 г лактулози на 100 г сироватки за 180 хв).

У статтях Сульманта співавт. [21, 22] описано синтез лактулози шляхом ізомеризації лактози з використанням каталізаторів на основі модифікованого борною кислотою свержзшитого полістиролу (СПС) і модифікованого борною кислотою оксиду заліза (III). Висока селективність по відношенню до лактулози 78% при конверсії лактози 74% може бути досягнута за таких умов реакції: початкова концентрація лактози - 0,3 моль/л,

температура реакції - 70 ° С, концентрація каталізатора - 0,1 моль/л і рН = 11. Також встановлено, що селективність процесу ізомеризації лактози може бути поліпшена шляхом зниження температури реакції до 70 °С і рН до 11, оскільки більш висока температура і більш високий рН збільшують гідроліз лактози і лактулози, сприяючи утворення побічних продуктів.

У роботі Бугаєвої та співавт. [23] було використано пермеат молочної сироватки для утворення лактулози. Вивчено вплив концентрації гідроксиду натрію на рН пермеату молочної сироватки та встановлено, що оптимальною дозою гідроксиду натрію є 1,2 – 1,4 %. Також встановлено оптимальні параметри процесу ізомеризації лактози в лактулозу. Підвищення температури до 75⁰С призводить до збільшення утворення лактулози.

Вчені на чолі з Храмцовим [24] вивчили закономірності ізомеризації лактози в лактулозу в молочій сироватці та встановили оптимальні параметри отримання пребіотичних концентратів. Було встановлено оптимальні параметри (температура (76,5 ± 1,5) °С, тривалість (16,5 ± 1,5) хвилини), які забезпечують ступінь ізомеризації лактози на рівні 34-36% (масова частка лактулози 6,5-7,0%) при незначному утворенні продуктів побічних реакцій.

Узагальнені дані щодо хімічного синтезу лактулози наведено у *табл. 1.1*.

Таблиця 1.1

Синтез лактулози шляхом ізомеризації лактози з використанням каталізаторів

Каталізатор	Субстрат	Параметри процесу	Вихід лактулози, %	Література
Технологія електроактивації	6% розчин сироваткового пермеату	50 хв, інтенсивність струму 900 мА	36,98	[5]
	10% розчин лактози	40 хв, інтенсивність струму 900 мА	38,0	[6]
	Лактоза 5%	60 хв, 23 ± 1 °С, інтенсивність струму 200 мА	25,0	[7]

	Лактоза 5% (мас./об.)	Напруга 28 В, концентрація електроліту $C_{Na_2SO_4} = 0,5$ М, температура 26 °С, рН 10,79, 20 хв	30	[8]
	Лактоза	30 хв, інтенсивність струму 200 мА, 10 °С	$30,19 \pm 1,37$	[9]
	Лактоза 10%	Число Фруда $Fr = 2,05 \cdot 10^{-2}$, температура 0 - 10 °С, 2 хв, рН = 10,30, сила струму 4,86 мА/см ² , напруга 30 В	$25 \pm 1,28$	[10]
Мікрохвильове нагрівання	Розчин лактози (40 г/л)	рН 9, опромінення 2450 МГц, потужність 600 Вт протягом 50 та 60 с.	10,7 та 10,89 відповідно	[11]
3-(тригідроксигерміл)-пропанова кислота (THGP)	Лактоза	Молярне співвідношення лактози до THGP 0,9	80	[12]
Алюмінат натрію	35% лактози	t=60°C, рН 12, 50 хв	$85,45 \pm 1,79$	[13]
Водний етанол (40%)	Лактоза 60% (мас./мас.)	200 °С	34	[14]
Гідроксид натрію	Лактоза 20%	90 °С, 1М гідроксиду натрію	30,9	[15]
Гідроксид натрію	Лактоза 10%	При змінному рН - 60 хв, 70°C	25,4	[16]
		При постійному значенні рН - 10 хв, при рН 11 та температурі 70°C	27,9	
Карбонат натрію	Підсирна сироватка	Періодичне культивування, 20,41 хв, концентрація карбонату натрію 0,51%, температура 90 °С	29,6% (8 г/л)	[17]
		Культивування з підживленням, подаючи кожні 30 хв висушену сирну сироватку як джерело лактози	60 хв -15,8 г/л, 90 хв –23 г/л	
Карбонат амонію	Сирна сироватка	28,44 хв, концентрація $(NH_4)_2CO_3$ 0,76%, 97 °С	29,6%	[18]
β -галактозидаза <i>Kluyveromyces lactis</i>	Пермеат підсирної сироватки	180 хв, 35-37°C	50,06 г лактулози на 100 г	[20]

			сироватки	
--	--	--	-----------	--

Отже, за допомогою хімічного синтезу отримують лактулозу у порівняно невисоких концентраціях (в середньому 25-35%). Найбільший вихід лактулози можна отримати при використанні в якості каталізаторів 3-(тригідроксигерміл)-пропанової кислоти та алюмінату натрію (80 та 85% відповідно).

1.2. Отримання лактулози біотехнологічним способом

Однак сучасні дослідження переважно направлені на ферментативний синтез лактулози, оскільки хімічний синтез має ряд недоліків, таких як необхідність використання високих концентрацій каталізатора, субстратів високої чистоти, необхідність суворих умов реакції, утворення небажаних побічних сполук [4]. До того ж ензимний процес біоконверсії надає можливість більш легкого очищення продукту.

Panesar зі співавт. [1] порівняли та проаналізували виробництво, очищення та потенційне застосування лактулози. Встановлено, що отримання лактулози за допомогою ензиматичного синтезу з використанням ферментів мікроорганізмів (наприклад, β -галактозидази *Saccharomyces fragilis*, *Aspergillus oryzae*, *Sulfolobussol fataricus*, пермеабілізованих клітин *Kluyveromyces lactis*, іммобілізованої термостабільної β -глюкозидази *Pyrococcus furiosusa*) є більш перспективним, а ніж хімічний синтез з використанням хімічних каталізаторів, оскільки є менш трудомістким та більш високопродуктивним.

1.2.1. Синтез лактулози з використанням ферменту β -галактозидази

Лактулозу часто синтезують за допомогою реакції транс-галактозилювання з лактози та фруктози, каталізованої β -галактозидазою, де фруктоза діє як акцептор, а лактоза діє як донор і акцептор галактозильної групи, тому супутнє утворення трансгалактозильованих олігосахаридів (TOS), а саме галактоолігосахаридів (GOS) та фруктозил-галакто-

олігосахаридів (fGOS), неминуче, що є суттєвим недоліком використання β -галактозидази [4].

Вченими запропоновано різні стратегії збільшення виходу лактулози, такі як використання біферментативних систем з β -галактозидазою та глюкозоізомеразою, використання мембранних реакторів для безперервного синтезу [39], іммобілізація ферментів [26, 31-38, 44]. Також проводять синтез лактулози у режимі з підживленням або у безперервному режимі [29, 47] оскільки періодичний синтез має ряд недоліків, таких як використання великої кількості ферменту та необхідність у припиненні реакції в дуже точний момент до того, як гідроліз набере силу.

У статті DeAlbuquerque та співавт. [25] було встановлено оптимальні умови ферментативного синтезу лактулози за допомогою β -галактозидази *Kluyveromyces lactis* з використанням підсирної сироватки як субстрату. Оптимальними умовами для виробництва лактулози є наступні: співвідношення лактоза/фруктоза 15/30 % (мас./об) (66.6 г/л лактози та 133.3 г/л фруктози); загальна початкова концентрація лактози та фруктози 200 г/л; температура 50 °С, рН 7. При додаванні 0,01% мас./об. Mg^{2+} спостерігається максимальний вихід лактулози 22,6 г/л за 2 год реакції. Також було досліджено синтез лактулози за допомогою β -галактозидази, іммобілізованої на хітозані, з використанням підсирної сироватки та фруктози в якості субстрату. При даних умовах отримано 17,3 г/л лактулози (86% конверсії лактози).

У роботі De Freitas та співавт. [26] було отримано β -галактозидазу дріжджами *Kluyveromyces lactis* NRRL Y1564 в підсирній сироватці, доповненій дріжджовим екстрактом при оптимальній температурі 30 °С, при цьому ферментативна активність складала 4418,37 Од/г клітин через 12 год біосинтезу.

Отриманий фермент іммобілізували на 2,0 % хітозану та активували глутаральдегідом (0,8%) та використовували у синтезі лактулози. Встановлено, що при використанні даного ферменту в іммобілізованому

вигляді, було отримано вищий ступінь конверсії лактози у лактулозу, який становив 42,8% (17,32 г/л лактулози) проти 38% для вільного ферменту. Було також підібрано оптимальні умови синтезу (40⁰С та рН 7).

Німецькими науковцями [27] було розроблено технологію синтезу лактулози у паралельних маломасштабних ферментативних мембранних реакторах з використанням β -галактозидази *Kluyveromyces lactis*. Перевагою даних реакторів є те, що при безперервному синтезі відбувається безперервне видалення утвореної лактулози, що обмежує деградацію лактулози, спричинену вторинним гідролізом, тому вдається отримати значно більше цільового продукту, ніж при періодичному процесі. Також встановлено, що під час безперервного процесу на вихід лактулози впливає час гідравлічного утримання (ЧГУ) – вихід лактулози вищий при ЧГУ 7 годин та складає 12 г/л.

Китайські вчені досліджували процес синтезу лактулози з використанням β -галактозидази *Kluyveromyces lactis* у присутності фруктози [28]. Синтез проводили при 40 °С, рН 7,5 та постійній вихідній концентрації лактози 250 г/л. Проводили визначення оптимальної концентрації фруктози. Встановлено, що при концентрації фруктози 100 г/л спостерігається максимальний вихід 1-лактюлози та лактулози, що становить 22 та 8 г/л відповідно.

Науковці на чолі з Song [29] у своєму дослідженні проводили синтез лактулози із сироваткової лактози в періодичному та безперервному режимах з використанням іммобілізованої β -галактозидази *Kluyveromyces lactis*. Встановлено, що у безперервному режимі з використанням 20 г іммобілізованої β -галактозидази при температурі 47 °С зі швидкістю потоку 0,5 мл/хв вдається отримати вищий вихід лактулози (19,1 г/л). Крім того, можливе повторне використання іммобілізованої β -галактозидази для синтезу лактулози, оскільки її каталітична активність зберігалася до 52,9% після 10 процесів ферментації.

Вчені на чолі з Khatami [30] вивчали синтез лактулози з використанням β -галактозидази *Kluyveromyces lactis* у водних та нетрадиційних середовищах. Переваги здійснення ферментативного синтезу лактулози в органічних розчинниках: підвищена розчинність неполярних субстратів та продуктів, що помітно прискорює загальну швидкість реакції; зміна термодинамічної рівноваги на користь синтезу над гідролізом, що дозволяє проведення реакцій, які як правило, не сприятливі у водних розчинах; зміна енантіоселективності ферменту. Результати показали значний вплив як рівня лактози, так і фруктози, а також їх взаємодії на швидкість утворення лактулози. Максимальна швидкість синтезу лактулози була отримана при концентрації фруктози та лактози 25-30% та 9-12% відповідно, вихід лактулози склав 8 г/л за 90 хв. Також встановлено, що додавання ацетону мало негативний ефект на синтез лактулози, тоді як додавання триетилфосфату у концентрації 30% при концентрації фруктози 30% та лактози 10% спричинило збільшення синтезу лактулози на 20%, вихід якої склав 10,4 г/л через 150 хв.

Застосування іммобілізованих ферментів дозволяє краще контролювати умови реакції, забезпечує більшу гнучкість в конструкції реактора, полегшує очищення продукту і, крім того, збільшує ефективність використання біокатализатора, дозволяючи тривалу експлуатацію, також іммобілізація зазвичай призводить до значного збільшення стабільності ферментів.

Стаття Guerrero та співавт. [31] описує синтез лактулози іммобілізованою β -галактозидазою *Aspergillus oryzae* з різними агарозними носіями в періодичному режимі. Синтез лактулози проводили з використанням β -галактозидази, іммобілізованої у гліюксил-агарозі (GA- β G), аміногліюксил-агарозі (Am-GA1- β G) та хелат-гліюксил-агарозі (Che-GA- β G), при мольних співвідношеннях фруктоза/лактоза 4, 12 і 20, при температурі 50°C, pH 4.5. Встановлено, що найвищий вихід лактулози у періодичному режимі був отриманий з використанням носія Che-GA- β G, та становив 0,21, 0,29 і 0,32 г/г для мольних співвідношень фруктоза/лактоза 4, 12 та 20 відповідно. В той

час як при здійсненні 10 повторних процесів біокаталізу найвищі масові співвідношення продукту до біокаталізатора були отримані з використанням носія Am-GA- β G (1,82, 2,52 та 2,7 г/мг).

Ці ж вчені [32] описали отримання лактулози за допомогою іммобілізованої β -галактозидази *Aspergillus oryzae* на моно- та гетерофункціональних агарозних носіях (аміно-гліюксил, карбокси-гліюксил та хелат-гліюксил-агарозі). Встановлено, що найвищий вихід продукту був отриманий з використанням монофункціональної гліюксилагарози як носія. Синтез лактулози проводили в 100 мл колбах при 50 ° С, рН 4,5, 50% початковій концентрації цукрів, та молярних співвідношеннях фруктози та лактози 1, 4, 8, 12 і 16. У результаті було визначено, що вихід лактулози (г/г) збільшується (до 0,3 г/г) зі зростанням молярного співвідношення даних цукрів.

Пізніше цими вченими [33] було досліджено синтез лактулози з фруктози та лактози в безперервному режимі у реакторі з насадками (CPBR) з іммобілізованою на гліюксил-агарозі β -галактозидазою *Aspergillus oryzae*. Встановлено, що найвищий вихід лактулози становив 0,6 г/г при проведенні процесу за температури 50 °С, рН 4.5, 50 % вмісту цукрі у середовищі, швидкості потоку 15 мл/хв, та молярному співвідношенню фруктози до лактози 12. Таким чином, синтез лактулози в реакторі CPBR є альтернативою звичайному періодичному синтезу, оскільки дозволяє збільшити вихід лактулози.

Також Guerrero та співавт. [34] здійснили оптимізацію синтезу лактулози за допомогою β -галактозидази *Aspergillus oryzae*. Встановлено, що при температурі 50 °С, 50% початковій концентрації цукрів та молярному співвідношенні фруктоза/лактоза - 6,44, вихід лактулози склав 0,26 г/г вихідної лактози.

У літературному джерелі Ubilla та співавт. [35] повідомляється про синтез лактулози з фруктози та лактози у реакторі безперервного перемішування (CSTR) об'ємом 2 л з іммобілізованою на носії гліюксил-

агарозою β -галактоозидазою *Aspergillus oryzae*. Встановлено, що максимальна кількість лактулози - 0,54 г/г була отримана при 50 °С, рН 4,5, з використанням 50% мас/мас субстрату, при співвідношенні фруктоза/лактоза - 8.

Цими ж науковцями [36] було здійснено синтез лактулози шляхом проведення повторних періодичних процесів (рис. 1.2) з використанням іммобілізованої шляхом зшивання та агрегування β -галактозидази *Aspergillus oryzae* (CLAG). Синтез лактулози проводили при 50 °С, рН 4,5, 50% початковій концентрації цукрів та молярних співвідношеннях фруктози до лактози 4, 12 і 20. CLAG був стабільнішим, ніж вільний фермент, при роботі в режимі повторних процесів вихід лактулози і продуктивність синтезу становили у 3,8 та 4,3 рази вище. Після 10 повторних процесів вихід лактулози складав 0,169, 0,225 та 0,259 г/г лактози при молярних співвідношеннях фруктози до лактози 4, 12 і 20 відповідно. Встановлено, що можна виконати 98 і 27 партій при мольному співвідношенні фруктоза/лактоза 4 і 20 відповідно. Це показує, що на стабільність ферментів сильно впливає розподіл цукрів у реакційному середовищі.

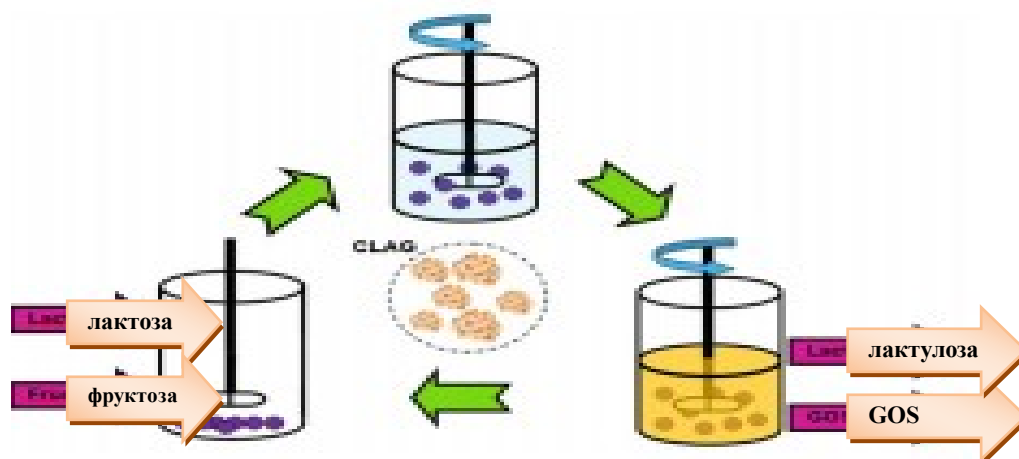


Рис. 1.2. Схема проведення синтезу лактулози повторними періодичними партіями

Guerrero у 2019 році в роботі [37] іммобілізував β -галактозидазу *Aspergillus oryzae* агрегацією та зшиванням (CLAG) для синтезу лактулози. Синтез лактулози проводився при 50 °С, рН 4,5, 50% вмісту цукрів,

молярному співвідношенні фруктози / лактози 4 та 8 у періодичному та повторному періодичному процесах. Вихід лактулози становив 0,19 г/г і 0,24 г/г при молярних співвідношеннях фруктози та лактози 4 моль/моль та 8 моль/моль. Сукупна маса лактулози при проведенні повторних періодичних партій була вищою у порівнянні з використанням вільного ферменту. 86 і 93 повторні партії могли бути виконані при молярних співвідношеннях фруктози та лактози 4 та 8.

Ці ж науковці [38] проводили синтез лактулози з лактози та фруктози з підживленням з використанням β -галактозидази *Aspergillus oryzae*, отримуючи концентрацію лактулози 40,4 г/л, що на 20% вище, ніж при періодичному культивуванні, при цьому концентрація трансгалактозилуваних олігосахаридів (TOS) зменшилася на 98%. Синтез лактулози у режимі з підживленням проводили із загальним вмістом 50% концентрації вуглеводів, 55 °C, pH 4,5 та співвідношенні E/S 100, 200, 400, 800 та 1600 МО/г. Спочатку проводили режим з підживленням, подаючи 0,7 мл/хв 50%-го розчину лактози протягом 120 хв, а потім проводили культивування у періодичному режимі протягом наступних 5 год. Співвідношення маси ферменту до субстрату (E/S) є критичним фактором при проведенні культивування з підживленням. Більш високі значення сприяють гідролізу лактози через трансгалактозилювання, E/S=400 МО/г є межею для правильного синтезу лактулози. Вихід лактулози є найвищим при E/S 100-200 МО/г. Крім цього, встановлено, що селективність синтезу лактулози є значно вищою при культивуванні з підживленням завдяки зменшенню утворення олігосахаридів.

Sitanggang зі співавт. [39] розробили безперервний процес ферментативного синтезу лактулози у мембранному реакторі з використанням ферменту β -галактозидази *Aspergillus oryzae* та полісульфонової мембрани UFXMWCO 10 кДа. Було підібрано оптимальні умови синтезу, а саме концентрація ферменту - 10 Од/мл, молярне співвідношення лактози до фруктози - 1/4, температура інкубації - 40 °C,

тривалість синтезу - 28 днів, свіжий фермент подавали кожні 48 годин. За таких умов було отримано лактулозу у концентрації 8,67 г/л (ступінь конверсії лактози 78%).

Вчені на чолі з Cardoso [40] вперше дослідили β -галактозидазу, синтезовану *Aspergillus laticoffeatus*, у виробництві лактулози та інших пребіотиків. Виробництво позаклітинної β -галактозидази проводили на синтетичному середовищі (лактоза, пептон, дріжджовий екстракт та солі) та альтернативних середовищах, що містить підсирну сироватку та крутий кукурудзяний відвар, при температурі 28 °C, pH 6,5, 180 об/хв протягом 6-9 діб. Встановлено, що найвищий вихід β -галактозидази спостерігається на синтетичному середовищі та складає 413 Од/мл. Цей фермент використовували у синтезі пребіотиків, а саме лактулози і галакто-олігосахариду. Культивування *A. laticoffeatus* проводили протягом 9 днів при 37 °C і 180 об/хв, після чого біомасу видаляли фільтруванням (через 0,2 мкм мембрану) та використовували культуральну рідину, що містить β -галактозидазу для синтезу лактулози. Синтез проводили при 37 °C протягом 30 годин шляхом змішування 5 мл сирого екстракту ферменту з 5 мл цукрового розчину (300 г/л лактози + 300 г/л фруктози) в натрій-цитратному буфері (50 мМ, pH 4,5). Максимальний вихід лактулози становив 2,5 г/л (конверсія лактози 20%) через 25 годин.

Науковці під керівництвом Tang [41] вивчили процес біосинтезу лактулози β -галактозидазою, виділеною зі штаму *Arthrobacter* sp. Даний штам вирощували на середовищі, що містить 2% лактози, 0,5% дріжджового екстракту та 1% пептону. Вироблену β -галактозидазу очищали 15,7-кратним осадженням сульфатом амонію та подальшою гідрофобною хроматографією на феніл-сефарозі. Для синтезу лактулози як субстрат використовували суміш 40% лактози та 20% фруктози, та інкубували клітинні екстракти з кожного ізоляту при 37 °C протягом 6 год. Ферментацію зупиняли кип'ятінням суміші протягом 10 хв. Крім цього, встановлено, що оптимальні

значення рН та температури для синтезу лактулози за допомогою даної β -галактозидази становлять 6,0 та 20 °C відповідно.

У науковій статті вчених на чолі з Aburto [4] досліджено вплив параметрів ферментації на синтез лактулози за допомогою β -галактозидази *Bacillus circulans*. Встановлено, що тільки початкова концентрація цукрів та молярне співвідношення лактози та фруктози (F/L) впливали на вихід лактулози. При молярному співвідношенні F/L = 20 було отримано найбільший вихід лактулози – 0,54 г/г лактози. При початковій концентрації цукрів у середовищі 30% спостерігається найвищий вихід лактулози, який поступово знижується при збільшенні початкової концентрації цукрів до 60 %. Слід зазначити, що рН та температура не мали суттєвого впливу на вихід лактулози.

В даній статті Corzo-Martínez зі співавт. [42] розробили технологію отримання лактулози (16,1% від початкової кількості лактози) шляхом ізомеризації підсирної сироватки з використанням у якості каталізатора яєчної шкарлупи та ферменту β -галактозидази від *B. circulans*. Були підібрані оптимальні умови синтезу: рН 6,5, температура 50 °C, 300 г/кг цукрів у середовищі і 3 Од/мл β -галактозидази.

Зважаючи на те, що виділення та очищення ферменту трудомістке і дороге, та крім того, очищені ферменти можуть бути дуже нестабільними і швидко втрачати активність, вченими була запропонована нова стратегія ферментативного синтезу лактулози з використанням замість вільних ферментів, ферменту на бактеріальній поверхні. Завдяки даному підходу фермент має підвищену стабільність і висока безпеку.

Wang зі співавт. розробили підхід до виробництва лактулози з використанням β -галактозидази *Bacillus stearothermophilus* IAM11001, ген якої експресували у штамі *Bacillus subtilis* 168 [43]. В результаті фермент синтезувався на поверхні спор *B. subtilis*, максимальна активність β -галактозидази становила 0,42 Од/мг спор. β -галактозидазу на поверхні спор використовували як біокаталізатор для отримання лактулози, при цьому

отримували 8,8 г/л лактулози з 200 г/л лактози та 100 г/л фруктози за 4 години ферментації. При чому β -галактозидаза зберігала близько 30,3% своєї початкової активності після 8 (восьми) послідовних циклів біоконверсії.

Mayer зі співавт. [44] розробили безперервний ферментативний процес отримання лактулози із застосуванням вільної та іммобілізованої глікозидази *Pyrococcus furiosus*, яка була еспресована у *E. coli* BL21 (DE3) pLUW511. Гіпертермостабільна глікозидаза (CelB) була іммобілізована на аніонообмінну смолу Amberlite IRA93 бо на Eupergit®. Процес безперервної біотрансформації здійснювали в реакторах з іммобілізованою CelB, і в реакторі з ферментативними мембранами, що містить вільну CelB при температурі 75 °C, pH 5, при концентрації лактози та фруктози 34 та 270 г/л відповідно. Максимальний вихід лактулози – 14 г/л (43% від початкової концентрації лактози) спостерігався при використанні іммобілізованої CelB. В той час як при використанні вільного ферменту вихід продукту склав 41%.

Hashem та співавт. [45] було здійснено виробництво лактулози за допомогою β -галактозидази *Lactobacillus acidophilus* NRRL 4495. Встановлено, що максимальний вихід лактулози спостерігається при pH 6,6, співвідношенні лактози до фруктози 40:20 та концентрації ферменту 4 од/мл та складає 25 г/л через 7 год ферментації.

Liao зі співавт. [46] з метою синтезу лактулози клонували ген *Lactobacillus plantarum* FMNP0,1 що кодує β -галактозидазу, та експресували його у *E. coli* BL21 (DE3). *L. plantarum* рідко досліджували для виробництва β -галактозидази, але β -галактозидаза *L. plantarum* має високу активність трансгалактозилювання, тому її застосування є досить перспективним.

Отриманий рекомбінантний фермент β -галактозидаза *L. plantarum* FMNP01Gal був найбільш стабільним при 40-50 °C і проявляв оптимальну каталітичну активність при 40 °C і pH 7,0. Активність β -галактозидази *L. plantarum* FMNP01Gal сильно пригнічувалась Cu^{2+} , тоді як інші випробувані іони металів мали незначний вплив на нього. Найбільший синтез лактулози було досягнуто при використанні 60% цукрів в якості субстрату з

масовим співвідношенням лактоза/фруктоза 2:1 і 2 од/мл L.p FMNP01Gal як каталізатора. За цих оптимальних умов отримували $18,38 \pm 2,17$ г/л лактулози через 6 год при 50 °C.

Song зі співавт. [47] використовували іммобілізовану β -галактозидазу з *Kluyveromyces fragilis* та глюкозоізомеразу з *Streptomyces rubiginosus* для синтезу лактулози із сироваткової лактози за відсутності фруктози. Іммобілізована глюкозоізомераза використовувалась для сприяння іммобілізованій β -галактозидазі, оскільки вона може ізомеризувати глюкозу, що утворюється в результаті гідролізу лактози до фруктози. Отже, фруктоза може постійно трансформуватися з глюкози за допомогою іммобілізованої глюкозоізомеразы. Підбирали оптимальні умови процесу, такі як концентрація лактози (14%, 16%, 18% та 20%), температура (47, 50, 53.5, 57 та 60 °C), іонна сила буферу (50, 100, 150, 200, 250 та 300 мМ) та співвідношення іммобілізованих ферментів (1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 та 1:6). При проведенні синтезу лактулози при 53,5 °C з використанням 20% сироваткової лактози, 12 Од/мл іммобілізованої β -галактозидази та 60 Од/мл іммобілізованої глюкозоізомеразы в 100 мМ натрій фосфатному буфері при рН 7,5 протягом 3 годин концентрація лактулози та продуктивність синтезу становили 7,68 г/л та 0,32 мг/Од·год відповідно, що є у 2,2 та 2,7 рази вище, ніж до оптимізації. Також було встановлено, що після 7 повторних використань іммобілізованих ферментів концентрація синтезованої лактулози становила 4,31 г/л, а відносна каталітична активність іммобілізованих ферментів становила 57,1%.

Виробництво лактулози за допомогою термостабільних ферментів має багато переваг, включаючи високу розчинність субстрату за високих температур, а також знижений ризик контамінації процесу.

Letsididi зі співавт. [48] провели ферментативний синтез лактулози із застосуванням реакції трансгалактозилювання за допомогою рекомбінантної термостабільної β -галактозидази першого типу (GH1) з гіпертермофільного штаму архей *Calditerrivibrio modestus* IC-167. На відміну від β -галактозидаз

другого типу GH2, більшість β -галактозидаз першого типу GH1 мають багато переваг, а саме вони більш стабільні, малі за розміром (50 кДа) і мономерні, що робить їх використання у синтезі інших сполук більш простим та дешевшим.

Встановлено, що оптимальний рН для виробництва лактулози становить 4,5, а температура - 85 °С, вихід лактулози помірно знизився до 83% при температурі 90 °С. Однак активність синтезу лактулози різко знизилася до 35% при 95 °С. За оптимальних умов реакції при 70% концентрації вихідних цукрових субстратів з молярним відношенням лактози до фруктози 1:4, концентрації ферменту 15 Од/мл і температурі 85 °С, було отримано максимальну концентрацію лактулози, що складає 108 г/л за 4 год, що відповідає 84% конверсії лактози.

Метою роботи Рябцевої та співавт. [49] було дослідження процесів утворення лактулози з використанням автолізу лактозоброджуючих дріжджів, отриманих після культивування чистих і змішаних з молочнокислими мікроорганізмами культур. Результати досліджень показали, що β -галактозидази, що містяться в автолізаті дріжджів *Candida kefyr* і *Kluyveromyces marxianus*, мають досить високу трансглікозилуючу активність. Максимальні концентрації лактулози (50,9%) були отримані через 24 години ферментації при використанні обох видів дріжджів і пермеата підсирної сироватки як субстрат. При спільному використанні *K. marxianus* і *S. thermophilus* максимальний рівень концентрації лактулози був майже таким же (49,7%), але був досягнутий вже через 8 годин синтезу. Крім цього, встановлено, що вихід лактулози істотно залежить від концентрації лактози в розчині. Найбільш активно лактулоза утворюється протягом 8 годин в 20%-х розчинах і 12 годин ферментації в 25-30%-х розчинах, потім її концентрація поступово знижується.

Узагальнені дані щодо біотехнологічного отримання лактулози за допомогою β -галактозидази наведено у табл. 1.2.

**Особливості біотехнологічного одержання лактулози з
використанням ферменту β -галактозидази**

Фермент	Мікро-організм	Субстрат	Параметри процесу	Вихід лактулози	Літера тура
1	2	3	4	5	6
β - галактозидаза	<i>Kluyveromyces lactis</i>	66,6 г/л лактози та 133,3 г/л фруктози	50 °С, рН 7, 0,01% мас./об. Mg^{2+} , 2 год	22,6 г/л	[25]
β -галактозидаза, іммобілізована на хітозані		Сирна сироватка та фруктоза	50 °С, рН 7	17,3 г/л (86%)	
β -галактозидаза, іммобілізована на 2,0% хітозану та активована глутаральдегідом	<i>Kluyveromyces lactis</i> NRRL Y1564	Лактоза	40°С та рН 7	42,8% (17,32 г/л)	[26]
β -галактозидаза	<i>Kluyveromyces lactis</i>	Лактоза	40 °С, рН 6,8	12 г/л	[27]
β -галактозидаза	<i>Kluyveromyces lactis</i>	Лактоза (250 г/л) та фруктоза (100 г/л)	40 °С, рН 7,5	8 г/л	[28]
Іммобілізована β -галактозидаза	<i>Kluyveromyces lactis</i>	Лактоза (20%)	47 °С, швидкість потоку 0,5 мл/хв. (безперервний режим)	19,1 г/л	[29]
β - галактозидаза	<i>Kluyveromyces lactis</i>	Концентрації фруктози 25-30% та лактози 9-12%	90 хв	8 г/л	[30]
		Додавання триетилфосфату (30%), фруктози 30% та лактози 10%	150 хв	10,4 г/л	

1	2	3	4	5	6
β -галактозидаза, іммобілізована на хелат-глюксил-агарозі	<i>Aspergillus oryzae</i>	Фруктоза/лактоза у молярному співвідношенні 20	50°C, pH 4.5	0,32 г/г	[31]
β -галактозидаза, іммобілізована на монофункціональній глюксил-агарозі	<i>Aspergillus oryzae</i>	Фруктоза та лактоза у молярному співвідношенні 16, концентрація цукрів у середовищі 50%	50 °C, pH 4,5	0,3 г/г	[32]
β -галактозидаза, іммобілізована на глюксил-агарозі	<i>Aspergillus oryzae</i>	Фруктоза та лактоза у молярному співвідношенні 12, концентрація цукрів у середовищі 50%	50 °C, pH 4.5, швидкість потоку 15 мл/хв (безперервний режим)	0,6 г/г	[33]
β -галактозидаза	<i>Aspergillus oryzae</i>	Фруктоза та лактоза у молярному співвідношенні 6,44, концентрація цукрів у середовищі 50%	50 °C	0,26 г/г	[34]
β -галактозидаза, іммобілізована на носії глюксил-агарозі	<i>Aspergillus oryzae</i>	Фруктоза та лактоза у молярному співвідношенні 8, концентрація цукрів у середовищі 50%	50 °C, pH 4,5	0,54 г/г	[35]
β -галактозидаза іммобілізована шляхом зшивання та агрегування (CLAG)	<i>Aspergillus oryzae</i>	Фруктоза та лактоза у співвідношенні 20, концентрація цукрів у середовищі 50%	50 °C, pH 4,5	0,259 г/г	[36]

Продовження табл. 1.2

1	2	3	4	5	6
β -галактозидаза, іммобілізована агрегацією та зшиванням (CLAG)	<i>Aspergillus oryzae</i>	50% вмісту цукрів, молярне співвідношення фруктози до лактози 4 та 8	50 °C, pH 4,5	0,19 г/г і 0,24 г/г	[37]
β -галактозидаза	<i>Aspergillus oryzae</i>	Режим з підживленням, подаючи 0,7 мл/хв 50%-го розчину лактози протягом 120 хв, а потім культивування у періодичному режимі протягом 5 год	55 °C, pH 4,5, співвідношення ферменту до субстрату E/S 100-200 МО/г	40,4 г/л	[38]
β -галактозидаза	<i>Aspergillus oryzae</i>	Молярне співвідношення лактози до фруктози - 1/4	Безперервний режим, 40 °C, тривалість синтезу - 28 днів	8,67 г/л (ступінь конверсії лактози 78%).	[39]
β -галактозидаза	<i>Aspergillus laticoffeatus</i>	300 г/л лактози + 300 г/л фруктози	37 °C, pH 4,5, 25 годин	2,5 г/л (конверсія лактози 20%)	[40]
β -галактозидаза	<i>Arthrobactersp</i>	Суміш 40% лактози та 20% фруктози	37 °C, pH 6, 6 год.		[41]
β -галактозидаза	<i>Bacillus circulans</i>	Фруктоза та лактоза у молярному співвідношенні 20, концентрація цукрів у середовищі 30%	40 °C, pH 7	0,54 г/г	[4]
β -галактозидаза	<i>Bacillus circulans</i>	Сирна сироватка, концентрація цукрів у середовищі 30%	pH 6,5, температура 50 °C,	16,1% від початкової кількості лактози	[42]

Закінчення табл. 1.2

1	2	3	4	5	6
β -галактозидаза на поверхні спор <i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus stearothermophilus</i> IAM11001	200 г/л лактози та 100 г/л фруктози	4 год	8,8 г/л	[43]
Глікозидаза, іммобілізована на аніонообмінній смолі Amberlite IRA93 або на Eupergit® C	<i>Pyrococcus furiosus</i>	Лактоза та фруктоза у концентраціях 34 та 270 г/л відповідно	75 °C, pH 5, (безперервний режим)	14 г/л (43% від початкової концентрації лактози)	[44]
β -галактозидаза	<i>Lactobacillus acidophilus</i> NRRL 4495	Лактоза та фруктоза у співвідношенні 40:20	pH 6,6, 7 год	25 г/л	[45]
β -галактозидаза	<i>Lactobacillus plantarum</i> FMNP01	60% цукрів в якості субстрату з масовим співвідношенням лактоза/фруктоза 2:1	6 год при 50 °C	18,38 ± 2,17 г/л	[46]
Іммобілізована β -галактозидаза та глюкозоізомераза	<i>Streptomyces ubiginosus</i>	20% сироваткової лактози	53,5 °C, pH 7,5 3 години	7,68 г/л	[47]
Рекомбінантна термостабільна β -галактозидаза першого типу (GH1)	Гіпертермофільний штам архей <i>Caldivirga maquilingensis</i> IC-167	70 % концентрація цукрових субстратів з молярним відношенням лактози до фруктози 1:4	Концентрація ферменту 15 од/мл, 85 °C, pH 4,5, 4 год	108 г/л (84% конверсії лактози)	[48]

Таким чином, за допомогою β -галактозидази можна отримати лактулозу у вищих концентраціях, порівняно з хімічними каталізаторами. Найбільший вихід лактулози було отримано при використанні β -галактозидази *Aspergillus oryzae* при культивуванні з підживленням (40,4 г/л) та рекомбінантною

термостабільної β -галактозидази першого типу (GH1) зі штаму архей *Caldivirga maquilingensis* IC-167 (108 г/л).

1.2.2. Ферментативний синтез лактулози за допомогою термостабільної целобіозо-2-епімерази

В останні роки вчені переходять до синтезу лактулози за допомогою використання іншого фермента целобіолозо-2-епімерази, оскільки за допомогою β -галактозидази не вдається отримати лактулозу у високій концентрації [52].

Целобіозо-2-епімераза каталізує епімеризацію на С-2-положенні глюкозного фрагмента у відновлювальному кінці целобіози і лактози для утворення лактулози та епілактози [50].

Целобіозо-2-епімераза *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* є ефективним ферментом для ізомеризації лактози в лактулозу, оскільки при його використанні вдається отримати більше 50% лактулози [52]. Крім того, при використанні целобіозо-2-епімерази використовують лактозу як єдиний субстрат [50].

Wang зі співавт. [51] здійснювали синтез лактулози в етанолопроникних клітинах кишкової палички, що містять целобіозо-2-епімеразу *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* DSM 8903 (CsCE). Використання цілих клітин як біокаталізаторів для виробництва лактулози має переваги перед очищеними ферментами, оскільки це економічний та простий в управлінні процес, однак бар'єр проникності оболонки клітини для субстратів і продуктів часто спричиняє низьку швидкість реакції у цілих клітинах. Тому клітини *E. coli* BL21 (DE3), що містять CsCE, для покращення проникності ресуспендували в 40% етанолі, перемішували при 4⁰С протягом 30 хв. Вченими були підібрані умови реакції для максимального синтезу лактулози, що включали 600 г/л лактози, рН 7,5, 80 °С і 12,5 Од/мл клітинного біокаталізатора. Після інкубування в буфері Na₂HPO₄ – NaH₂PO₄ протягом 2 год отримували приблизно 390,59 г/л лактулози, конверсія якої складала

65,1%. Вихід та конверсія побічного продукту – епілактози - склали 11,7 г/л та < 2% відповідно.

Пізніше цими вченими [52] було здійснено іммобілізацію целобіозо-2-епімерази *C. saccharolyticus* (CsCE) на смолі Duolite A568. Іммобілізований фермент був стабільним у діапазоні рН від 6 до 9 і може легко десорбуватися при кислому (<5) або основному рН (>10). Порівняно з вільною формою, іммобілізований CsCE був більш активний при середніх температурах (40–80 °С) і зберігає майже 100% активність при 50 °С протягом більше 12 год. Синтез лактулози за допомогою вільної CsCE проводили при використанні 600 г/л лактози, у Na₂HPO₄ – NaH₂PO₄ буфері (рН 7,5), 80 °С і 12,5 од/мл вільної CsCE, а синтез лактулози з використанням іммобілізованої CsCE проводили з 600 г/л лактози, 12,5 од/мл іммобілізованої CsCE при рН 7,0 і температурі 70 °С. Встановлено, що синтез лактулози з використанням іммобілізованої CsCE при 70 °С, було майже рівним за виходом лактулози (350 г/л, 58,3%) з синтезом з використанням вільної CsCE при 80 °С, однак при іммобілізації відбувається покращення активності та стабільності ферменту, а також відбувається синтез лактулози при більш низьких температурах, що зменшує її собівартість.

Вчені з Китаю [53] іммобілізували целобіозо-2-епімеразу *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* у вигляді зшитих агрегатів (CLEA). Отримані CLEA з багат шаровою мережею демонстрували збільшений оптимальний діапазон температур (70-80⁰ С) і мали більш високу активність у діапазоні 50-90⁰С. Крім того, CLEA зберігали понад 95% їхньої початкової активності після десяти послідовних партій синтезу при 60⁰С, демонструючи великі перспективи багаторазового використання. Більше того, CLEA демонструють еквівалентну або вищу каталітичну здатність, порівняно з вільною целобіозо-2-епімеразою, у біосинтезі лактулози. Синтез лактулози проводили, використовуючи в якості субстрату 25 г/л лактози, за допомогою вільної целобіозо-2-епімерази (5-20 Од/мл, при рН 7,5 та 80⁰С), та за допомогою CLEA (5-10 Од/мл, при рН 7 та 75⁰С). Встановлено, що за

допомогою CLEA з активністю 10 Од/мл вихід лактулози складає 58,8-61,7%, епілактози 9,3-10,2% і лактози 27,8-30 %, що є вищим, порівняно з використанням вільної целобіозо-2-епімерази (вихід лактулози при використанні целобіозо-2-епімерази з активністю 5 Од/мл складає 31,4%, а з активністю 20 Од/мл 59,9%). Отже, активність CLEA у синтезі лактулози у 2 рази вища, ніж вільної целобіозо-2-епімерази.

Kim зі співавт. [54] дослідили вплив додавання борату на синтез лактулози з лактози з використанням целобіозо-2-епімерази *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. Встановлено, що максимальний синтез лактулози відбувався при 1:1 М співвідношенні борат – лактоза. За цієї умови утворювалося 614 г/л лактулози з 700 г/л лактози після інкубації з додаванням 120 г/л борату при рН 7,5 та 80 °С протягом 3 год, з конверсією 88% та продуктивністю 205 г/л·год. Слід зазначити, що концентрація побічного продукту – епілактози – складала 12 г/л через 3 години, що становить менше 2% від кількості лактулози. Отже, даний метод є простіший та екологічніший, ніж хімічний синтез в сильно лужних умовах. Єдиним недоліком є те, що борат утворює лактулозо-боратний комплекс, який на 99% видаляють за допомогою смол амберліту IRA-743 та Dowex X50X8, проте на даний момент не вдалося здійснити повного видалення борату.

В роботі Kim та співавт. [55] показано можливість синтезу лактулози з лактози як єдиний субстрат (700 г/л) з використанням термостабільної рекомбінантної целобіозо-2-епімерази *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* при рН 7,5, 80 °С. За цих умов утворюється 408 г/л лактулози (58% від маси субстрату) через 2 год біоконверсії. Для отримання даного ферменту ген целобіозо-2-епімерази був виділений зі штаму *C. saccharolyticus* DSM 8903, перенесений у плазмиду рЕТ-28а (+), якою трансформували клітини *Escherichia coli* ER2566. Отриманий рекомбінантний штам продукує 34 Од/г целобіозо-2епімерази.

У дослідженні Wu та співавт. [56] ген, що кодує целобіозо-2-епімеразу з *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* (CsCE), був експресований у *Bacillus*

subtilis WB800. Культивування рекомбінантного штаму здійснювали у 7,5 л ферментері. Після оптимізації ферментаційного середовища (15 г/л сахарози, 15 г/л дріжджового екстракту, 5 г/л кукурудзяного порошку, 5 г/л NaCl, 0.5 г/л $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 6 г/л $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ та 2 г/л KH_2PO_4) продуктивність рекомбінантного штаму була в 4,5 рази вищою, ніж у вихідному середовищі та складала 5,3 Од/мл через 16 годин культивування.

Розроблено ферментативний синтез лактулози з використанням лактози з сирної сироватки в якості субстрату. Встановлено, що оптимальні рН та температура є 7,0 та 80 ° С відповідно. Максимальна ступінь конверсії лактози становила 58,5% (158 г/л лактулози з 270 г/л лактози) із використанням 7,5 Од/мл CsCE. Ферментативна мембранна реакторна система демонструвала велику експлуатаційну стабільність - конверсія лактози становила 42,4% (84,5 г/л лактулози) після 10 партій біоконверсії.

Науковці на чолі з Rentschler [57] описали ферментативний синтез лактулози шляхом конверсії лактози термофільною целобіозо-2-епімеразою *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* (CsCE). Даний фермент був отриманий за допомогою створення та культивування рекомбінантного штаму *Escherichia coli* BL21 (DE3), що містив ген CsCE. Біоконверсію проводили в реакторах з робочим об'ємом 25 мл при 2 різних температурах (50 і 80 °С). Конверсія лактози при 50°С (початковий вміст лактози $48,5 \pm 2,1$ г/л) призвела до кінцевого виходу 57,7% (28,0 г/л) лактулози та 15,5% (7,49 г/л) епілактози через 24 год ферментації. При температурі 80 °С було отримано 56,7% (27,5 г/л) лактулози та 13,6% (6,57 г/л) епілактози з лактози через 72 год.

У літературному джерелі Chen та співавт. [58] охарактеризували новий спосіб отримання лактулози за допомогою целобіозо-2-епімеразу штаму *Caldicellulosiruptor obsidiansis* OB47 (Caob-CE). Для експресії даного ферменту використовувався штам *E. coli* BL21, який трансформували вектором pET-Caob-CE, що містив ген целобіозо-2-епімеразу. Трансформовані клітини вирощували на середовищі Лурія-Бертані, в яке додали 100 мкг/мл ампіциліну і інкубували при перемішуванні 200 об/хв

при 37 °C. Після досягнення оптичної густини 600 нм додавали індуктор ізопропіл- β -D-1-тіогалактопіранозид (ІПТГ) у концентрації 0,5 ммоль/л для індукції експресії целобіозо-2-епімерази, після цього температуру знижили до 28 °C і фермент експресували протягом 6 год. Питома активність отриманого ферменту склала 93,6 Од/мг по відношенню до лактози. Вихід становив $9,5 \pm 1,3$ мг очищеного ферменту з 50 мл культуральної рідини. Далі фермент з активністю 120 Од/мл Саоб-СЕ використовували у виробництві лактулози з 200 г/л лактози при 75 °C і pH 7,5. Найвищий вихід лактулози досягав 108 г/л через 4 год, при цьому утворювалося також 24 г/л епілактози.

Kuschel зі співавт. [59] спостерігали, що целобіозо-2-епімерази, як правило, каталізують C2-епімеризацію фрагментів D-глюкози та D-манози на відновлювальному кінці β -1,4-глікозидно-зв'язаних олігосахаридів. Таким чином, епілактоза (4-O- β -D-галактопіранозил-D-маннопіраноза) утворюється з лактози як субстрату. Чотири целобіозо-2-епімерази, виключно з термофільних мікроорганізмів, додатково каталізують ізомеризацію лактози на лактулозу. Метою даної роботи було дослідження, чи целобіозо-2-епімерази мезофільних мікроорганізмів, таких як *Bacteroides fragilis*, *Dyadobacter fermentans*, *Ruminococcus cusalbus*, *Rhodothermus marinus*, *Butyrivibrio* sp. AE2015, *Firmicutes bacterium* CAG:534 та *Flavobacterium johnsoniae* також здатні каталізувати реакцію ізомеризації, що веде до отримання лактулози з лактози. Результати дослідження показують, що всі сім целобіозо-2-епімераз здатні каталізувати як епімеризацію, так і ізомеризацію, при цьому остання проводиться при значно меншій швидкості реакції. Сім целобіозо-2-епімераз можна розділити на три групи щодо виробництва лактулози. Целобіозо-2-епімерази *Bacteroides fragilis*, *Firmicutes bacterium* CAG:534 та *Flavobacterium johnsoniae* утворюють менше 3% лактулози через 8 днів. Целобіозо-2-епімерази *Butyrivibrio* sp. AE2015, *Dyadobacter fermentans* та *Ruminococcus albus* синтезують 6-9% лактулози через 8 днів. Найпродуктивнішою є целобіозо-2-епімераза *Rhodothermus marinus*, яка синтезує 19% лактулози через 8 днів. Також було здійснено

синтез лактулози за допомогою целобіозо-2-епімерази *Ruminococcus albus* при 20 °C, pH 7,5, 100 mM NaCl та за використанням 150 mM лактози в якості субстрату. За цих умов через 21 день ферментативної конверсії утворюється $56,8 \pm 1,1\%$ лактулози, $13,3 \pm 0,3\%$ епілактози та $29,9 \pm 0,7\%$ лактози.

Ці ж науковці [60] досліджували виробництво лактулози з допомогою целобіозо-2-епімерази *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* (CsCE) та *Dictyoglomus turgidum* (DtCE), які здатні каталізувати епімеризацію та ізомеризацію лактози. Процес синтезу лактулози як з використанням CsCE, так і DtCE здійснювали протягом 48 год при 50 °C, pH 7,5. Ці перетворення призвели до утворення приблизно 30,5% лактози, 14,5% епілактози та 55% лактулози з використанням обох целобіозо-2-епімераз.

Kim зі співавт. [61] дослідили синтез лактулози за допомогою рекомбінантної N-ацил-D-глюкозамін 2-епімераза з *Dictyoglomus turgidum*, яка ідентифікується як целобіозо-2-епімераза. Епімеризаційна активність даного ферменту була максимальною при pH 7,0 і температурі 70 °C. Реакцію проводили при pH 7, у буфері, що містить 10 mM субстрату та 1,7 од/мл ферменту при 70 °C протягом 6 год. За допомогою даного ферменту вдається отримати з лактози 12,8% епілактози та 54,3% лактулози.

Узагальнені дані щодо біотехнологічного отримання лактулози за допомогою целобіозо-2-епімерази наведено у табл. 1.3.

**Особливості біотехнологічного одержання лактулози з
використанням ферменту целобіозо-2-епімерази**

Фермент	Мікроорганізм	Субстрат	Параметри процесу	Вихід лактулози	Літера тура
Целобіозо-2-епімераза в етанолопроникних клітинах <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i> DSM 8903	600 г/л лактози	pH 7,5, 80 °C, 2 год	390,59 г/л (конверсія 65,1%)	[51]
Целобіозо-2-епімераза, іммобілізована на смолі Duolite A568	<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i>	600 г/л лактози	12,5 од/мл іммобілізованої CsCE, pH 7,0, 70 °C	350 г/л (58,3%)	[52]
Целобіозо-2-епімераза, іммобілізована у вигляді зшитих агрегатів	<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i>	25 г/л лактози	10 од/мл ферменту, при pH 7 та 75°C	58,8-61,7%	[53]
Вільна целобіозо-2-епімераза			5 од/мл ферменту, pH 7,5, 80°C	31,4%	
			20 од/мл, pH 7,5, 80°C	59,9%).	
Целобіозо-2-епімераза	<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i>	700 г/л лактози, 120 г/л борату	pH 7,5, 80 °C, 3 год	614 г/л (конверсія 88%)	[54]
Целобіозо-2-епімераза	<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i>	Лактоза 700 г/л	pH 7,5, 80 °C	408 г/л лактулози (58% від маси субстрату)	[55]
Целобіозо-2-епімераза	<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i>	Лактоза з сирної сироватки (270 г/л)	pH 7,0 та 80 °C	58,5% (158 г/л)	[3]
Целобіозо-2-епімераза	<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i>	Лактоза 48,5 ± 2,1 г/л	50°C, 24 год	57,7% (28,0 г/л)	[56]
Целобіозо-2-епімераза	<i>Caldicellulosiruptor obsidiansis</i> OB47	200 г/л лактози	75 °C і pH 7,5	108 г/л	[57]
Целобіозо-2-епімераза	<i>Ruminococcus albus</i>	150 мМ лактози	20 °C, pH 7,5, 100 мМ NaCl, 21 доба	56,8 ± 1,1%	[58]
Целобіозо-2-епімераза	<i>C. saccharolyticus</i> та <i>Dictyoglomus turgidum</i>	Лактоза	48 год, 50 °C, pH 7,5	55%	[59]
Целобіозо-2-	<i>Dictyoglomus</i>	Лактоза 10	pH 7, 1,7 од/мл	54,3%	[60]

епімераза	<i>turgidum</i>	мМ	ферменту, 70 °С, 6 год		
-----------	-----------------	----	---------------------------	--	--

Отже, целобіозо-2-епімераза виявилась найефективнішим каталізатором у синтезі лактулози. З її допомогою вдається отримати лактулозу з виходом, що перевищує 50%. Найбільший вихід було отримано при додаванні до субстрату борату, при цьому отримали 614 г/л (88%).

1.2.3. Імобілізовані лактаза та глюкозоізомераза у синтезі лактулози

Ферментативний синтез лактулози з використанням лактази в якості каталізатора є перспективною альтернативою методу хімічної ізомеризації.

Лактаза – один з видів β -галактозидази, яка може ефективно гідролізувати β -(1,4)-галактозидний зв'язок у лактозі з утворенням глюкози та галактози. За певних умов (в органічно-водних середовищах) лактаза каталізує реакцію трансглікозидування з утворенням лактулози та інших галакто-олігосахаридів (GOS). Крім того, глюкоза, яка утворюється в результаті гідролізу лактози, може бути ізомеризована за допомогою глюкозоізомерази до фруктози, яка залучається у реакцію трансглікозидування.

Вчені з Китаю [62] успішно синтезували лактулозу подвійним ферментативним методом з використанням в якості субстратів лактози та фруктози. Циклогексан – буферну систему використовували як органічно-водний носій у культуральній рідині. Подвійна ферментативна система включала в себе іммобілізовану лактазу (синтезовану за допомогою *Kluyveromyces lactis*) та іммобілізовану глюкозоізомеразу. Встановлено, що за оптимальних умов ферментації, а саме при концетрації лактози 800 г/л, фруктози 100 г/л, лактази 100 г/л, глюкозоізомерази 50 г/л, при температурі 30 °С, рН = 8,0, через 2 год був отриманий найвищий вихід лактулози, який дорівнював 151 г/л.

Таким чином, стратегія використання двох ферментів є досить ефективною та перспективною для промислового використання, оскільки вихід лактулози є достатньо високим.

1.3. Особливості очищення лактулози

Науковці досліджують різні методи для очистки лактулози після ізомеризації – використання адсорбентів фенілборної кислоти, алюмінату натрію, можливість поєднання процесів ізомеризації та очищення; вивчають ефективність відділення залишків лактози з культуральної рідини шляхом обробки етанолом або біоконверсії лактози з дріжджами; а також досліджують процес отримання сухої субстанції лактулози за допомогою розпилювального сушіння.

Wang зі співавт. [63] використали для очистки лактулози функціоналізовані адсорбенти фенілборної кислоти, приготовані за допомогою простої та ефективної процедури шляхом прищеплення груп фенілборної кислоти на аміномакропористі смоли. Дані сорбенти володіли високою адсорбцією лактулози ($84,78 \pm 0,95$ мг/г сухої смоли) при нейтральних умовах (pH = 7). Чистоту лактулози при адсорбції при pH 7-8 та десорбції при pH 1,5 можна ефективно покращити залежно від співвідношення лактулози до лактози. Коли співвідношення лактулоза:лактоза $\geq 1:1$, можна отримати лактулозу з ступенем чистоти приблизно 95%.

Пізніше ці вчені [64] поєднали процес ізомеризації та одночасного очищення лактулози. В оптимізованих умовах сильно гідрофобна 4-вінілфенілборонова кислота (VPBA) сприяла селективній екстракції лактулози. Екстраговану лактулозу можна швидко (<10 хв.) екстрагувати назад у кислий розчин HCl у вигляді концентрованого розчину лактулози з вмістом 20 г/л, чистота якої складає більше 95%. Чистоту лактулози можна значно підвищити до 99,64% шляхом процесу періодичної екстракції або екстракції *in situ*. Видалення *in situ* новоутвореної лактулози, каталізованої $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{NaOH}$ шляхом селективної екстракції, значно сприяє підвищенню

виходу лактулози та мінімізує утворення побічних продуктів. Застосована екстракційна ізомеризація дозволила отримати вихід лактулози до ~70% (модель періодичної екстракції) та ~ 85% (модель екстракції *in situ*), з найнижчим вмістом побічних продуктів (<5%). Слід зазначити, що органічна фаза, в якій переважає VPBA, і водна фаза, що містить каталізатор, можуть бути легко регенеровані та використані багаторазово, що підтверджує їх доцільність у промисловому застосуванні.

Цими ж науковцями [65] досліджено, що алюмінат натрію демонструє високу ефективність у синтезі лактулози та запропоновано стратегію очищення лактулози шляхом обробки алюмінатом натрію, залишковий алюмінат натрію видаляли за допомогою іонообмінної смоли до прийняттого рівня та проводили подальше видалення солі шляхом нанофільтрації. В результаті було отримано високочисту (> 95%) лактулозу з виходом > 90%.

Guerrero зі співавт. [66] розробили метод видалення моносахаридів з розчину лактулози, отриманої ферментативним синтезом за допомогою β -галактозидази *Aspergillus oryzae*, шляхом селективної біоконверсії з *Saccharomyces cerevisiae* ATCC4126 та *Kluyveromyces marxianus* NRLLY-1109. Встановлено, що моносахариди були повністю вилучені за допомогою *S. cerevisiae* та *K. marxianus* без будь-яких добавок поживних речовин. Продукт, що не містить моносахаридів, містив 28% лактулози та 20% олігосахаридів, аналогічно комерційному препарату галакто-олігосахаридів. Слід зазначити, що є можливість відновлення та повторного використання дріжджів протягом 2 послідовних партій.

Вченими встановлено, що розчинність лактози та лактулози в етанолі значно відрізняється. Враховуючи той факт, що на розчинність також впливає температура, Zanganeh зі співавт. [67] досліджували вплив етанолу і температури на процес відділення лактози з розчину, що містить лактозу (7%) та лактулозу (51,2%). Для цього відбирали 5 зразків насиченого розчину, що містить лактулозу і лактозу, та додавали 2 г, 3 г, 4 г, 5 г та 6 г етанолу. Після цього зразки витримували при температурах 25 ° C, 31 ° C і 37

°C, та вимірювали концентрація лактози та лактулози після процесу розділення за допомогою вискоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ). Результати показали, що етанол має більший вплив, ніж робоча температура в процесі очищення. Підвищення робочої температури призводить до більш високого ступеня очищення, через вплив температури на розчинність цукрів. Найбільша кількість лактози (86,9%) видаляється з розчину при температурі 37 ° C при співвідношенні доданого етанолу та розчину 6:2.

Вченими під керівництвом Долганюк [68] проведено дослідження можливості розпилювального сушіння розчину лактулози. Встановлено, що втрати продукту під час сушіння складають не більше 3,5%, а якісні показники отриманої лактулози задовольняють вимогам, що пред'являються нормативною документацією.

У наступній роботі цих науковців [68] здійснено визначення оптимальних параметрів процесу розпилювальної сушки лактулози. Встановлено, що оптимальним є використання для сушіння розчину лактулози з масовою часткою лактулози 40 ± 1 % (вихід сухої лактулози збільшується у 2 рази, порівняно з сушінням розчинів з масовою часткою 20 і 30 %). Найбільший вихід продукту (38,5%) отримано при температурі сушіння 140 ± 1 °C, швидкості подачі розчину 0,3-0,42 дм³/год і швидкості потоку повітря 15 м³/год.

Отже, очищення лактулози переважно здійснюється шляхом адсорбції, а видалення залишків лактози найчастіше здійснюють за допомогою екстракції, за допомогою наведених методів вдається отримати лактулозу зі ступенем чистоти до 95%.

ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

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

2.1. Передумови виробництва ЛЗ

Лактулоза (*4-O- β -D-галактопіранозил-D-фруктофураноза*) - це дисахарид, що складається з галактози та фруктози, з'єднаних між собою β -1,4-глікоозидним зв'язком. В останні роки лактулозі приділяється особлива увага через її широке використання в харчовій галузі, фармацевтичній промисловості та секторах кормів для тварин. Лактулоза має кілька застосувань для лікування хронічних закрепів, енцефалопатії та гіперамонемії. Як пребіотичний вуглевод, він може сприяти росту деяких корисних для здооров'я бактерій у шлунково-киишковому тракті, таких як біфідобактерії та лактобактерії, та інгібувати патогенні бактерії, такі як сальмонела.

Лактулозу можна синтезувати за допомогою хімічних або ферментативних методів. Раніше комерційне виробництво лактулози часто здійснювалось лужною ізомеризацією лактози. Хімічні каталізатори (такі як борна киислота, карбонат кальцію тощо) можуть підвищити ефективність за рахунок збільшення швидкості ізомеризації. Однак використання сильного лугу та борної киислоти може приизвести до утворення побічних продуктів і кориичневого кольору, що додає величезної складності етапам поділу та очищення продуктів, а також збільшує виробничі витрати та споживання енергії. Ці проблеми ообмежують розвиток хімічноого синтезу для виробництва лактулози, тому бажаним є біоконверсія для отримання лактулози ферментами.

					НУХТ БТЕК 02.02.08 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Піддубняк К.С.			РОЗДІЛ 2. ТЕХНІКО- ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ		Літ.	Арк.
Перевір.		Карлаш Ю.В.						46
Консультант								15
Н. Контр.							46 Кафедра БТМ	
Затверд.		Стабніков В.П.						

Як β -галактозидаза, так і целобіоза 2-епімераза (СЕ) можуть бути використані для ферментативного виробництва лактулози. β -галактозидазу використовували для отримання лактулози за допомогою реакції трансгалактозилювання з лактозою та фруктозою, але її низький вихід (менше 30%) не може бути придатним для масового промислового виробництва лактулози. СЕ може перетворити залишок глюкози в кінці β -1,4-зчеплених олігосахаридів у залишок манноози і був вперше виявлений у *Ruminococcus albus*. Досліджували СЕ різних мікроорганізмів прокаріотів. Згідно з літературою, СЕ від *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* (CsCE) є найбільше ефективним ферментом для ізомеризації лактози в лактулозу через її додаткову здатність каталізувати реакцію ізомеризації залишку D-глюкози у залишок D-фруктози.

Основні галузі використання лактулози:

- продукти дитячого харчування (7%),
- продукти функціонального харчування (57%),
- медичні препарати (22%)
- корми для сільськогосподарських тварин (14%) [69-70].

Лактулоза була вперше описана в 1929 р. під назвою «лактокетоза». У 1959 р. була показана її придатність для лікування закрепу в дітей. У 1966 р. S. Bircher уперше представив результати клінічного дослідження і повідомив про успішне лікування печінкової енцефалопатії (ПЕ) за допомогою препарату лактулози.

Результати клінічних досліджень стали основою стандартизації та промислового отримання лактулози як фармацевтичного препарату - вперше в Японії (1975 г.) і США (1977 р), а потім затвердження цього дисахариду як інгредієнта здорового харчування (1992). Лактулозу стали застосовувати спочатку в Японії в сумішах - замінниках жіночого молока і біфідовмісних кисломолочних напоях, а потім і в інших країнах в різних функціональних харчових продуктах. Як наслідок, світове виробництво лактулози збільшилося з 20 тис. тон в 1994 р до 45 тис.тон в 2009 р. [71].

Перші публікації, присвячені можливості клінічного застосування лактулози, згодом були доповнені численними дослідженнями, які підтвердили ефективність лактулози у разі її використання за різними напрямками – як засіб для лікування:

- закріпів (хронічних);
- дисбактеріозу кишечника;
- інтоксикацій різного генезу;
- гіперхолестеринемії;
- печінкової енцефалопатії;
- печінкової недостатності;
- печінкової прекоми та коми;
- цирозу печінки з тенденцією до гіперамоніємії.

Крім того, при прийомі лактулози відмічається низька частота побічних ефектів навіть у грудних дітей з перших днів життя, у вагітних і жінок, які годуують грудьми. Тривале застосування лактулози не супроводжується такими небажаними явищами, як втрата електrolітів або розвиток толерантності, що спостерігаються при застосуванні інших проносних засобів [72].

Отже, лактулоза є ефективним і безпечним засобом, тому її виробництво є досить актуальним.

2.1.1. Аналіз фармакологічних властивостей цільового ЛЗ, галузей використання

Лактулоза надає осмотичну проносну дію, стимулює розмноження молочнокислих бактерій і перистальтику товстої кишки. Також лактулоза знижує концентрацію іонів амонію в крові на 25-50% і зменшує вираженість гепатогенної енцефалопатії, покращує психічний стан і нормалізує активність головного мозку. Лактулоза є єдиним з проносних засобів ефективним і безпечним у всіх вікових групах препаратом, допущеним до застосування в педіатричній практиці [69].

Препарати, що містять лактулозу, застосовуються при наступних показаннях:

- запор - регуляція фізіологічного ритму кишечника;
- печінкова енцефалопатія - лікування і профілактика печінкової коми і прекоми

Лактулозу в промислових кількостях синтезують з лактози, яку, в свою чергу, виробляють з підсирної сироватки, відходів при виробництві молока і молочних продуктів. Білий порошок, добре розчинний у воді. Продукт виробництва в якості домішок може містити галактозу (не більше 16%), лактозу (12%), епілактозу (8%), фруктозу (1%) [73].

Крім цього, лактулоза є пребіотиком, при щоденному застосуванні 3 г лактулози з молоком впродовж 2 тижнів вміст біфідобактерій у мікрофлорі кишечника збільшується з 8,3 до 47,7%, а кількість клостридій значно зменшується.

При надходженні лактулози в організм, вона в незмінному вигляді досягає товстого кишечника, де розкладається ферментами біфідо- і лактобактерій до органічних кислот: молочної, оцтової, масляної, які знижують рН кишечника, тим самим пригнічуючи розвиток гнилісної мікрофлори, а також стимулюючи перистальтику кишечника, посилюючи вміст води у тонкій кишці.

Після прийому лактулози також суттєво знижується вміст токсичних метаболітів (аміаку, індолу) і ферментів (β -глюкуронідази, нітроредуктази, азоредуктази).

Також, доведено вплив лактулози на зниження концентрації інших токсичних продуктів білкового розпаду, в тому числі амінів і фенольних сполук. Прийом лактулози в дозі 3 г на доббу протягом 2 тижнів значно знижував рівень індолу і фенолу в фекаліях дорослих здорових людей.

Застосування лактулози сприяє абсорбції кальцію, тому вона може застосовуватися для профілактики остеопорозу.

Можливі механізми впливу лактулози на засвоєння мінеральних речовин і профілактику остеопорозу можуть бути пов'язані з трансформацією нерозчинних неорганічних солей в розчинні, що збільшує їх всмоктування в кишечнику; з підтримкою і захистом абсорбційної поверхні в кишечнику; збільшенням синтезу кальцій-зв'язуючих білків.

Встановлено можливість застосування лактулози якості лікарського засобу при лікуванні запальних захворювань печінки і післяопераційних ускладнень, основною причиною яких вважається проникнення з просвіту шлунково-кишкового тракту вкрово-або лімфо течію грамнегативних мікроорганізмів і компонентів їх клітин, що грають роль ендотоксинів.

Встановлено можливість застосування лактулози (в дозуванні 60 г на добу протягом 30 днів) для активізації імунітету, пригніченого цирозом печінки або інфекційними захворюваннями, у людей похилого віку. Одним з гіпотетичних механізмів прямої дії лактулози є її вплив на вільні радикали. *In vitro* лактулоза надає протективну дію на стан мембран еритроцитів.

Застосування лактулози (27-33 г на добу протягом 10 днів) при лікуванні хворих на цукровий діабет 2 типу дозволило знизити концентрацію глюкози в їх крові.

Показаний профілактичний ефект лактулози щодо інфекцій сечостатевої системи. Зад опомогою лактулози можна попереджати вагінальні і кишкові мікози. У нещодавно проведеному дослідженні встановлено, що в культурах *in vitro* лактулоза стимулює розвиток лактобацил піхви, але не викликає зростання збудників кандидозів *Candida albicans* або мікроорганізмів, пов'язаних з бактеріальним вагінозом (*Atopobium vaginae*, *Gardnerella vaginalis*, *Prevotella bivia*), тому може вважатися перспективним пребіотиком для відновлення вагінальної мікробіоти.

Також лактулоза виявляє антиканцерогенну дію, пов'язану з активацією імунної системи клітинами біфідобактерій [75].

Якщо до кінця XX століття основним напрямком застосування лактулози вважалася медицина, то до 2016 року обсяги її виробництва в якості

функціонального інгредієнта для продуктів здорового харчування склали більше 70% всього ринку лактулози, який в цілому оцінюється на рівні 50 тис. тон в рік.

Стимулом до розширення асортименту харчових продуктів з цим пребіотиком стало його визнання в якості харчового інгредієнта в ряді країн. Першими промислово виробленими продуктами з лактулозою стали адаптовані суміші для дитячого харчування і функціональні кисломолочні напої.

Потім лактулозу стали додавати різні напої, хлібобулочні, кондитерські вироби і навіть в м'ясні продукти. Однак основною областю застосування лактулози є різноманітні молочні продукти.

Якщо у виробництві молока і сумішей для дитячого харчування на молочній основі лактулозу використовують в якості пребіотика, то в заквасках і кисломолочних продуктах вона може виконувати інші функції, наприклад фактора росту бактерій і захисного агента (кріопротектор) для підвищення їх виживання.

Встановлено, що внесення лактулози підвищує виживаність *B. bifidum*, *Lactobacillus acidophilus* і *L. casei* в замороженому йогурті, а також *L. rhamnosus* і *B. bifidum* в йогуртах при зберіганні при 4 °C протягом 5 тижнів.

Нещодавно розроблена технологія кисломолочних кефірних біопродуктів, що містять лактулозу, пробіотичні бактерії (*Bifidobacterium bifidum*, *B. longum*, *B. breve*), а також імуноглобулін, і показана здатність цих продуктів пригнічувати ріст і розмноження *Salmonella typhimurium*, *Proteus mirabili*, *Escherichia coli*, *Shigella sonnei*. Отримані результати дозволяють припустити, що розроблені продукти можна застосовувати з метою профілактики корекції порушень кишкової мікрофлори і дисбіотичних порушень, в тому числі гострих кишкових інфекцій.

В останнє десятиліття активно ведуться роботи в галузі біотехнології похідних лактулози, що володіють корисними фізіологічними ефектами і функціонально-технологічними властивостями. В реакції гідролізу лактулоза

діє в якості донора галактозильного фрагмента, але в подальшій реакції перенесення є його акцептором, що дозволяє синтезувати нові сполуки на основі лактулози з поліпшеною пребіотичною активністю [69].

2.1.2. Обсяг ринку та очікувані темпи його розвитку

Загальний обсяг виробництва лактулози в світі складає близько 36 000 тонн на рік. Це більше, ніж виробництво будь-якого іншого з відомих в даний час біфідогенних олігосахаридів [75].

Глобальний обсяг ринку лактулози у 2020 році склав 157,2 млн доларів США, і очікується, що до кінця 2026 року його досягне 201,9 млн доларів США, а в 2021-2026 роках ринок зросте ще на 3,6%.

В даний час на світовому ринку лактулози існує кілька компаній-виробників. Основними гравцями ринку є Abbott, Morinaga, Solactis, Fresenius Kabi і Illovo. А виробники в основному зосереджені в Європі і Канаді [75].

2.1.3. Вибір форми випуску лікарського засобу

На даний час препарати, що містять лактулозу, випускаються у формі сиропу [76], таблеток [77], а також у формі твердих желатинових капсул [78].

Переваги та недоліки наведених лікарських форм [79] представлені у *табл. 2.1.*

Переваги та недоліки лікарських форм

Лікарська форма	Переваги	Недоліки
Тверді желатинові капсули	✓ точність дозування та висока біодоступність; ✓ гарний зовнішній вигляд; ✓ легко проковтуються, швидко набухають; ✓ желатинові капсули легко розчинні, вони проникні для травних соків; ✓ лікувальна дія лікарської речовини проявляється швидко (у середньому через 4–5 хв); ✓ шляхом введення до складу желатинових стінок допоміжних речовин або покриття спеціальними плівками вдається одержувати капсули з різною швидкістю вивільнення та локалізацією дії лікарської речовини; ✓ оболонка з желатину захищає лікарську форму від впливу повітря, світла, вологи, пилу, захищає від механічних зовнішніх впливів, коливань температури; ✓ вміщення в оболонку зручне для відпускання речовин, що мають неприємний смак, запах та колір, тому капсули дуже перспективні для застосування в педіатрії і геронтології; ✓ виготовлення капсул майже цілком механізоване та автоматизоване.	✓ у желатинових капсулах можуть відпускатися тільки ті речовини, що не вступають у взаємодію із гліцерином і желатином та не розчиняють їх; ✓ желатинова маса є прекрасним середовищем для розвитку мікроорганізмів; ✓ висока чутливість до вологи-гігроскопічність.

Лікарська форма	Переваги	Недоліки
Таблетки	✓ зручність застосування точність дозування; ✓ можливість сполучати несумісні зафізикохімічними властивостями і терапевтичній дії лікарські речовини; ✓ можливістьмаскування неприємногозапаху, смаку, кольору й здатності до забарвлення ✓ висока компактність;можливість повної механізації й автоматизаціївиробництва; гігієнічність і масовість виробництва; ✓ стійкість до впливу несприятливихмеханічних і кліматичних факторів; ✓ зручність транспортування, зберіганняй відпускання, тривалий строк придатності.	○ Дія лікарських речовин може розвиватися відносно повільно. ○ При тривалому зберіганні деякі таблетки можуть цементуватися, що призводить до зміни часу розпадання. Таблетки неможливо ввести хворому при блюоті, у непритомному стані. ○ Не всі хворі, особливо діти, можуть вільно проковтувати таблетки.До складу таблеток часто вводяться баластні речовини, що не мають терапевтичної цінності, які іноді викликають деякі побічні явища (наприклад, тальк подразнює слизові оболонки).
Сиропи	✓ Лікарські речовини знаходяться в розчиненому або подрібненому вигляді, що полегшує та пришвидшує всмоктування, обумовлює настання більш швидкого ефекту, ніж при прийомі в інших формах; ✓ Приймати зручніше, ніж, наприклад, таблетки; ✓ Приємний запах і смак.	○ Більшість нестійкі при зберіганні. ○ Можлива зміна концентрації при зберіганні. ○ Неточний спосіб дозування, оскільки дозує пацієнт (ложками, краплями). ○ Добре середовище для розвитку мікроорганізмів.

Таким чином, проаналізувавши дані переваги та недоліки, можна зробити висновок, що таблетки, у порівнянні з сиропами, мають повільнішу терапевтичну дію, можуть псуватися при зберіганні, містять більше баластних речовин та менш зручні для ковтання. У зв'язку з тим, що лікарські речовини у сиропі знаходяться в розчиненому або подрібненому вигляді, що полегшує та пришвидшує всмоктування, обумовлює настання більш швидкого ефекту, ніж при прийомі таблеток або ТЖК.

Отже, найкращою лікарською формою для виробництва лактулози є сироп, так як дана форма володіє високою біодоступністю у порівнянні з твердими лікарськими формами, і вона обумовлена тим, що лікарська речовина знаходиться у розчиненому стані. Крім того, пероральний спосіб прийому є найбільш комфортним у педіатрії, якнай більш простий та природний. Коригування смаку, як правило, потребують речовини з гірким, солоним або кислим смаком. Оскільки лактулоза має солодкий смак, вводити до складу сиропу коригенти смаку немає необхідності.

При виборі допоміжних речовин для сиропів стоїть завдання зведення до мінімуму властивих їм як лікарської форми недоліків – нестійкості при зберіганні та використанні після розкриття упаковки. З метою підвищення розчинності лікарських речовин, запобігання окисно-відновлювальним процесам при зберіганні та використанні до складу сиропів вводиться стабілізатор, а саме лимонна кислота [80].

2.1.4. Опис лікарського засобу згідно АНД (проект АНД)

АНАТОМАРНО-ТЕРАПЕВТИЧНА СИСТЕМА КЛАСИФІКАЦІЇ ЛЗ

Сироп на основі лактулози, у Анатомарно – терапевтичній системі класифікації (АТС) займає наступне місце [81]:

А Шлунково-кишковий тракт та обмін речовин

A06 Лікарські засоби, що застосовуються для лікування закреп

A06A Лікарські засоби, що застосовуються для лікування закреп

A06AD Осмотичні проносні засоби

A06AD11 Лактулоза

В Кровотворення та кров

С Серцево-судинна система

Д Дерматологія

Г Сечостатева система та статеві гормони

Н Гормони для системного застосування (виключаючи статеві гормони та інсулін)

Ж Протимікробні препарати системного застосування

L Антинеопластичні та імуномодулюючі засоби

M Кістково-м'язева система

N Нервова система

P Протипаразитарні препарати, інсектициди і репеленти

R Дихальна система

S Препарати для лікування захворювань органів чуття

V Інші препарати

ХАРАКТЕРИСТИКА КІНЦЕВОЇ ПРОДУКЦІЇ ВИРОБНИЦТВА. СИРОП НА ОСНОВІ ЛАКТУЛОЗИ. ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА.

Склад: діюча речовина: лактулоза; допоміжні речовини: вода очищена.

1 мл препарату містить 670 мг лактулози.

Лікарська форма: Сироп.

Основні фізико-хімічні властивості: прозора в'язка рідина, безбарвна або з легким жовтуватокоричневим кольором, змішується з водою. Насичений розчин препарату може містити кристали, які зникають при нагріванні.

Фармакодинаміка:

Лактулоза – синтетична похідна лактози. Не розпадається у шлунку та тонкому кишечнику через відсутність відповідних ферментів і практично не всмоктується. У товстому кишечнику лактулоза розщеплюється під дією мікрофлори на низькомолекулярні органічні кислоти, внаслідок чого знижується рН і відбуваються осмотичні зміни, які стимулюють перистальтику кишечника. Також збільшується об'єм калових мас, що сприяє нормалізації процесу дефекації. Лактулоза як пребіотик посилює ріст біфідо- та лактобактерій, завдяки чому відбувається пригнічення росту патогенної мікрофлори кишечника (зокрема таких патогенів, як клостридія та кишкова паличка).

При печінковій енцефалопатії або печінковій (пре)комі лікувальний ефект лактулози пов'язаний з пригніченням росту протеолітичних бактерій за рахунок збільшення кількості ацидофільних бактерій (наприклад лактобацил), трансформацією аміаку в іонізовану форму завдяки

підкисленню вмісту кишечника, проносним ефектом за рахунок низького рН і осмотичного ефекту, зміною метаболізму азоту в бактеріях через стимуляцію утилізації бактеріями аміаку для синтезу протеїну.

Фармакокінетика:

Препарат майже не всмоктується у кишечнику, в дозі 40-75 мл повністю метаболізується бактеріальною флорою. При застосуванні вищих доз частина лактулози може виводитися у незміненому вигляді.

Показання:

- Закрепи: регуляція фізіологічного ритму кишечника;
- стани, що потребують полегшення дефекації (геморой, після операцій на товстому кишечнику та аноректальній зоні);
- портосистемна печінкова енцефалопатія (PSE): лікування та профілактика печінкової прекоми й коми.

Протипоказання:

- Підвищена чутливість до діючої речовини або до інших компонентів препарату;
- галактоземія;
- гострий біль в абдомінальній ділянці невідомого походження;
- нудота, блювання;
- шлунково-кишкова непрохідність/стеноз кишечника;
- перфорація травного тракту або ризик перфорації травного тракту (наприклад, гострі запальні захворювання кишечника, такі як виразковий коліт, хвороба Крона);
- ректальні кровотечі;
- тяжке зневоднення.

Взаємодія з іншими лікарськими засобами та інші види взаємодії:

При одночасному застосуванні з антибіотиками широкого спектра дії або антацидами можливе зниження терапевтичної ефективності лактулози.

Лактулоза може збільшувати втрату калію, індуковану іншими препаратами (наприклад, *тіазідами*, *кортикостероїдами* та *амфотерицином В*).

Однчасне застосування з *серцевими глікозидами* може посилювати ефекти глікозидів через дефіцит калію.

Можливий синергічний ефект з *неоміцином*.

Не рекомендується приймати Нормолакт впродовж 2 годин після прийому інших лікарських засобів.

Особливості щодо застосування:

Консультація лікаря рекомендована, якщо:

- перед початком лікування наявні болісні симптоми у ділянці живота невизначеного походження;
- терапевтичний ефект впродовж кількох днів лікування є недостатнім.

З урахуванням кількості цукру, що міститься в препараті, доза, яку зазвичай застосовують для лікування закрепів, не викликає проблем у пацієнтів з цукровим діабетом. Проте для лікування печінкової (пре)коми зазвичай призначають набагато вищі дози, тому слід враховувати вміст цукру в препараті при лікуванні хворих на цукровий діабет.

100 мл сиропу містять ~1,4 хлібні одиниці.

При гастрокардіальному синдромі варто підвищувати дозу поступово, щоб уникнути метеоризму.

Тривале застосування препарату (більше 6 місяців) без підбору доз або неправильне застосування може призвести до виникнення діареї та електролітного дисбалансу. У серйозних випадках можливе зневоднення або гіпокаліємія. Гіпокаліємія може викликати серцеві або нервово-м'язові дисфункції, особливо у разі супутнього лікування серцевими глікозидами, діуретиками або кортикостероїдами. Слід регулярно контролювати рівень електролітів у плазмі крові, особливо у літніх та ослаблених пацієнтів.

Пацієнтам зі шлунково-серцевим синдромом (синдромом Ремхельда) лактулозу слід застосовувати лише після консультації з лікарем. Якщо такі симптоми, як метеоризм та здуття, спостерігаються у зазначених пацієнтів після прийому лактулози, дозу слід зменшити або припинити лікування.

Препарат містить лактозу, галактозу та незначну кількість фруктози, тому пацієнтам з рідкісною спадковою непереносимістю галактози або фруктози, недостатністю лактази або глюкозо-галактозною мальабсорбцією не слід приймати цей препарат.

Застосування у період вагітності або годування груддю:

Вагітність: під час вагітності не очікується будь-яких наслідків для плода, оскільки системний вплив лактулози на вагітну є незначним. При необхідності сироп лактулози можна застосовувати у період вагітності.

Період годування груддю: під час годування груддю не очікується будь-яких ефектів у новонародженого/немовляти, оскільки системний вплив лактулози на матір є незначним. Нормолакт можна застосовувати під час годування груддю.

Фертильність: не очікується будь-яких ефектів, оскільки системний вплив лактулози є незначним.

Здатність впливати на швидкість реакції при керуванні автотранспортом або іншими механізмами: прийом сиропу лактулози не впливає або має незначний вплив на здатність керувати автотранспортом або іншими механізмами.

Спосіб застосування та дози:

Приймати внутрішньо, як розведеним, так і нерозведеним. Дозу потрібно підбирати, виходячи з клінічного ефекту (табл. 2.2). Режим прийому препарату слід підбирати залежно від індивідуальних потреб пацієнта. Небажано перевищувати рекомендовані дози.

Дозування при закрепах або при станах, що потребують полегшення дефекації

Вікова група	Початкова добова доза	Підтримуюча добова доза
	мл	мл
Діти віком до 1 року	5	5
Діти віком від 1 до 6 років	5-10	5-10
Діти 7-14 років	15	10-15
Дорослі та діти віком від 14 років	15-45	15-30

***Примітка:** Дітям віком до 1 року дозу препарату відмірюють відповідно до шкали, зазначеної на мірній ложці, яка додається.

Разову дозу краще приймати за один прийом (не утримуючи в ротовій порожнині тривалий час) завжди в один і той же час доби, наприклад зранку під час сніданку. Можливе змішування із фруктовими та овочевими соками або харчовими сумішами. Ефект може спостерігатися через 1-2 дні, що обумовлено дією лактулози.

Під час терапії проносними засобами рекомендується вживати достатню кількість рідини

(1,5-2 літри, що відповідає 6-8 склянкам) на добу.

При печінковій енцефалопатії, печінковій комі та прекомі препарат призначати у початковій дозі для дорослих 30-45 мл 3-4 рази на добу.

Підтримуючу дозу встановлювати залежно від індивідуальної реакції (слід досягти 2-3 м'яких випорожнень на добу).

Безпека та ефективність застосування препарату дітям (0-18 років) з портосистемною енцефалопатією не були встановлені. Дані відсутні.

Пацієнти літнього віку та пацієнти з нирковою або печінковою недостатністю.

Оскільки системний вплив лактулози є незначним, особливих рекомендацій щодо дозування для цих груп пацієнтів немає.

Діти. Проносні засоби слід застосовувати дітям лише у виняткових випадках та під контролем лікаря. Немає даних про застосування препарату дітям при печінковій енцефалопатії.

Необхідно мати на увазі, що рефлекс випорожнення кишечника може бути порушений під час лікування.

Передозування: зловживання проносними (часте або тривале застосування у надмірних дозах) може призвести до болю у животі та постійної діареї із подальшою втратою води, мінеральних солей (особливо калію) та інших необхідних поживних речовин. У серйозних випадках можливе зневоднення або гіпокаліємія. Гіпокаліємія може викликати серцеві або нервово-м'язові дисфункції, особливо у разі супутнього лікування серцевими глікозидами, діуретиками або кортикостероїдами. Специфічного антидоту не існує, рекомендовано зменшити дозу або припинити прийом препарату. Надмірна втрата рідини внаслідок блювання та діареї може потребувати корекції електролітного балансу. Після припинення застосування сиропу лактулози ці симптоми зникають.

Побічні ефекти:

Протягом перших днів лікування може виникнути метеоризм, який зазвичай минає через кілька днів. При застосуванні препарату у дозах, що перевищують рекомендовані, може виникнути біль у животі та діарея. У такому разі дозу потрібно зменшити. У разі застосування високих терапевтичних доз протягом тривалого часу (зазвичай тільки при печінковій енцефалопатії) може спостерігатися електролітний дисбаланс унаслідок діареї.

Травний тракт: діарея, метеоризм, біль у животі або коліки, нудота і блювання.

Відхилення лабораторних показників: електролітний дисбаланс унаслідок діареї (зазвичай тільки у пацієнтів з портосистемною енцефалопатією).

Інше: головний біль, запаморочення, підвищена втомлюваність, слабкість, реакції гіперчутливості, міалгія та аритмія.

Термін придатності:

2 роки.

Умови зберігання:

Зберігати в оригінальній упаковці при температурі не вище 25 °С.

Зберігати в недоступному для дітей місці.

Упаковка:

По 200 мл в полімерному флаконі і пачці разом з мірною ложкою [82].

СПЕЦИФІКАЦІЯ
на сироп на основі лактулози

Таблиця 2.3

Найменування показника	Допустимі межі	Методи контролю
Опис	Прозора в'язка рідина, безбарвна або злегка жовтувато-коричневого кольору, змішується з водою. Насичений розчин препарату може містити кристали, які зникають при нагріванні.	За п.1, візуально
Ідентифікація	Метод ВЕРХ - час утримування лактулози на хроматограмі випробуваного розчину має відповідати часу утримування на хроматограмі розчину стандартного зразка лактулози (близько 18 хв). Якісна реакція - повинен утворитися осад червоного кольору.	За п. 2
Супровідні домішки	-Площа піку домішки В не повинна перевищувати триразової площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (не більше 15,0%); -площі піків домішок А і С не повинні перевищувати двократної площі основного	За п. 3

	піка на хроматограмі розчину порівняння (не більше 10,0%); -сумарна площа піків всіх домішок, за винятком домішок В і С, не повинна перевищувати 2,4 площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (не більше 12,0%).	
pH	3,0-7,0	За п. 4, ДФУ, 2.2.3
Мікробіологічна чистота	Загальне число життєздатних аеробних мікроорганізмів: не більше 10^3 бактерій і не більше 10^2 грибів у грамі. Відсутність бактерій родини <i>Enterobacteriaceae</i> в 1 г. Відсутність <i>Pseudomonas aeruginosa</i> в 1 г. Відсутність <i>Staphylococcus aureus</i> в 1 г.	За п. 5, ДФУ, 2.6.12,N, 2.6.13; N; 5.1.4, N (категорія 3 А)
Об'єм, що витягається	Середнє значення об'єму вмісту 30 флаконів повинна становити не менше 100% (200 мл) від об'єму, зазначеного на етикетці, і об'єм не більше ніж одного з 30 флаконів може бути менше 95% (190 мл), але не менше 90% (180 мл)	За п. 6, ОФС.1.4.2.0002.15
Густина	Від 1,30 до 1,38 г/см ³	За п. 7, ОФС.1.2.1.0014.15
Кількісне визначення	Вміст лактулози в 1 мл сиропу має становити від 637 до 704 мг	За п. 8
Зберігання	Зберігати в оригінальній упаковці при температурі не вище 25 °С.	
Термін придатності	2 роки.	

МЕТОДИ КОНТРОЛЮ

1. Опис. Прозора в'язка рідина, безбарвна або злегка жовтуватокоричневого кольору, змішується з водою. Насичений розчин препарату може містити кристали, які зникають при нагріванні [82].

2. Ідентифікація [83]

1). **Метод ВЕРХ (п.3).** Час утримування лактулози на хроматограмі випробуваного розчину має відповідати часу утримування на хроматограмі розчину стандартного зразка лактулози (близько 18 хв).

2). **Якісна реакція.** Наважку сиропу, що містить близько 50 мг лактулози, змішують з 10 мл води, додають 3 мл мідно-тартратного реактиву і нагрівають; повинен утворитися осад червоного кольору.

3. **Визначення супровідних домішок [83]**

Визначення проводять методом ВЕРХ.

Рухома фаза (ПФ). У мірну колбу місткістю 1 л поміщають 0,253 г натрію дигідрофосфату дигідрату поміщають в мірну колбу місткістю 1 л, розчиняють в 200 мл води і доводять об'єм розчину ацетонітрилом до мітки.

Випробуваний розчин. Наважку сиропу, що містить близько 2,0 г лактулози, поміщають в мірну колбу місткістю 50 мл, змішують з 20 мл води, додають 25 мл ацетонітрилу при акуратному нагріванні для підтримки кімнатної температури і доводять об'єм розчину водою до мітки.

Розчин порівняння. У мірну колбу місткістю 100 мл поміщають 5,0 мл випробуваного розчину, додають 47,5 мл ацетонітрилу при акуратному нагріванні для підтримки кімнатної температури і доводять об'єм розчину водою до мітки.

Розчин стандартного зразка домішки D. Близько 65 мг стандартного зразка фруктози поміщають в мірну колбу місткістю 100 мл розчиняють в суміші ацетонітрил - вода 1: 1 і доводять об'єм розчину тим же розчинником до мітки.

Розчин для ідентифікації піків. Близько 1,0 г стандартного зразка лактулози для ідентифікації піків поміщають в мірну колбу місткістю 25 мл, розчиняють в розчині стандартного зразка домішки D і доводять об'єм розчину тим же розчинником до мітки.

Розчин для перевірки чутливості хроматографічної системи. У мірну колбу місткістю 100 мл поміщають 5,0 мл розчину порівняння і доводять об'єм розчину сумішшю ацетонітрил - вода 1: 1 до мітки.

Примітка:

- Домішка А: β -D-галактопіранозіл-(1 $\rightarrow$ 4)-D-маннопіраноза, CAS 20869-27-6;
- домішка В: D-галактопіраноза, CAS 1166228-30-3;
- домішка С: β -D-галактопіранозіл-(1 $\rightarrow$ 4)-D-глюкопіраноза, CAS 63-42-3;
- домішка D: D-фруктопіраноза, CAS 6347-01-9;
- домішка Е: D-тагатопіраноза, CAS 41847-61-4;
- домішка F: 2 (гідроксиметил) оксолан-2,4-діол, PubChem 85738091.

Хроматографічні умови:

- Колонка 1 5,0 $\times$ 0,46 см, силікагель амінопропілсілільний для хроматографії, 3 мкм;
- Колонка 2 15,0 $\times$ 0,46 см, силікагель амінопропілсілільний для хроматографії, 3 мкм;
- Температура колонок 38 ± 1 °C;
- Швидкість потоку 1,0 мл / хв;
- Детектор рефрактометричний, термостатуємий;
- Об'єм проби 20 мкл;
- Час хроматографування 2-кратне від часу утримування лактулози.

Хроматографують розчин для ідентифікації піків, розчин для перевірки чутливості хроматографічної системи, розчин порівняння і випробуваний розчин.

Придатність хроматографічної системи. На хроматограмі розчину для ідентифікації піків відношення r/v між піками домішки А і лактулози має бути не менше 5,0.

На хроматограмі розчину для перевірки чутливості хроматографічної системи ставленн сигнал / шум (S / N) для піку лактулози має бути не менше 10.

Відносні часи утримування з'єднань. Лактулоза - 1 (близько 18 хв); домішка F - близько 0,2; домішка E - близько 0,38; домішка D - близько 0,42; домішка B - близько 0,6; домішка A - близько 0,9; домішка C - близько 1,2.

Допустимий вміст домішок. Нахроматограмі випробовуваного розчину:

- площа піку домішки B не повинна перевищувати триразової площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (не більше 15,0%);
- площі піків домішок A і C не повинні перевищувати двократної площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (не більше 10,0%);
- площі піків домішок E і F не повинні перевищувати 0,8 площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (не більше 4,0%);
- площа піку домішки D не повинна перевищувати 0,2 площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (не більше 1,0%);
- площа піку будь-якої неідентифікованої домішки не повинна перевищувати 0,1 площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (не більше 0,5%);
- сумарна площа піків всіх домішок, що елюються після домішки F, не повинна перевищувати 0,26 площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (не більше 1,3%);
- сумарна площа піків всіх домішок, за винятком домішок B і C, не повинна перевищувати 2,4 площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (не більше 12,0%).

Не враховують піки, площа яких менше площі основного піка на хроматограмі розчину для перевірки чутливості хроматографічної системи (менше 0,25%).

4. рН. (ДФУ 2.2.3)

Випробовуваний розчин: Потенціометричне визначення рН випробовуваного розчину проводять шляхом вимірювання різниці потенціалів між двома відповідними електродами, зануреними у випробовуваний розчин: один з електродів чутливий до іонів водню

(звичайно скляний електрод), другий – електрод порівняння (наприклад, насичений каломельний електрод).

Усі виміри проводять при тій самій температурі в інтервалі від 20 °С до 25 °С. рН має становити 3,0-7,0 [83].

5. Мікробіологічна чистота. (ДФУ п. 2.6.12, 2.6.13; N; 5.1.4, N (категорія 3 А)) [84]

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

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

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

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

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

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

Сироп лактулози має відповідати таким вимогам щодо мікробіологічної чистоти:

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

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

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

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

Також проводять випробування на окремі види мікроорганізмів.

Родина *Enterobacteriaceae*

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

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

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

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

Для ідентифікації бактерій род. *Enterobacteriaceae* підозрілі колонії, кожену окремо, пересівають на середовище № 1 (МПА), скошене в пробірках, і інкубують при температурі від 35 до 37 °C протягом 18-24 год. Після закінчення періоду інкубації підтверджують чистоту кожної культури і проводять тест на наявність цитохромоксидази. Культури, що дали негативну реакцію на цитохромоксидазу, пересівають, кожену окремо, у дві

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

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

Staphylococcus aureus

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

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

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

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

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

Pseudomonas aeruginosa

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

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

Ріст зеленуватих, як правило, флуоресціюючих колоній, блакитних в ультрафіолетовому світлі (що свідчить про наявність пігменту піоціаніну),

указує на можливість забруднення сиропу *P. aeruginosa*. У цьому випадку роблять пересівання підозрілих колоній, кожної окремо, в пробірки із скошеним густим середовищем № 1 й інкубують при температурі від 35 ° до 37 °С протягом 18-24 год. Колонії, що виростили на середовищі № 1, мікроскопують, при виявленні мазках тільки грамнегативних паличок, проводять тест на цитохромоксидазу. Сироп лактулози витримує випробування, якщо на середовищах не виявлений ріст грамнегативних паличок, що утворюють синьо-зелений пігмент піоціаніні дають позитивну реакцію на цитохромоксидазу.

6. Об'єм, що витягається (ОФС.1.4.2.0002.15)[85]

Відбирають 30 флаконів сиропу лактулози.

Струшують вміст кожного з 10 флаконів, обережно, щоб уникнути утворення повітряних бульбашок, виливають вміст кожного флакону в окремі сухі мірні, калібровані циліндри, місткість яких не більше ніж в 2,5 рази більше вимірюваного об'єму. Вмісту кожного флакону дають стікати протягом не більше 30 хв для недозованих препаратів. Після зникнення повітряних бульбашок вимірюють об'єм рідини в кожному циліндрі.

Лікарський препарат вважається таким, що витримує випробування, якщо середнє значення об'єму вмісту 10 флаконів не менше 100% (200 мл), і жоден з флаконів не повинен мати об'єм менш 95% (190 мл) від зазначеного на етикетці.

Якщо середнє значення об'єму вмісту 10 флаконів менше 100% (200 мл) від зазначеного на етикетці, але жоден з флаконів не має об'єм менше 95% (190 мл) або середнє значення об'єму вмісту 10 флаконів становить 100% (200 мл) і обсяг не більше ніж жодного флакону менше 95% (190 мл), але не менше 90% (180 мл) від зазначеного на етикетці, то виконують випробування на 20 додаткових флаконах.

Середнє значення об'єму вмісту 30 флаконів повинна становити не менше 100% (200 мл) від об'єму, зазначеного на етикетці, і об'єм не більше

ніж одного з 30 флаконів може бути менше 95% (190 мл), але не менше 90% (180 мл) від зазначеного на етикетці.

7. Густина (ОФС.1.2.1.0014.15) [86]

Визначення густини сиропу лактулози здійснюють з точністю до $\pm 0,01$ г/см³ за допомогою ареометра.

Випробувану рідину поміщають в циліндр і при температурі 20 °С обережно опускають в неї чистий сухий ареометр, на шкалі якого передбачена очікувана величина щільності. Ареометр не повинен торкатися стінок і дна циліндра. Через 3 - 4 хв після занурення ареометра роблять відлік по діленню шкали ареометра, відповідному нижньому меніску рідини.

Густина сиропу лактулози повинна становити від 1,30 до 1,38 г/см³.

8. Кількісне визначення [83].

Визначення кількості лактулози у сиропі здійснюють за методом ВЕРХ аналогічно умовам випробування «*Супровідні домішки*» (п. 3) з наступними змінами:

Розчин стандартного зразка лактулози. 2,0 г (точна наважка) стандартного зразка лактулози поміщають в мірну колбу місткістю 50 мл, розчиняють в 20 мл води і додають 25 мл ацетонітрилу при акуратному нагріванні для підтримки кімнатної температури і доводять об'єм розчину водою до мітки.

Хроматографують розчин стандартного зразка лактулози і випробуваний розчин.

Придатність хроматографічної системи. На хроматограмі розчину стандартного зразка лактулози:

- відносне стандартне відхилення площі піку лактулози має бути не більше 2% (6 визначень);

- ефективність хроматографічної колонки (N), розрахована за піку лактулози, повинна становити не менш як 2000 теоретичних тарілок.

Вміст лактулози в препараті у відсотках від заявленої кількості (X) розраховують за формулою:

$$X = \frac{S_1 \cdot a_0 \cdot 50 \cdot P \cdot \rho}{S_0 \cdot a_1 \cdot 50 \cdot L} = \frac{S_1 \cdot a_0 \cdot P \cdot \rho}{S_0 \cdot a_1 \cdot L}$$

де S_1 - площа піку лактулози на хроматограмі випробуваного розчину;

S_0 - площа піку лактулози на хроматограмі розчину стандартного зразка лактулози;

a_1 – наважка сиропу, мл;

a_0 - наважка стандартного зразка лактулози, г;

P - вміст лактулози в стандартному зразку лактулози, %;

L - заявлений вміст лактулози в сиропі, г/мл;

ρ - густина випробуваного розчину, г/см³

Вміст лактулози у сиропі повинен бути не менше 95% та не більше 105% від кількості, зазначеного в розділі "Склад". Вміст лактулози в 1 мл сиропу має бути від 637 до 704 мг.

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

Річна потужність біосинтезу лактулози складає **56 000** кг

Вміст лактулози в 100 мл препарату дорівнює 67,0 г. Тоді:

$$100 \text{ мл} - 66,7 \text{ г}$$

$$x \text{ мл} - 56\,000\,000 \text{ г}$$

Отже, на рік необхідно виготовити $x = (56\,000\,000 \text{ г} \times 100 \text{ мл}) / 67,0 \text{ г} = 83\,582\,089 \text{ мл сиропу} = 83\,582 \text{ л сиропу}$.

Планується випускати флакони з вмістом у ньому сиропу 200 мл. Продуктивність наповнювальної машини складає 2000 флаконів на годину. Прийmemo час роботи машини 8 годин. Отже, за один цикл наповнюється $2000 \times 8 = 16\,000$ флаконів або у перерахунку на об'єм сиропу у флаконі:

$$16\,000 \text{ флаконів} \times 200 \text{ мл} = 3\,200\,000 \text{ мл сиропу}$$

Тоді кількість серій на рік складає $83\,582\,089 / 3\,200\,000 = 27$ серій.

2.2. Розрахунок потреби у субстанції для випуску ЛЗ

За даними МОЗ України у структурі ускладнень захворювання на цироз печінки печінкова енцефалопатія складає 10-26 % (прийmemo середнє

значення 18%) [87]. Загальна кількість хворих на цироз печінки складає 160 на 100 000 населення [87]. Населення України становить 41 630 000 осіб [88], отже, кількість хворих в Україні складає:

160 осіб – 100 000 населення

x – 41 630 000 населення,

$x = 41\,630\,000 \times 160 / 100\,000 = 66\,608$ осіб, з них 18% страждає печінковою енцефалопатією: $66\,608 \times 18 / 100 = 11\,990$ осіб.

Кількість хворих на закреп складає 12-16% населення України[89]. Для розрахунку приймемо 14%. Отже, кількість хворих становить:

$x = 41\,630\,000 \times 14 / 100 = 5\,828\,200$ осіб.

Середня концентрація лактулози у сиропі різних виробників складає 670 мг/мл. Сиропи з лактулозою при запорах рекомендують приймати по 15-35 мл на добу. Приймаємо 20 мл на добу. Курс прийому - 14 діб.

Загальна кількість лактулози на курс складе

$G_{\text{лз}} = 670 \text{ мг/мл} \times 20 \text{ мл} \times 14 \text{ діб} = 187\,600 \text{ мг} = 0,19 \text{ кг}$

Кількість лактулози на усіх хворих на закреп

$G_{\text{зак}} = G_{\text{лз}} \times N_{\text{зап}} = 0,19 \text{ кг} \times 5\,828\,200 \text{ осіб} = \mathbf{1\,107\,358 \text{ кг}}$

А при печінковій енцефалопатії - початкова доза –3-4 рази на добу по 30-45 мл. Беремо 35 мл на добу [70].

Курс прийому становить 7-14 діб, для розрахунку приймемо 14 діб.

Загальна кількість лактулози на курс складе:

$G_{\text{леч}} = 670 \text{ мг/мл} \times 3 \text{ рази} \times 35 \text{ мл} \times 14 \text{ діб} = 984\,900 \text{ мг} = 1 \text{ кг}$

Кількість лактулозина усіх хворих на печінкову енцефалопатію

$G_{\text{ен}} = G_{\text{лз}} \times N_{\text{зап}} = 1 \text{ кг} \times 11\,990 = \mathbf{11\,990 \text{ кг}}$

Разом $G_{\Sigma} = G_{\text{зак}} + G_{\text{ен}} = 1\,107\,358 + 11\,990 = 1\,119\,348 \text{ кг}$

Узагальнюючі дані щодо потреби лактулозів Україні наведені у *табл.*

2.4.

Таблиця 2.4

Вихідні дані для розрахунку річної потреби в лактулозі

Захворювання	Доза препарату на добу, мг лактулози	Тривалість прийому, днів	Кількість лактулози на 1 людину, мг	Загальна кількість хворих	Загальна кількість лактулози на всіх хворих, кг
1	2	3	4	5	6
Закреп	13 400 мг лактулози в 20 мл сиропу	14	187 600	5 828 200	1 093 370
Печінкова енцефалопатія	23 450мг лактулози в 35мл	14	984 900	11 990	11 808, 951
Всього					1 105 179, 271

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

Найбільший виробник субстанції лактулози на світовому ринку в даний час -міжнародна корпорація Solway (заснована в Нідерландах, річний обсяг виробництва лактулози близько 10000 т). На основі лактулози, що випускає Solway, в різних країнах виготовляється ряд фармацевтичних препаратів з торговими назвами Duphalac, Bififeral, Chronulac, та ін. [87].

На ринок України субстанція лактулози постачається у формі сиропу 66,7% виробника «FRESENIUS KABI AUSTRIA, GmbH» (Австрія) та у вигляді кристалічної лактулози 99,8% виробника «Societa Chimica Mugello» (Італія)[73].

Наприклад, для виробництва таких препаратів, як Біофлоракс («Здоров'я народу», Україна), Лактуноорм («Дарниця»,Україна),Нормолакт(ПАТ НВЦ «Борщагівський ХФЗ», Україна)субстанцію лактулози постачає «FRESENIUS KABI AUSTRIA, GmbH».

Препарати на основі лактулози, що представлені на ринку України,випускаються у вигляді сиропів (табл. 2.5).

Препарати на ринку України, що містять лактулозу

Торгова назва	Форма випуску	Вміст лактулози	Виробник	Джерело
Дуфалак	Сироп	667 мг/мл	AbbottBiolodzhikalzB.V., Нідерланди	[1]
Медулак	Сироп	667 мг/мл	ABC FarmaceuticiS.p.A, Італія	[2]
Порталак	Сироп	667 мг/мл	Belupo, Хорватія	[3]
Лактунорм	Сироп	670 мг/мл	Дарниця, Україна	[4]
Нормолакт	Сироп	670 мг/мл	ПАТ НВЦ «Борщагівський ХФЗ», Україна	[5]
Біофлоракс	Сироп	670 мг/мл	«Здоров'я народу», Україна	[6]
Нормазе	Сироп	667 мг/мл	Л. Молтени И К. Л. Molteni&C.deiF.lliAlittiSocieta di EsercizioS.p.A. Італія	[7]

*Примітка: 1 - <https://apteka911.ua/shop/dufalak-sirop-fl-200ml-p808> , 2 -

<https://apteka911.ua/shop/medulak-sirop-667-0mg-ml-fl-180ml-p79510> , 3 -

<https://apteka911.ua/shop/portalak-sirop-667mg-ml-fl-500ml-1-p33419> , 4 -

<https://apteka911.ua/shop/laktunorm-sirop-670mg-ml-fl-500ml-p131575> , 5 -

<https://www.add.ua/normolakt-sirop-100ml-flakon.html> , 6 -

<https://apteka911.ua/shop/biofloraks-sirop-670mg-ml-fl-200ml-p30530> , 7 -

<https://apteka911.ua/shop/normaze-sirop-10g-15ml-fl-200ml-p1266>

2.2.2. Розрахунок потужності виробництва, кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера

Загальна кількість лактулози на всіх хворих становить **1 119 348 кг**.

Так як на ринку фармацевтичних препаратів існує багато засобів, що містять лактулозу, та багато хворих приймають інші засоби для лікування запору, то приймемо, що частка власного виробництва – 5%.

$$G_{\text{гп}} = 1\,119\,348 \text{ кг} \times 0,05 = 55\,967,4 = \mathbf{56\,000 \text{ кг}}.$$

Приймаємо до розрахунку річну потужність

$$G_{\text{гп}} = \mathbf{56\,000 \text{ кг/рік}}.$$

Вибір технологічного процесу отримання лактулози. Лактулозу можна отримувати шляхом біоконверсії лактози у лактулозу при використанні ферменту целобіозо–2-епімерази (CsCE) з подальшим

виділенням, очищенням і отриманням сухої субстанції для виробництва ЛЗ. За основу була взята технологія, що описана в статті [90]. Процес може бути реалізований в наступні такі два етапи:

I. Етап отримання ферменту в процесі біосинтезу культурою мікроорганізмів

1.1. Отримання супернатанту з культуральної рідини з активністю $A_{кр} = 5,3$ Од/мл [90].

1.2. Отримання сухого ферментного препарату зі стандартною активністю $A_{ст} = 160$ Од/г.

II. Етап біоконверсії лактози порошку молочної сироватки (ПМС) з вмістом лактози 75% в мембранному біореакторі [90].

2.1. При використанні розчину сухого ферментного препарату (CsCE) із стандартною активністю 160 Од/г.

2.2. При використанні супернатанту ферментного препарату (CsCE) із активністю 4,5 Од/мл [90].

Отримання супернатанту ферментного препарату (CsCE). У якості біологічного агента було використано генномодифікований штам *Bacillus subtilis* WB 800.

Склад ПС для ПМ: дріжджовий екстракт – 5г/л; пептон – 10 г/л; NaCl – 10 г/л.

Склад ПС для виробничого біосинтезу: цукроза – 15 г/л; дріжджовий екстракт – 15 г/л; кукурудзяний екстракт – 5 г/л; NaCl - 5 г/л; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,5 г/л, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ - 6 г/л; KH_2PO_4 - 2г/л.

Час культивування – 16 год, температура $t = 32$ °С, pH= 7,0. Концентрація біомаси – 7,5 г/л; Активність CsCE в КР – 5,3 Од/мл. Кількість ПМ – 5%, Температура – $T = 32$ °С. Кількість обертів мішалки – 500 об/хв. Аерація – 1 об'єм повітря/об'єм· хв.[10].

II. Біоконверсія лактози порошка молочної сироватки (ПМС)

У якості сировини для біоконверсії використовують порошок молочної сироватки (ПМС), вміст лактози в ПМС – 75%.

Підготовка розчину ПМС. ПМС розчиняють у фосфатному буфері (рН=7,0). Центрифугують 8000 g 20 хвилин для видалення твердих залишків. Концентрацію лактози у розчині ПМС визначають ВЕРХ.

Використання супернатанту КР після відділення біомаси для біоконверсії ПМС. Культуральну рідину центрифугують при 8000 g 20 хв. Фугат (супернатант) з активністю 4,5 Од/мл використовують для біоконверсії лактози ПМС.

Продуктовий розрахунок біоконверсії лактози ПМС при використанні супернатанту. Визначальним моментом для розрахунку кількості супернатанту і відповідно об'єму виробничого ферментера є об'єм біореактора для біоконверсії лактози.

1. Витрати CsCE на 1 л розчину ПМС (концентрація ПМС – $P_{\text{БК}} = 270$ г/л: лактози – 200 г/л) [90]

За даними [90] доза фермента - 50 мл розчину CsCE з активністю супернатанту $A_{\text{сн}} = 4,5$ Од/мл на 3 л розчину ПМС, визначаємо дозу ферменту на 1 розчину ПМС

$$A_{\text{ПМС}} = 50 \text{ мл} \cdot 4,5 \text{ Од/мл} / 3 \text{ л} = 75 \text{ Од/л ПМС}$$

2. Ступінь конверсії – 42,4 %. Час - 2 години при температурі 70 °С.

Вихід лактулози за один цикл – з 1 г лактози – 0,424 г лактулози за цикл.

Концентрація лактулози в біореакторі $P_{\text{ЛТ}} = 84,5$ г/л [90].

Процес біоконверсії лактози в лактулозу проходить в біореакторі з мембранним ультрафільтраційним модулем (рис.1.) з циклом біоконверсії лактози в лактулозу та подальшим мембранним видаленням лактулози. Потім до біореактора добавляється свіжа порція розчину ПМС і процес повторюється.

Кількість стадій (операцій біоконверсії) приймається $N_{\text{БК}} = 10$ циклів.

Час циклу біоконверсії – $T_{\text{БК}} = 2 \times 10 = 20$ годин.

Час підготовчих робіт - $T_{\text{пр}} =$ миття УФМ (ультрафільтраційного модуля, заміна мембран) – 5 годин,

Сумарний час біоконверсії $T_{\Sigma \text{бк}} = T_{\text{бк}} + T_{\text{пр}} = 20 + 5 = 25$ год

Лімітуючий час процесу ферментації: $T_{\text{цф}} = T_{\text{к}} + T_{\text{пр}} = 26$ годин, $T_{\text{к}}$ - час культивування культури - 16 год, $T_{\text{р}}$ – підготовка ферментера + час центрифугування $KP = 5 + 5 = 10$ год. Тому приймаємо загальний час біоконверсії $T_{\Sigma \text{бк}}$ рівний часу циклу ферментації $T_{\Sigma \text{бк}} = 26$ годин.

Розрахунок геометричного об'єму біореактора для біоконверсії лактози з ферментом целобіозо-2-епімерази (CsCT) в лактулозу. Річна потреба лактулози складає $G_{\text{гп}} = 56\,000$ кг/рік із вмістом сухих речовин в лактулозі $CP_{\text{гп}}$ не менше 95%. Використовуємо супернатант з активністю $A_{\text{сн}} = 4,5$ Од/мл. Приймаємо загальні втрати при виділенні лактулози $E_{\text{св}} = 0,16$, частка

Приймаємо кількість робочих трудоднів $T_{\text{рд}} = 80$, тоді кількість продукту за цикл становить:

1. Кількість продукту за цикл становить :

$$G_{\text{цк}} = G_{\text{нт}} \times T_{\text{цб}} / (24 \times T_{\text{рд}}) = 56\,000 \times 25 / (24 \times 80) = 729 \text{ кг /цикл}$$

2. Кількість циклів (партій) лактулози за рік :

$$N_{\text{ц}} = G_{\text{нт}} / G_{\text{цк}} = 56\,000 / 729 = 77 \text{ циклів}$$

3. Об'єм реакційної суміші для біоконверсії за цикл виробництва, $\text{м}^3/\text{цикл}$:

$$V_{\text{бкц}} = G_{\text{цк}} \cdot CP_{\text{гп}} / P_{\text{бк}} (1 - E_{\text{цф}}) \cdot N_{\text{бк}} = 729 \times 0,95 / 84,5 (1 - 0,16) \times 10 = 0,863 \text{ м}^3/\text{цикл}$$

4 Геометричний об'єм біореактора для біоконверсії при $K_3 = 0,7$:

$$V_{\text{гбр}} = V_{\text{бкц}} / K_3 = 0,863 / 0,7 = 1,23 \text{ м}^3.$$

Найближчий за розміром геометричний об'єм реактора $V_{\text{гр}} = 1,25 \text{ м}^3$

Розрахунок геометричного об'єму ферментера для біосинтезу ферменту целобіозо-2-епімерази. Фермент целобіозо-2-епімерази отримуємо шляхом культивування штаму *Bacillus subtilis* WB800.

Активність препарату в культуральній рідині – $A_{\text{кр}} = 5,3$ Од/мл. Концентрація біомаси в КР - 7,5 г/л. Витрати одиниць активності CsCE на біоконверсію Од/л ПМС (порошку молочної сироватки) – $A_{\text{пмс}} = 75$ Од/л при активності супернатанту $A_{\text{сн}} = 4,5$ Од/мл [10].

Для подальших розрахунків приймаємо наступні початкові дані:

- коефіцієнт запасу(втрати культуральної рідини чи посівного матеріалу від нестерильних операцій 1,1-1,5) $K_1 = 1,1$;
- коефіцієнт заповнення ферментера, його частка, (0,5 - 0,65) приймаємо $K_{зф}=0,6$;
- коефіцієнт заповнення посівного апарата, його частка $K_{па}=0,6$;
- Сумарні втрати при виділенні готового продукту (сума всіх втрат на стадіях виділення готового продукту), частка $E_{св}=0,16$;
- кількість посівного матеріалу для виробничих ферментерів, частка (0,05-0,1) $X_{ф}=0,05$;
- кількість посівного матеріалу для посівних апаратів, частка (0,02-0,1) $X_{па}=0,05$;
- кількість посівного матеріалу для інокуляторів, яка частка (0,02-0,1) $X_{ін}=0,05$;
- кількість посівного матеріалу для качалочних колб, яка частка (0,02-0,1) $X_{кол}=0,05$;
- втрати культуральної рідини при біосинтезі, яка частка (0,05-0,2) $E_{ф}=0,05$;
- втрати посівного матеріалу у процесі його культивування в посівних апаратах, яка частка (0,1- 0,2) $E_{па}=0,05$;
- втрати посівного матеріалу у процесі його культивування в інокуляторах, частка (0,05- 0,1) $E_{ін}=0,05$;
- втрати посівного матеріалу у процесі його культивування в колбах, яка частка (0,01- 0,02) $E_{кол}=0,01$.

Далі отриману КР з ферментом центрифугують, відділяють біомасу і отриманий супернатант використовують для проведення біоконверсії лактози у лактулозу.

Втрати супернатанту після центрифугування приймаємо $E_{цф} = 0,16$, частка

Втрати активності при центрифугуванні $A_{цф} = 0,15$, частка

1. Кількість одиниць активності ферменту CsCEC за цикл

$$A_{цк} = V_{бкц} \cdot A_{пмс} \cdot 1000 = 0,863 \times 75 \times 1000 = 64\,725 \text{ Од}$$

2. Об'єм КР, що необхідний для отримання заданої кількості одиниць активності фермента за одну ферментацію (цикл) з урахуванням втрат при виділенні Есв :

$$V_{кр} = K_1 \cdot A_{цк} / A_{кр} \cdot 10^3 (1 - E_{св}) = 1,1 \times 64\,725 / 5,3 \times 10^3 (1 - 0,16) = 16 \text{ л}$$

3. Приблизний геометричний об'єм ферментера для отримання ферменту при $K_3 = 0,6$, л

$$V_{гф} = V_{кр} / K_3 = 16 / 0,6 = 26,7 \text{ л}$$

4. Табличний геометричний об'єм ферментера $V_{тф} = 30 \text{ л}$

5. Уточнюємо коефіцієнт заповнення

$$K_{зу} = V_{кр} / V_{тф} = 16 / 30 = 0,53, \text{ що відповідає вимогам.}$$

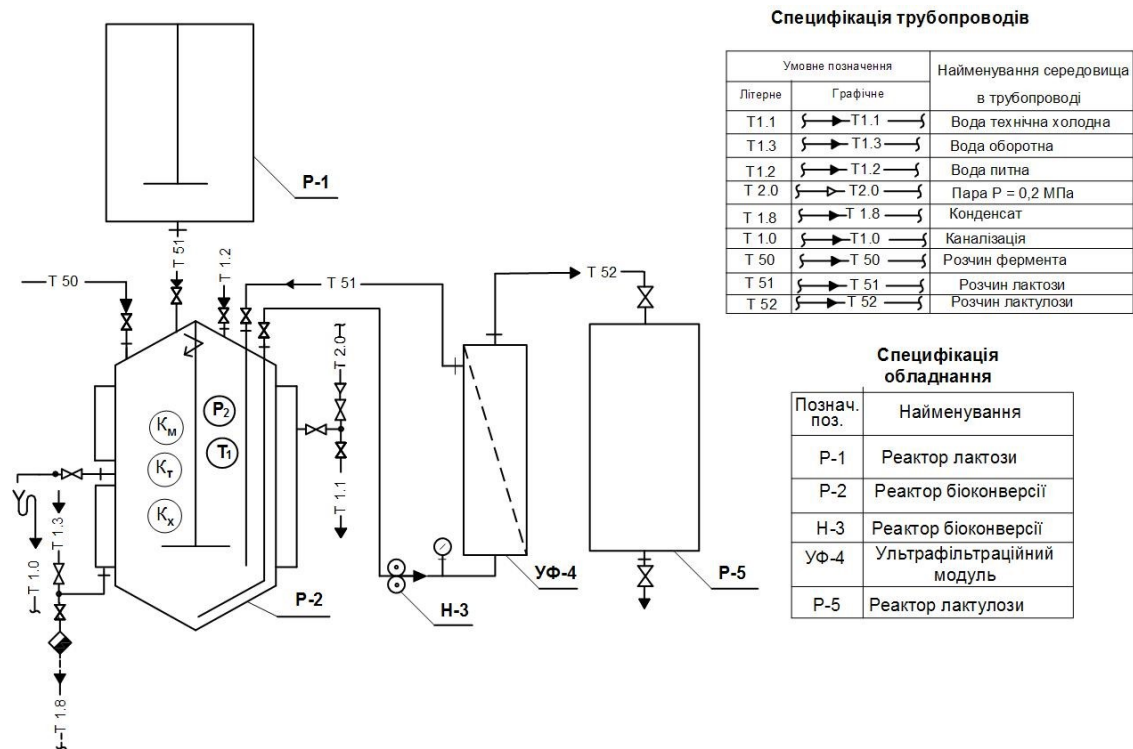


Рис. Установа біоконверсії лактози з ультрафільтраційним модулем.

РОЗДІЛ 3. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ СУБСТАНЦІЇ ТА ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА ЛЗ

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

Синтез лактулози переважно здійснюється за допомогою таких ферментів, як β -галактозидаза та целобіозо-2-епімераза, як субстрат використовують або лактозу або суміш лактози та фруктози. Спостерігається, що при ферментативному синтезі з використанням целобіозо-2-епімерази відбувається утворення лактулози у більших концентраціях, порівняно з використанням ферменту β -галактозидази.

У літературному джерелі Chen та співавт. [91] охарактеризували новий спосіб отримання лактулози за допомогою целобіозо-2-епімерази штаму *Caldicellulosiruptor obsidiansis* OB47 (Caob-CE). Для експресії даного ферменту використовувався штам *E. coli* BL21, який трансформували вектором pET-Caob-CE, що містив ген целобіозо-2-епімерази. Трансформовані клітини вирощували на середовищі Лурія-Бертані, в яке додавали 100 мкг/мл ампіциліну і інкубували при перемішуванні 200 об/хв при 37 ° С. Після досягнення оптичної густини 600 нм додавали індуктор ізопропіл- β -D-1-тіогалактопіранозид (ІПТГ) у концентрації 0,5 ммоль/л для індукції експресії целобіозо-2-епімерази, після чого температуру знизили до 28 ° С і фермент експресували протягом 6 год. Питома активність отриманого ферменту склала 93,6 Од/мг по відношенню до лактози. Вихід становив $9,5 \pm 1,3$ мг очищеного ферменту з 50 мл культуральної рідини. Далі 120 од/мл Caob-CE використовували у виробництві лактулози з 200 г/л лактози при 75 ° С і pH 7,5. Найвищий вихід лактулози досягав 108 г/л через 4 год, при цьому утворювалося також 24 г/л епілактози.

					НУХТ БТЕК 06.02М ДП ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 3. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ СУБСТАНЦІЇ ТА ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА ЛЗ	Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.		Піддубняк К.С.						
Перевір.		Карлаш Ю.В.					82	40
Консультант						82		
Н. Контр.						Кафедра БТМ		
Затверд.		Стабніков В.П.						

У дослідженні Wu та співавт. [90] ген, що кодує целобіозо-2-епімеразу з *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* (CsCE), був експресований у *Bacillus subtilis* WB800. Культивування рекомбінантного штаму здійснювали у 7,5 л ферментері. Після оптимізації ферментаційного середовища (15 г/л сахарози, 15 г/л дріжджового екстракту, 5 г/л кукурудзяного порошку, 5 г/л NaCl, 0.5 г/л $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 6 г/л $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ та 2 г/л KH_2PO_4) продуктивність рекомбінантного штаму була в 4,5 рази вищою, ніж у вихідному середовищі та складала 5,3 од/мл через 16 годин культивування.

Розроблено ферментативний синтез лактулози з використанням лактози з сирної сироватки в якості субстрату. Встановлено, що оптимальні рН та температура є 7,0 та 80 ° С відповідно. Максимальний наступний конверсії лактози становила 58,5% (158 г/л лактулози з 270 г/л лактози) із використанням 7,5 Од/мл CsCE. Ферментативна мембранна реакторна система демонструвала велику експлуатаційну стабільність - конверсія лактози становила 42,4% (84.5 г/л лактулози) після 10 партій ферментації.

Hashem та співавт. [92] було здійснено виробництво лактулози за допомогою β -галактозидази *Lactobacillus acidophilus* NRRL 4495. Встановлено, що максимальний вихід лактулози спостерігається при рН 6,6, співвідношенні лактози до фруктози 40:20 та концентрації ферменту 4 од/мл та складає 25 г/л через 7 год ферментації.

У табл. 3.1 наведено порівняльну характеристику різних штамів-продуцентів лактулози, поживних середовищ для їх культивування та умов культивування.

Таблиця 3.1

Порівняльна характеристика складу поживного середовища та умов культивування

Біологічний агент	Фермент	Склад поживного середовища, г/л	Тривалість культивування, год	Особливості процесу біосинтезу	Активність ферменту	Концентрація лактулози, г/л	Література
<i>Caldicellulosiruptor obsidiansis</i> OB47 (Caob-CE) + <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Целобіозо-2-епімераза	Середовище для біосинтезу ферменту: LB (Лурія-Бертані): • NaCl – 5; • Дріжджовий екстракт - 5; • Триптон – 10; • Ампіцилін - 100 мкг/мл; • IPTG (Ізопропіл – β – D–тіогалактопіранозид) – 0,1; Субстрат для ферментативного синтезу лактулози : Лактоза -200 г/л	16	Біосинтезу ферменту: 200 об/хв., при 37 °С, після досягнення оптичної густини 600 нм додають індуктор ІПТГ для індукції експресії целобіозо-2-епімерази, після цього температуру знижують до 28 °С і фермент експресують протягом 6 год. Ферментативний синтез лактулози: 75 °С, рН 7,5, 4 год	120 од/мл	108 г/л	ChenQ., Levin R., Zhang W., ZhangT., Jiang B., Stressler T., Mu W. Characterisation of a novel cellobiose 2-epimerase from thermophilic <i>Caldicellulosiruptor obsidiansis</i> for lactulose production. <i>J SciFood Agric.</i> 2016; 97(10): 3095–3105. doi:10.1002/jsfa.8148
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NRRL 4495.	β -галактозид аза	Середовище для біосинтезу ферменту: • Сироватка- 57; • Сульфат амонію - 30; • K₂HSO₄ - 30;	31	Біосинтезу ферменту: 180 об/хв., 40 °С, рН 7,0, 24 год. Ферментативний синтез лактулози:	4 Од/мл	25 г/л	HashemA.M., WafaaS.A.E.A.I., Helmy A., El-mohamady Y., AbouromiaR. Factors

		• KH_2SO_4 - 10; • $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 50; Субстрат для ферментації лактулози • Лактоза – 400; • Фруктоза – 200.		pH 6,6, 40 °C, 7 год			affecting the production of lactulose by <i>Lactobacillus acidophilus</i> NRRL 4495 β -galactosidase and its biological activity. <i>Malaysian J Microbiol.</i> 2013; 9(1): 1-6.
<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i> (CsCE) + <i>Bacillus subtilis</i> WB800	Целобіозо-2-епімераза	Середовище для біосинтезу ферменту: • Сахароза - 15, • Дріжджовий екстракт - 15, • Кукурудзяний екстракт - 5, • NaCl - 5, • $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0.5, • $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – 6, • KH_2PO_4 – 2; Субстрат для ферментативного синтезу лактулози : Суша молочна сироватка -270 г/л	16	Біосинтезу ферменту: 500 об/хв., при 32 °C, pH 7,0, 16 год. Ферментативний синтез лактулози: 80 ° C, pH 7,0, 4 год	5,3 Од/мл	158 г/л	Wu L., Xu C., Li S., LiangJ., Xu H., XuZ. Efficient production of lactulose from whey powder by cellobiose 2-epimerase in an enzymatic membrane bioreactor, <i>BioresTechnol.</i> 2017; 233, 305-312. doi: 10.1016/j.biortech.2017.02.089

Так як основним критерієм вибору біологічного агента є його здатність рости нанайбільш дешевих поживних середовищах, наступним етапом вибору продуцента є розрахунок та порівняння вартості поживних середовищ для культивування продуцентів, що синтезують лактулозу (табл. 3.2).

Таблиця 3.2

Вартість компонентів поживного середовища для біосинтезу лактулози

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонент а, грн./кг	Вартість компонента (грн.) на 1 л середовища	Джерело інформації*
<i>цE. coli</i> BL21 (DE3) + целобіозо-2-епімераза	Середовище для біосинтезу ферменту			
	NaCl - 5	3	0,015	1
	Дріжджовий екстракт - 5	495	2,475	2
	Триптон - 10	1520	15,2	3
	Ампіцилін - 100 мкг/мл (0,1 г/л);	9950	0,995	4
	IPTG (Ізопропіл-β-D-тіогалактопіранозид) – 0,1	11 200	1,12	5
	Субстрат для ферментативного синтезу лактулози :			
	Лактоза - 200	47	9,4	6
Вартість 1 л середовища – 29,21 грн				
<i>Bacillus subtilis</i> WB800+ целобіозо-2-епімераза	Середовище для біосинтезу ферменту			
	Сахароза - 15	90	1,35	7
	Дріжджовий екстракт - 15	495	7,42	2
	Кукурудзяний екстракт - 5,	25	0,125	8
	NaCl - 5,	3	0,015	1
	MgSO ₄ *7H ₂ O - 0.5,	12	0,006	9
	K ₂ HPO ₄ *3H ₂ O – 6,	120	0,72	10
	KH ₂ PO ₄ – 2.	50	0,1	11
	Субстрат для ферментативного синтезу лактулози :			
	Суша молочна сироватка - 270	28	7,56	16
Вартість 1 л середовища – 17,3 грн.				

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонент а, грн./кг	Вартість компонента (грн.) на 1 л середовища	Джерело інформації*
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NRRL 4495 + β -галактозидаза	Середовище для біосинтезу ферменту			
	Сироватка- 57;	23	1,3	12
	Сульфат амонію - 30;	15	0,45	13
	K ₂ HSO ₄ - 30;	23	0,69	14
	KH ₂ PO ₄ - 10;	50	0,5	11
	MgSO ₄ *7H ₂ O – 50	12	0,6	9
	Субстрат для ферментативного синтезу лактулози			
	Лактоза – 400	47	18,8	6
	Фруктоза - 200	31	6,2	15
	Вартість 1 л середовища - 28,54 грн			

Примітка. * - Ціни наведено станом на листопад 2020 р. 1 - <https://prom.ua/p1100353722-sol-pischevaya-krupnogo.html?>; 2 - <https://homebeer.com.ua/solodovye-ekstrakty/ekstrakt-piva-real-ale>; 4 - <https://apteka-ruan.com.ua/10502-ampitsillin-poroshok-dlya-rastvora-dlya-inyektsiy-po-1-0g-vo-flakone-1>; 5 - <https://russian.alibaba.com/product-detail/high-quality-99-cas-367-93-1-and-isopropyl-beta-d-thiogalactopyranoside-iptg-60791007642.html?spm=a2700.8699010.normalList.26.535d62047OT2bA>; 6 - <https://prom.ua/p1241997202-laktoza-pischevaya-polmlek.html?>; 7 - <https://prom.ua/p5251530-saharoza.html>; 8 - <https://kiev.flagma.ua/kukurudzyaniy-ekstrakt-o5052730.html>; 9 - <https://prom.ua/p40341252-magnij-sernokislyj-mnogovodnyj.html?&primelead=MS4xNw>; 10 - <https://prom.ua/p505512585-kalij-fosfornokislyj-zameschennyj.html?&primelead=MQ>; 11 - <https://prom.ua/p28011710-kalij-fosfornokislyj-zameschennyj.html?>; 12 - <https://prom.ua/p21473274-syvorotka-suhaya.html>; 13 - <https://prom.ua/p1133904177-sulfat-ammoniya-kristallicheskiy.html?&primelead=MQ>; 14 - <https://prom.ua/p801022738-sulfat-kaliya.html?>; 15 - <https://prom.ua/p1261383552-fruktoza.html>; 16 - https://prom.ua/p1255806190-suhaya-molochnaya-syvorotka.html?token=v2%3AuF3QrKgY7FOAvIDEhzA1_xIm6Rus5BERH5AZeg5AqqChN_onKMX-8UDwU6GVs17nfglupYusxFLXmLWFApyb-tmCQm23acFKNQXYtzEkrNglybE3Dw&campaign_id=2024364&product_id=1255806190&source=prom%3Asearch%3Atag%3Aserp&locale=ru&from_spa=true

Підсумовуючи дані табл. 4.2 можна зробити висновок, що середовище для культивування *Bacillus subtilis* WB800., вартість якого становить 18,05 грн, є дешевшим, ніж середовище для культивування *E. coli* BL21 (DE3) та *Lactobacillus acidophilus* NRRL 4495, вартість яких складає 29,21 та 28,54 грн відповідно.

Останній етап вибору біологічного агента для біосинтезу лактулози - розрахунок умовної вартості 1 г і кількості утвореного продукту за годину (табл. 3.3).

Таблиця 3.3

Умовна вартість лактулози

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища, грн	Концентрація лактулози, г/л	Умовна вартість 1 г лактулози, грн./ г	Тривалість культивування, год	Кількість утвореної лактулози за годину, г /год
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)целобіозо-2-епімераза	29,21	108	0,27	16	6,75
<i>Bacillus subtilis</i> WB800целобіозо-2-епімераза	17,3	158	0,10	26	7,0
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NRRL 4495 β-галактозидаза	28,54	25	1,14	31	0,81

Отже, підсумовуючи дані таблиціможе зробити такі висновки : умовна вартість 1 г лактулози є нижчою прикультивуванні *Bacillus subtilis* WB800 (0,10грн/г) більш ніж у 2 рази у порівнянні з *E. coli* BL21 (DE3) (0,27 грн/г), та у 10 разів порівняно з *Lactobacillus acidophilus* NRRL 4495 (1,14 грн/г). Також беремо до уваги те, що кількість утвореної лактулози за годину найвищою є прикультивуванні *Bacillus subtilis* WB800 – 7,9 г/год.

Таким чином, зважаючи на найнижчу умовну вартість лактулози та найвищу продуктивність синтезу обираємо штам *Bacillus subtilis* WB800, що синтезуєцелобіозо-2-епімеразу, за допомогоюякої здійснюється ферментативний синтез лактулози.

3.1.1. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

Приблизний геометричний об'єм ферментера для отримання ферменту при $K_3 = 0,6$, л

$$V_{\text{гф}} = V_{\text{кр}}/K_3 = 16/0,6 = 26,7 \text{ л}$$

Табличний геометричний об'єм ферментера $V_{\text{тф}} = 30$ л

Уточнюємо коефіцієнт заповнення :

$$K_{\text{зап}} = V_{\text{кр}}/V_{\text{тф}} = 16/30 = 0,53, \text{ що відповідає вимогам.}$$

де: $V_{\text{кр}}$ – об'єм культуральної рідини; $V_{\text{тф}}$ – об'єм ферментера.

Робочий об'єм ферментера ($V_{\text{роб}}$) визначають за формулою:

$$V_{\text{роб}} = V_{\text{тф}} \times K_{\text{зап}}$$

де: $V_{\text{т.ф.}}$ – геометричний об'єм ферментера; $K_{\text{зап}}$ – коефіцієнт заповнення, 0,6.

$$V_{\text{роб}} = 30 \times 0,6 = 18 \text{ л.}$$

Тоді кількість поживного середовища в ферментері буде становити:

$$V_{\text{пс1}} = V_{\text{роб1}}/(1+X_{\text{ф}}) = 18/(1+0,1) = 16,3 \text{ л,}$$

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

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

Кількість посівного матеріалу становить

$$V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб1}} - V_{\text{пс1}} = 18 - 16,3 = 1,7 \text{ л}$$

Таку кількість інокуляту можна отримати в колбах на качалці. Для цього використовуємо качалочні колби об'ємом $V_{\text{колб}} = 750$ мл та коефіцієнтом заповнення $K_{\text{зк}} = 0,2$. Тоді кількість колб становитиме :

$$N_{\text{колб}} = V_{\text{роб1}} / (V_{\text{колб}} \times K_{\text{зк}}) = 1700 / (750 \times 0,2) = 12 \text{ качалочних колб}$$

Кількість поживного середовища для вирощування самого інокуляту в колбах на качалці становить :

$$V_{\text{пс2}} = V_{\text{колб}}/(1+X_{\text{колб}}) = 1,7/(1+0,1) = 1,6 \text{ л,}$$

Кількість посівного матеріалу, отриманого з пробірок зі скошеним агаром, становить :

$$V_{\text{пмк}} = V_{\text{колб}} - V_{\text{пс2}} = 1,7 - 1,6 = 0,1 = 100 \text{ мл,}$$

3.1.2. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища

Для біосинтезу ферменту целобіозо-2-епімерази використовують середовище складу (г/л) [2]:

- Сахароза - 15,
- Дріжджовий екстракт - 15,
- Кукурудзяний екстракт - 5,
- NaCl - 5,
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0.5,
- $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – 6,
- KH_2PO_4 – 2;

3.1.2.1. Підготовка і стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу у колбах на качалці

Проаналізувавши склад поживного середовища, ділимо його на композиції в залежності від режиму стерилізації (фосфорні солі стерилізуються окремо, щоб запобігти утворенню осаду з солями магнію). Режим стерилізації компонентів поживних середовищ визначається за температурою їх розкладання:

- **Композиція А:** сахароза, дріжджовий екстракт, кукурудзяний екстракт - режим стерилізації 112°C , 0,05 МПа, 30 хв.
- **Композиція Б:** KH_2PO_4 , $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ - режим стерилізації 131°C , 0,15 МПа, 40 хв;
- **Композиція В:** NaCl, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - режим стерилізації 131°C , 0,15 МПа, 40 хв;

Зважаючи на невеликий об'єм композиції стерилізуються у колбах у автоклаві.

3.1.2.2. Приготування і стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 30 л

Для одержання 18 л культуральної рідини використовуємо 1,8 л посівного матеріалу та потрібно приготувати 16,2 л поживного середовища.

Середовище ділимо на такі композиції:

- **Композицію А:** сахароза, дріжджовий екстракт, кукурудзяний екстракт – стерилізують при 112°C, 0,05 МПа, 30 хв .

- **Композицію Б:** KH_2PO_4 , $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – стерилізуємо з режим стерилізації 131°C, 0,15 МПа, 40 хв.

- **Композицію В:** NaCl , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - стерилізують при 131°C, 0,15 МПа, 40 хв .

3.1.3. Підготовка середовища для біоконверсії лактулози

Біоконверсія лактози в лактулозу проходить за допомогою ферменту целобіозо-2-епімерази та субстрату, яку проводять у біореакторі з мембранним ультрафільтраційним модулем об'ємом 1,25 м³, що містить 0,863 м³ реакційної суміші. Як субстрат використовується порошок сироватки, який розводиться у фосфатному буфері (рН 7) до концентрації 270 г/л. Отриманий розчин стерилізують при 112°C, 0,05 МПа, 30 хв.

3.2. Обґрунтування вибору способу культивування і типу ферментера

Оптимальна температура для культивування *B. subtilis* WB800 становить 32°C, а рН 7 [90]. Це свідчить про можливий ризик контамінації сторонніми мезофільними і нейтрофільними мікроорганізмами. Тому необхідно забезпечити асептичні умови біосинтезу шляхом стерилізації обладнання, поживного середовища, аераційного повітря, що подається у ферментер. Тому культивування *B. subtilis* WB800 доцільно здійснювати глибинним способом, так як при поверхневому способі культивування неможливо забезпечити асептичні умови культивування.

Біосинтез ферменту целобіозо-2-епімерази здійснюється періодичним способом, оскільки максимум його активності спостерігається у стаціонарній

фазі росту (через 16 годин культивування) [90], тому є недоцільним підтримання продуцента у експоненційній фазі росту.

При виборі типу ферментеру необхідно врахувати те, що продуцент є аеробом, тому обов'язковою вимогою для культивування є безперервна аерація поживного середовища шляхом подачі стерильного повітря через барботер. До того ж при культивуванні *B. subtilis* WB800 необхідна висока швидкість перемішування середовища, отже, найдоцільніше обрати ферментер з комбінтованим підведенням енергії, усередині якого розташована механічна мішалка і барбоотер. В апаратах цього типу підведення енергії до газової фази здійснюється для аерації, а до рідкої фази - для перемішування [74].

Культивування проводиться при швидкості перемішування 500 об/хв [90], для забезпечення такої швидкості найкраще використовувати швидкохідні турбінні мішалки.

На наступному етапі для біоконверсії лактулози за допомогою целобіозо-2-епімерази доцільно обрати біореакторі з мембранним ультрафільтраційним модулем (рис. 2.1), оскільки за допомогою цієї системи можна досягти збереження енергії та скорочення викидів. Мембранний біореактор являє собою практичну систему для промислового виробництва та дозволяє повторно використовувати ферменти у процесі синтезу. Принцип роботи полягає у тому, що у реактор подається субстрат і фермент, після біоконверсії лактози в лактулозу проходить через мембранну установку, при цьому на мембрані затримується фермент, який потім можна відновити (зберігається до 42,4% ферменту після 10 циклів синтезу) та використовувати для наступного циклу синтезу [90].

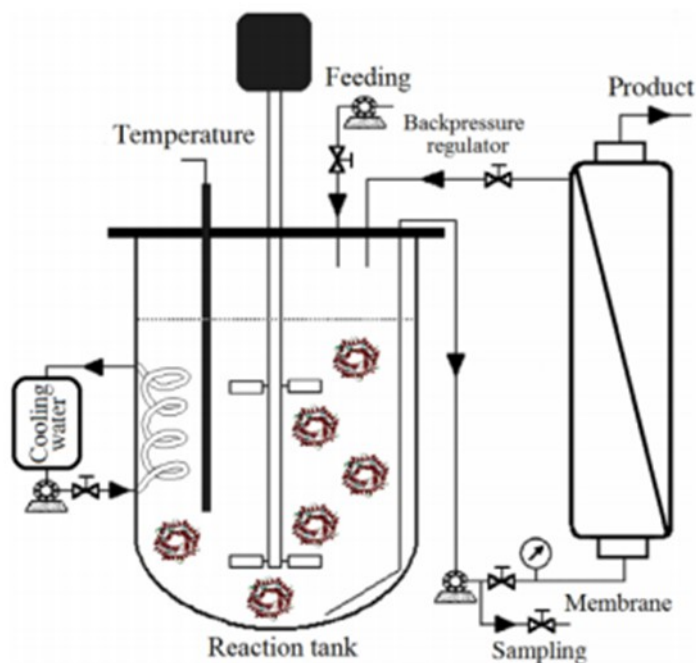


Рис. 3.1. Ферментативний мембранний реактор

Отже, біосинтез целобіозо-2-епімерази культивуванням *B. subtilis* WB800 здійснюють глибинним способому періодичному режимі, у ферментері, обладнаному барботером і турбінною мішалкою, а біоконверсію лактулози проводиться у біореакторі з мембранним ультрафільтраційним модулем.

3.3. Обґрунтування стадій виділення і очищення субстанції для виробництва ЛЗ

Лактулоза (4-O-β-D-галактопіранозіл-D-фруктоза) – синтетичний стереоізомер молочного цукру лактози (рисунок). Лактулозу в промислових кількостях синтезують із лактози, яку, в свою чергу, отримують із підсирної сироватки, відходів під час виробництва молока та молочних продуктів. Внаслідок цього отримують дисахарид, що складається з молекул фруктози і галактози [93].

Формула - $C_{12}H_{22}O_{11}$. Молекулярна маса лактулози – 342,296 г/моль. Лактулоза стабільна і мало розкладається при нагріванні до 130 °C протягом 10 хв [94].

Початковим етапом виділення та очищення цільового продукту у виробництві є концентрування розчину лактулози після біоконверсії. На даному етапі здійснюється концентрування розчину лактулози шляхом

видалення з нього води та інших низькомолекулярних речовин з метою подальшої її переробки.

Наступним етапом (етап сушіння) проводиться процес сушіння з метою забезпечення відповідних якісних характеристик субстанції лактулози, яка далі використовується для отримання лікарського препарату, а саме для приготування сиропу.

На завершальних етапах виробництва необхідним є проведення операцій фасування, пакування та маркування, що дозволить отримати відповідний товарний вигляд препарату.

Отже, технологічний процес отримання (виділення) лактулози буде складатися з наступних етапів:

- 1) концентрування розчину лактулози до концентрації 40%;
- 2) процес сушіння;
- 3) приготування препарату (сиропу лактулози);
- 4) етап фасування, пакування та маркування цільового продукту.

3.3.1. Обґрунтування способу концентрування розчину лактулози після біоконверсії та вибір обладнання.

Для концентрування розчину лактулози на сьогодні можуть бути застосовані наступні методи:

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

До мембранних процесів розділення розчинів відносять зворотний осмос, діаліз, електродіаліз, ультрафільтрацію, мікрофільтрацію,. Ці процеси одночасно очищують, концентрують розчин. Ступінь концентрування від 5 % до 50 % сухих речовин. Мембранні установки невеликі за габаритами, прості, економічні та легко автоматизуються. При ультрафільтрації затримуються молекули розмірами від 5-50 нм [95].

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

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

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

Мікрофільтрація –процес, що близький до звичайної фільтрації. Мікрофільтрація застосовується для відділення дрібних частинок твердої фази, зокрема мікроорганізмів (в цьому випадку її називають стерилізуючою фільтрацією, через пористі мембрани з діаметром пір від 0,1 до 10 мкм). Процес мікрофільтрації протікає з достатньо високою швидкістю завдяки великому числу пір на одиниці поверхні мембрани (кількість пір досягає 70—80% загального об'єму мембрани). Процес мікрофільтрації за- звичай ведуть при різниці тиску 0,1—0,2 Мпа [96].

Недоліки - ретельна підготовка та очищення розчину, підвищення концентрації розчиненої речовини біля поверхні мембрани, утворення значної кількості пермеатів, що вимагають очищення перед скиданням у каналізацію —та виникнення концентраційної поляризації [95].

Випарювання – процес утворення парової фази, що відбувається в усій масі рідини та і, головним чином, на межі між паровою бульбашкою і рідиною. Випарювання настає при температурі кипіння, за якої тиск

насиченої пари рідини дорівнює тискузовнішньому. Процес пароутворення називають випаровуванням до настання моменту кипіння.

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

У мікробіологічній промисловості найбільш широко використовуються процеси випарювання у вакуумних апаратах (установках) як найекономічніший спосіб попереднього концентрування продуктів. Для кожного продукту біосинтезу, який піддається концентруванню, час перебування у випарному апараті при відповідній температурі визначається дослідним шляхом. На підставі дослідних даних вибирається відповідна конструкція випарної установки, якащо забезпечує оптимальний час перебування середовища в апараті примінімальних витратах енергії, призначеній продуктивності [95, 96].

Отже, для концентрування розчину лактулози було обрано метод випарювання. По-перше такий метод є найекономічнішим, що майже не вплине на собівартість готового продукту, також суспензія не потребує додаткової підготовки перед процесом концентрування.

3.3.1.1. Обґрунтування вибору конструкції випарного апарату для концентрування розчину лактулози.

Для концентрування рідких сумішей, найчастіше, використовується за допомогою випарювання. Вибір конструкції випарного апарату залежить від таких фізичними параметрів, - величина критичного теплового потоку, густина, температура кипіння, в'язкість, ; та хімічних характеристик – , піноутворення розчинів, та термолабільність розчинених речовин, кристалізація, та кипіння, тощо. Зазначені параметри задають основні вимоги для умов проведення процесу випарювання, а також та, безпосередньо, для вибору конструкцій випарних апаратів [97]. Заважаючи на описані вище фактори, існує кількість різних варіантів конструкційного оформлення випарного апарату. Розглянемо основні із них.

Випарні апарати з низхідною плівкою, конструкція яких представляє собою вертикальний кожухотрубний теплообмінник з винесеним або вбудованим сепаратором 97орого вартіс дії. Важлива особливість роботи апарата з низхідною плівкою заключається в необхідності у рівномірному змочуванні стіноктруб рідиною, адже інакше нане змочених місцях утворюютьсяінкрустації та відкладення кристалів.Апарат використовується для великотоннажних виробництв,аджевихід упареного розчину досягає 150 т/год з одного апарату.

Апарати даного типу підходять для обробки термолабільних речовин, які, мало схильні до інтенсивної інкрустації [98, 99].

Випарні апарати з вимушеною циркуляцією виконані у вигляді вертикального кожухотрубного або горизонтального пластинчатого теплообмінника в якості нагрівальної камери, також ще вони містять концентричний сепаратор і для миттєвого випаровування тіа циркуляційний насос. Оскільки в апараті підтримується циркуляція рідини, то швидкість рідини та її температуру можна регулювати залежно від особливостей продукту незалежно від обраної різниці температур. Апарати даної конструкції використовуються для випарювання рідин таких, що схильні до утворення інкрустацій на нагрівальних поверхнях. Та високої в'язкості м можуть бути використані для випарної кристалізації солей [98, 99].

Пластинчатий випарний апарат складається з власне пластинчатого теплообмінника, сепаратора для миттєвого випаровування рідини. В рамному апараті встановлені спеціальні пластини, які направляють продукт та нагрівальне середовище по каналам, які чергуються. Спеціальна форма пластин разом з розрахованою відстанню між пластинами створює сильну турбулентність, що покращує теплообмін. Апарати даної конструкції використовуються в установках середньої продуктивності для випарювання рідин, що містять мало нерозчинних часток та є схильними до інкрустації. Для термолабільних речовин, дуже в'язких продуктів, а також для випарювання в особливих умовах, коли застосовують примусову циркуляцію [98, 99].

Випарні апарати з природною циркуляцією представляють собою вертикальний кожухотрубний теплообмінник з верхнім виносним сепаратором. Розділення камери кипіння на декілька окремих камер з власними системами циркуляції рідини дозволяє досягти високої кінцевої концентрації при значно меншій площі теплообміну, ніж в традиційному апараті з циркуляцією розчину. Збільшенням різниці температур між нагрівальною камерою та камерою кипіння, тим більша інтенсивність випарювання і тим, відповідно, більша швидкість руху рідини в трубах та інтенсивність теплообміну.

Можна здійснювати випарювання термостабільних продуктів при необхідності високих коефіцієнтів концентрування та випарювання рідин, не Ньютоновських рідин а також рідин що сильно забруднюють теплообмінні поверхні, [98, 99].

Сучасним напрямом використання випарних апаратів для концентрування є використання роторно-плівкового випарника (РПВ).

Випарювання вихідного продукту проходить у випарних трубах, у середині яких вбудовано обертовий турбулізуючий механізм роторного типу. Речовина, що переробляється подається через патрубок у верхній частині кожної із труб. Вона розтікається рівномірно по поперечному перетину труби роторно-плівкового випарника та стікає по внутрішній поверхні донизу у вигляді плівки під дією сили ваги; що по поверхні плівки «ковзають» робочі органи роторного механізму. Труба зовні апарату підігрівається паром до температури випару речовини. Лопаті роторно-плівкового випарника створюють у плівці вихрові структури, що прискорюють у ній тепломасообмінні процеси, які забезпечують ефективний поділ рідкої та й парової фаз при випарі. При цьому максимально зменшується утворення відкладень на внутрішній поверхні випарної труби.

У результаті більша частина води, стікаючи донизу по випарній трубі роторно-плівкового випарника, що перетворюється у «вторинну» пару. «Вторинна» пара - проходить через сепаратор, що при цьому на пластинах

сепаратора залишаються великі краплі вологи, які захоплені парою, що містять концентрат речовини, яка випарюється; вони стікають із пластин та у піддон сепаратора. Концентрат, який утворився в результаті випарювання речовини, та надходить із випарних труб у піддон сепаратора роторно-плівкового випарника. Далі переміщається за допомогою шнекового транспортеру, вбудованим у сепаратор випарника чи відкачується насосом та у накопичувач. "Вторинна" пара надходить у конденсатор, де конденсується. Конденсат "вторинної" пари подається в накопичувальну ємність.

Роторно-плівковий випарник складається з ряду (7) випарних модулів.

Основними перевагами роторно-плівкового випарника є:

- ✓ високий енергетичний потенціал вторинної пари нагрівачі;
- ✓ не утворюються відкладення при температурі випарювання середовища аж до 150°C;
- ✓ висока теплонапруженість теплообмінної поверхні та низька металоємність конструкції;
- ✓ високий ступінь випарювання використання великої різниці температур між гріючою парою та випарюваним розчином, що дозволяє повністю зберегти склад первинного продукту;
- ✓ модульність і технологічність конструкції;
- ✓ малий час перебування вихідного продукту в апараті при його вертикальному компонуванні [96].

Процеси випарювання проводять за атмосферного та підвищеного тисків, або під вакуумом.

Для проведення випарювання під атмосферним тиском вторинну пару не використовують. Такий спосіб – найпростіший проте не економічний.

Під час проведення випарювання під тиском більшим ніж атмосферний підвищується температура кипіння, що дає можливість використовувати вторинну пару. Тому даний метод використовують для випарювання термічно стійких продуктів, а теплоносії повинні бути звищою температурою.

Перевагою випарювання під вакуумом є можливість здійснювати процес при нижчих температур, щоє важливим у разі концентрування розчинів термочутливих речовин. Крім цього, за час створення розрідження, зростає корисна різниця температур між нагрівальним агентом й розчином, що дає змогу зменшити поверхню нагрівання апарату (за інших однакових умов) [96, 100].

Отже, концентрування розчину лактулози буде проводитись у роторно-плівковому випарнику, а саме під вакуумом процес протікає значно швидше, ніж в «традиційних» випарниках, та з меншими енерговитратами й більшим коефіцієнтом виходу.

3.3.2. Обґрунтування способу сушіння та вибір сушарки

Для отримання порошкоподібних субстанцій можуть застосовуватися наступні способи сушіння:

- вакуумна сушка;
- розпилювальне сушіння;
- сублімаційна сушка (ліофілізація).

Сушіння за допомогою розпилювальної сушарки (*рис. 3.2*) – це швидкий та економічно вигідний метод сушіння, за допомогою якого можна отримати сухі частинки порошку з бажаними властивостями, такими як хороша текучість, питомий вміст залишкової вологи тарівномірний розподіл форми та розміру. Цей процес можна розділити на 4 етапи. По-перше, рідкий продукт за допомогою механічних форсунок або 100-ого вар 100-ого вартісним дисків диспергується на дрібні краплі. Потім утворений 100-ог стикається з нагрітим газом в сушильній камері. Третя фаза процесу сушіння – це розпиленням включає висушування крапель та утворення частинок. Після цього тверді частинки відокремлюються від сушильного повітря. В основному важкі частинки відокремлюються внаслідок гравітаційної сили, як дрібні частинки – за допомогою циклонів [100].



Рис. 3.2. Розпилювальна сушарка.

Перевагами методу є швидкість, безперервність його в, відносна легкість організації та rentабельність його в.

Наступним способом висушування є вакуумна сушка (рис. 3.3). При її використанні зразки сушать шляхом випаровування рідини. Сушіння відбувається періодично, тобто у сушильну шафу на полиці закладають вологий матеріал, створюють вакуум, і починають обігрівання шафи парою через порожнини в плитах або електричним струмом. Процес закінчують коли матеріал матиме потрібну вологість, і після чого готовий сухий матеріал вивантажують [101].

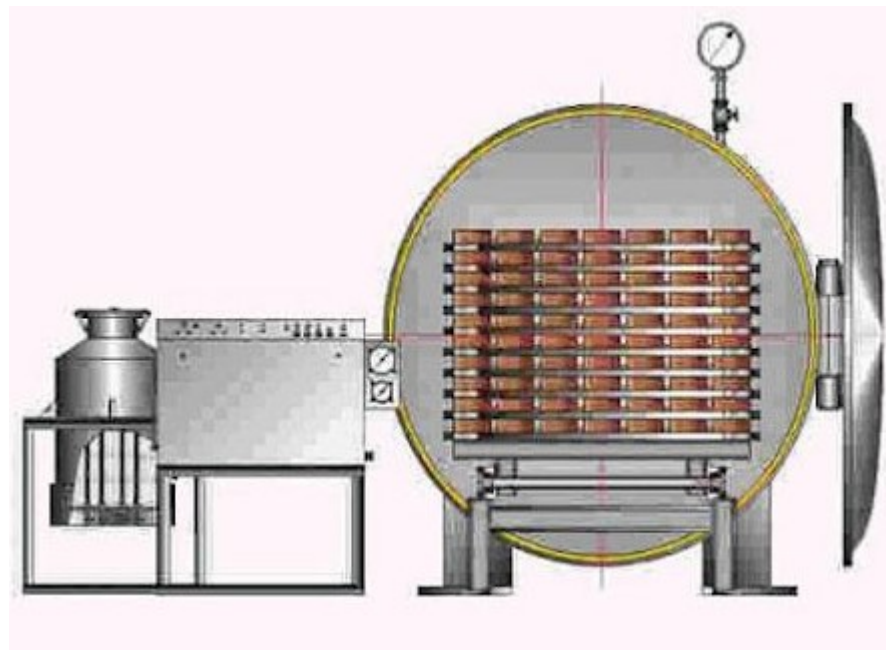


Рис. 3.3. Вакуумна сушарка.

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

Недоліками є:

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

Ліофілізація – це процес висушування холодом з виморожуванням вологи у бактеріальних препаратах чи інших матеріалах. Цей процес можна розділити на 3 етапи: заморожування, первинна сушка та вторинна сушка. На першому етапі відбувається власне заморожування продукту при низьких температурах. На етапі первинної сушки заморожену воду видаляють сублімацією під вакуумом, а на вторинній стадії сушіння незамерзлу воду видаляють десорбцією. Метод ліофілізації дозволяє отримувати сухі тканини, препарати, продукти тощо без втрати їх структурної цілісності та біологічної активності. При ліофілізації більшість білків не піддається денатурації і може довго зберігатися при помірному охолодженні (близько 0°C). Ліофілізовані тканини і препарати при

зволоженні відновлюють свої первинні властивості. Ліофілізацію застосовують при необхідності тривалого зберігання і консервування різних продуктів біологічного походження, для одержання сухої плазми донорської крові, сухих сироваток і вакцин, при трансплантації органів і тканин, у фармацевтичній і харчовій промисловості [102].

Переваги ліофілізації:

- збереження дисперсної фази;
- відсутність впливу високих температур.
- висушену продукт можна зберігати досить тривалий термін;

Недоліками ліофілізації є необхідність ретельної підготовки матеріалу до сушки, створення високого вакууму для повноти висихання, тривалість сушіння і досить високі енерговитрати.

Отже, під час вибору методу й режиму сушіння матеріалів різної природи основним критерієм є якість сухого продукту, тому для висушування лактулози обрано розпилювальне сушіння. А вже освоєння вітчизняною промисловістю технології отримання сухої лактулози способом розпилювального сушіння дозволить отримувати безпечну, високої якості і, відповідно, конкурентоспроможну на світовому ринку продукцію [103].

Вченими під керівництвом Долганюк [103] проведено дослідження можливості розпилювального сушіння розчину лактулози. Встановлено, що втрати продукту під час сушіння складають не більше 3,5%, а якісні показники отриманої лактулози задовольняють вимогам, що пред'являються нормативною документацією.

У наступній роботі цих науковців [103] здійснено визначення оптимальних параметрів розпилювальної сушки лактулози. Встановлено, що оптимальним є використання для сушіння розчину лактулози з 103-ого в часткою лактулози 40 ± 1 % (вихід сухої лактулози збільшується у 2 рази, порівняно з сушінням розчинів з 103-ого в часткою 20 і 30 %). Найбільший вихід продукту (38,5%) отримано при температурі

сушіння $140 \pm 1^\circ\text{C}$, швидкості подачі розчину 0,0003-0,00042 м³/годі швидкості потоку повітря 15 м³/год.

3.4. Обґрунтування вибору класів чистоти виробничих приміщень виробництва ЛЗ (дезинфікуючих засобів, вентиляційного повітря), вибору первинної упаковки ЛЗ та її підготовки

Обґрунтування вибору класів чистоти виробничих приміщень

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

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

Приміщення для виробництва і контролю якості лікарських засобів:

- повинні використовуватися за призначенням;
- повинні бути досить просторими і обладнані так, щоб звести до мінімуму ризик змішування різних лікарських засобів і їх компонентів, перекресн забруднення, пропуск однієї стадії, в процесі виготовлення лікарських засобів та контролю їх якості;
- повинні мати гладкі внутрішні поверхні (стіни, підлоги, стелі, двері) з мінімальною кількістю виступаючих частин і ніш, повинні бути непроникні для рідин, легкодоступними для миття і обробки деззасобами. Матеріали, які застосовуються при обробці виробничих приміщень, повинні як легко митися, так і бути негорючими, стійкими до дії дезінфікуючих засобів;
- трубопроводи, освітлювальні елементи та вентиляційні отвори і т.д. повинні бути проєктовані і розташовані таким чином, щоб можна було легко мити, обробляти дезінфікуючими засобами. Для проведення технічного обслуговування доступ до них повинен здійснюватися, за можливості, поза виробничими приміщеннями;
- повинні міститися у бездоганній чистоті, піддаючись обов'язковому щоденному, а також генеральному прибиранню періодичному ремонту згідно із відповідними письмовими інструкціями. У цих приміщеннях повинен

регулярно проводиться контроль санітарно-гігієнічного стану під час роботи, в стані спокою, щоб гарантувати відповідність контрольованих параметрів нормі, встановленій у відповідних інструкціях певного підприємства;

- піддаються УФ-опроміненню для знезараження повітря за допомогою переносних опромінювачів стаціонарних (за присутності так і у відсутності людей);

- мають містити мінімально необхідну для ведення виробничого процесу кількість обладнання, меблів;

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

Приміщення пакування лікарських засобів повинні:

- бути просторими, щоб можна було правильно організувати технологічні операції і не заважати проходу для переміщення матеріалів;

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

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

Підготовка дезінфікуючих засобів

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

Необхідно чергування дезінфікуючих засобів для запобігання стійких форм мікроорганізмів. Бажано використання спороцидних дезінфікуючих засобів. Дезінфікуючі розчини повинні бути стерильні. Щоб уникнути зростання мікроорганізмів розбавлені розчини слід зберігати обмежений час

в заздалегідь вимитих ємкостях. Частково заповнені ємності можна доливати свіжоприготовленими розчинами.

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

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

Підготовка вентиляційного повітря

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

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

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

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

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

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

Системи підготовки вентиляційного повітря повинні забезпечувати його чистоту в "чистих" приміщеннях відповідно до таблиці і підтримувати позитивний перепад тиску по відношенню до оточуючих приміщень більш

низького класу чистоти. Сусідні приміщення різних класів чистоти повинні мати перепад тиску, як правило, 10-15 Па.

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

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

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

- забезпечувати відповідний ступінь очищення повітря від механічних частинок і мікроорганізмів;
- автоматично регулювати кліматичні параметри (температуру і відносну вологість повітря) для створення найбільш сприятливих умов для технологічного процесу та обслуговуючого персоналу;
- мати високу аеродинамічну стійкість для підтримки оптимального розподілу тиску та інших параметрів повітря в приміщенні і його окремих приміщеннях;
- виключити виникнення статичної електрики і пов'язаного з ним накопичення пилу;
- характеризуватися низьким рівнем шуму під час роботи;
- конструювати з використанням матеріалів і антикорозійного покриття, стійких до дезінфікуючих засобів, і непилящих.

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

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

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

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

Схема очистки повітря наступна. Атмосферне повітря проходить очистку на фільтрах першої ступені, в якості фільтра можливе використання мішечних (виготовлених з хімічного волокна) або коміркових фільтрів типу ФЯПБ, ФЯУБ, ФАРБ, ФЯВБ, які відрізняються природою наповнювача (пінополіуретан, металеві сітки, волокна). Основна функція фільтрів першої ступеню – видалення великих часток пилу для попередження абразивного пошкодження вентилятора. Ефективність очистки повинна складати 70% по часткам Корунда 4 мкм та 35% по атмосферному пилу для приміщень класу D. Фільтри працюють від початкового опору 50 Па до забивання 100 – 250 Па, після чого можуть регенеруватися але не більше 5 разів.

Для регенерації сухих фільтрів використовують продування або чистку пилососом. Коміркові фільтри миють, а потім сушать. В якості робіт по попередній підготовці проводиться дезінфекція систем повітроводів розчином формаліну [105].

Повітря надходить у фільтр грубого очищення, потім в центральний кондиціонер, де послідовно піддається нагріванню, охолодженню і знову нагріванню, потім надходить в парозволожувач і через вентилятор в фільтр тонкого очищення, потім – в вискоефективний фільтр. Далі повітря надходить в чисті приміщення різних зон А, В, С, D, в свою чергу забезпечені вискоефективними фільтрами фінішного очищення [106].

Обґрунтування вибору первинної упаковки та підготовки первинної упаковки

На сьогодні лактулозу у вигляді сиропу випускають у наступних типах первинної упаковки:

- скляні флакони;
- пластикові флакони;
- багатошарові пакетики-саше.

Скло – це аморфний твердий матеріал, який зазвичай крихкий і оптично прозорий. Скло складається з піску, кальцинованої золи, гранул, кремнію, алюмінію, бору, калію, цинку тощо. Більшість склянок містять приблизно 70-72% ваги 109-ого в кремнію (SiO_2). Флакони виготовлені зі скла мають ряд переваг:

- Вони доступні в різних формах і розмірах.
- Вони можуть витримувати колювання температури та тиску;
- Вони можуть захистити світлоочутливі препарати від світла під час їх зберігання.
- Вони непрооникні для атмосферних газів та вологи.
- Вони мають хороші захисні властивості [107].

Незважаючи на ряд переваг, випуск сиропу лактулози у скляних флаконах є дорогівартісним, що в подальшому вплине на ціноутворення препарату.

Також у ролі первинної упаковки використовують пластикові флакони. Вони виготовляються переважно з поліетилену високої щільності (HDPE). Даний матеріал має високе співвідношення міцності до густини. Пластикові флакони, як і флакони зі скла, доступні в різних формах і розмірах, можуть витримувати коливання температури та можуть захистити світлоочутливі препарати від світла під час їх зберігання [108].

Наступним типом упаковки є багатошарові пакетики-саше. Найважливіша функція гнучкої ламінованої упаковки полягає в тому, щоб захистити препарат всередині пакета від попадання вологи та кисню, що і є

важливим при зберіганні препарату. Як відомо, скло є хімічно інертним, непористим, жорстким пакувальним матеріалом, що забезпечує майже 100% бар'єр для вологи та кисню. Серед матеріалів, які використовуються для виготовлення саше, алюмінієва фольга різної товщини забезпечує захист від вологи та кисню порівняно зі склом. Волого-бар'єрні властивості полімерів, покритих нею, також відіграють важливу роль. Недоліком даного типу упаковки є можливість проникнення вологи та кисню всередину упаковки з часом впродовж терміну зберігання. Це в свою чергу погіршить якість препарату і призведе до небажаних побічних дій. [109].

Виходячи з вище викладеної інформації у ролі первинної упаковки для сиропу лактулози обираємо флакони з поліетилену високої щільності (див. рис. 3.4), які захищають від вологи, проходження кисню всередину упаковки та світла на рівні зі склом, але при цьому мають меншу вартість [110].



Рис. 3.4. Сироп лактулози у флаконі з поліетилену високої щільності.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Транспортування етикеток з приміщень для зберігання до ліній маркування та упаковки повинно бути організовано так, щоб гарантувати неможливість їх підробки і змішування з етикетками, призначеними для маркування інших лікарських засобів [111].

Обґрунтування вибору підготовки води

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

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

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

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

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

На першій стадії вода проходить через пісочний фільтр, де відбувається очищення від механічних домішок, після цього вона потрапляє через

вугільний фільтр, що дозволяє знизити концентрацію органічних речовин і хлору, потім вода направляється до установки пом'якшення води.

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

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

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

При використанні іонообмінного способу зниження жорсткості води відбувається за рахунок здатності деяких природних або синтетичних з'єднань, практично нерозчинних у воді,обмінювати іони, що перебувають у їхньому складі, Na^+ або H^+ на іони Mg^{2+} і Ca^{2+} , що спричиняють жорсткість води. Спосіб простий,компактний технічно, дешевий, у зв'язку із чим найпоширеніший [112].

Для остаточної очисткиводи використовується кілька методів – зворотній осмос, іонний обмін таелектродеіонізація.

Іонний обмін є одним з ефективних методіввидалення зводи аніонів та катіонів. Це одна з найважливіших стадій очищення,яка використовується як

етап попереднього очищення, так і для отримання води очищеної. Іонний обмін заснований на використанні іонітів - сітчастих полімерів різного ступеня зшивання, гелевою мікро- або макропористою структури, ковалентно пов'язаних з іоногенними групами.

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

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

- Наявність хімічно агресивних реагентів і, відповідно, високі експлуатаційні витрати на їх придбання і зберігання;
- Іонообмінні смоли вимагають частої регенерації для відновлення обмінної здатності і підвищеної уваги з боку обслуговуючого персоналу;
- Велика кількість хімічно агресивних стічних вод після проведення регенерації фільтрів і ін.

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

Технологія електродеіонізації має ряд переваг:

- Є неенергоємним процесом;
- Здійснюється безперервна регенерація;
- Не потрібна заміна смоли, оскільки смола не забракне;
- Не зупиняється виробництво води через виснаження смоли;
- Досить низькі витрати на обслуговування;
- Не потрібно хімічних реагентів для регенерації.

Зворотний осмос забезпечує найтонший рівень фільтрації. Зворотньоосмотична мембрана діє, як бар'єр для розчинних солей, неорганічних і органічних молекул, а також для мікроорганізмів і пірогенних речовин. В середньому вміст розчинених речовин після стадії зворотного осмосу знижується до 1-9%, органічних речовин - до 5%, колоїдні частинки,

мікроорганізми, пірогени відсутні. Вода, що отримується зворотним осмосом, містить мінімальну кількість загального органічного вуглецю.

Перевагами зворотного осмосу є:

- простота і незалежність від вмісту солі вихідної води,
- низькі енергетичні витрати і значно невисокі витрати на сервіс і технічний догляд,
- Система досить легко піддається мийці, дезінфекції та очищенню, не вимагає використання сильних хімічних реагентів і необхідності їх нейтралізації [113],
- виключна надійність методу, що обумовлює стабільно високу якість демінералізованої води незалежно від сезонних коливань якості вихідної води, технологічних параметрів і «людського фактору»;
- висока економічна ефективність;
- скорочення виробничих площ, простота експлуатації і автоматизація технологічного процесу [114].

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

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

РОЗДІЛ 4. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ

4.1. Специфікація обладнання ділянки виробничого біосинтезу

Таблиця 4.1

Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
ПЗ – 1	Повітрозабірник	1	Пристрій забірний, обладнаний металевою сіткою для видалення механічних забруднень. Фірма: ООО «НПЦ Вектор-Кондвент». Виробник: Україна[1].
Ф – 2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтр першого ступеня очистки типу ФЯП, Фільтруючий матеріал – мати зі скловолокна, Е = 80 %, продуктивність – 1530 м ³ /год[2].
К – 3	Компресор	1	Безмасляний компресор LFXR 0.7-1.0 компанії "Атлас Копко": максимальний тиск 10 бар, продуктивність 3.67 - 4.97 м ³ /хв[3].
Т – 4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Теплообмінник-охолоджувач серії Swegon фірми «Parasol», (Німеччина) продуктивність 63 м ³ /год[4].
Р – 5	Ресивер	1	Ресивер повітряний фірми ООО «Компресормаш-сервис», об'єм 1000 л, робочий тиск 16 атм[5].
Т – 6	Теплообмінник-нагрівач	1	Теплообмінник нагрівач серії NP70 фірми "DEFRO NP ", потік повітря 8268 м ³ /год, потужність 500 Вт, виготовлений з високоякісної котлової сталі[6].
Ф – 7	Фільтр тонкої очистки	1	Модель фільтра FMW. Ступінь очищення повітря 99%. Продуктивність фільтра складає 3400 м ³ /год.[7].

					НУХТ БТЕК 02.02.08 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Піддубняк К.С.			РОЗДІЛ 4. ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Карлаш Ю.В.					121	14
Консультант						116		
Н. Контр.						Кафедра БТМ		
Затверд.								

Р – 9 Р – 11 Р – 13	Реактор змішувач	3	Реактор-змішувач (5 л, 10 і 10 л), оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (100 об/хв), виготовлений зі сталі 12Х18Н10Т. Виробник: Україна.[8].
Д–8 Д – 10 Д – 12	Об’ємно-ваговий дозатор	3	Дозатор марки ДВСВ-50. Дозатор напівавтоматичний (гравітаційного типу). Виробник: Україна[9].
Н-14, Н-18, Н-20, Н-22	Насос відцентровий	4	Відцентровий насос фірми EBARA (Японія) серії Ebara 2CDX 200-30, продуктивністю 12,6 м³/год [10].
Ф –15 Ф –16 Ф – 23 Ф – 24	Індивідуальний фільтр очистки повітря	4	Microfluor®II Стерилизующие фильтры из фторопласта. Ступінь очищення повітря фільтром становить 99,999 %..[11].
ФР – 17	Ферментер	1	Ферментер фірми «BIOSTAT® Cplus», геометричний об’єм 30 л., швидкість перемішування 20–1500об/хв, потужність 800Вт[12]
ЗБ-19, ЗБ-22, ЗБ-24, ЗБ-26	Збірник культуральної рідини	4	Збірник (100 л, 250 л та 400 л), виготовлений зі сталі 12Х18Н10Т. Виробник: Україна.[8].
СП-21	Сепаратор	1	Сепаратор Clara 20 фірми Biotechno, продуктивність 120-200 л/год, швидкість обертів барабану – до 9512 об/хв., об’єм барабану 2,2 л, потужність 3,7 кВт [13].
БФ – 25	Мембранний біореактор	1	Ферментер фірми «BIOSTAT D-DCU», геометричний об’єм 1,25 м³, максимальна робоча температура + 150 °С, потужність двигуна від 3 до 15 кВт, та додатково додатково має вставку з кільцеподібних ланок, закріплених на лопатях перемішувального пристрою[14].
Н-27	Насос перистальтичний	1	Насос-дозатор ХУ120 з клапаном, виробництва Болгарія. Насос дозатор - це насос, для дозування необхідної кількості (обсягу) рідини, за заданий час. Насос дозатор перекачує рідину певного обсягу[15].

Примітка:

1. <https://www.c-o-k.ru> (Пристрій забірний).
2. <http://www.airpol.com.ua> (Фільтр першого ступеня очистки).
3. <http://atlas-co.ru> (Безмасляний компресорLFXR).
4. <https://promvit.com.ua> (Теплообмінник-охолоджувач серії Swegon фірми «Parasol»).
5. <https://kompressormash.com> (Ресивер повітряний).
6. <http://defro.ua> (Теплообмінник нагрівач).

7. <http://www.airpol.com.ua> (Модель фільтра FMW).
8. <http://defro.ua> (Реактор-змішувач).
9. <http://www.technowagy.com.ua> (Дозатор).
10. <http://filter-ua.com.ua/centrobezhnie-promishlennye-nasosi/centrobezhnyj-nasos-ebara-2sdh-200-30/> (Насос відцентровий).
11. <http://www.airpol.com.ua> (Microfluor®II Стерилізуючі фільтри).
12. <http://www.sartogsm.ru> (Ферментер фірми «BIOSTAT® Cplus»).
13. <https://biotechno.ru/catalog/promyshlennye-separatory/separatsionnyy-modul-clara-20/> (Сепаратор).
14. <http://www.sartogsm.ru> (Біореактор фірми «BIOSTAT D-DCU»).
15. <http://lutz.com.ua> (Насос перистальтичний).

4.2. Опис технологічної схеми виробничого біосинтезу

ДР 1. Підготовка аераційного повітря

ДР 1.1. Забір атмосферного повітря

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

ДР 1.2. Грубе очищення повітря

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

ДР 1.3. Стиснення повітря

Повітря необхідно стиснути для забезпечення умов нормальної аерації.

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

ДР 1.4. Охолодження повітря та видалення вологи

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

ДР 1.5. Нагрівання повітря

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

ДР 1.6. Очищення повітря в головному фільтрі

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

ДР 1.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

Всі інокулятори і ферментер оснащують індивідуальним фільтром (Ф-15, 16, 18, 19) для заключної очистки повітря. Ступінь очищення досягає 99,99 %.

ДР 2. Приготування та стерилізація поживного середовища

ДР 2.1. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту у колбах на качалці

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування 1,8 л поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках наведений у табл. 4.2.

Таблиця 4.2.

Композиції для приготування та стерилізації компонентів поживного середовища в колбах

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 1600 мл середовища, г(мл)	Композиція	Об'єм композиції, мл
Сахароза	15	24	А	550
Дріжджовий екстракт	15	24		
Кукурудзяний екстракт	5	8		
Вода		494		
$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	6	9,6	Б	625
KH_2PO_4	2	3,2		
Вода		612		
NaCl	5	8	В	625
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5	0,8		
Вода		616		
РАЗОМ		1600		1600

ДР 2.1.1. Приготування і стерилізація композиції А

Вимірюють 494 мл води, зважують сахарозу – 24 г/л, дріжджовий екстракт – 24 г/л, кукурудзяний екстракт – 8 г/л. і поміщають в колбу об'ємом 1 л, після чого закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві з режимом стерилізації 112°C 30хв.

ДР 2.1.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 9,6 г - $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, iKH_2PO_4 – 3,2г, потім поміщають в колбу, доливають 612 мл води і перемішують до повного розчинення солей, колбу закривають ватно-марлевою пробкою, потім стерилізують у автоклаві з режимом стерилізації 131°C протягом 40 хв.

ДР 2.1.3. Приготування і стерилізація композиції В

На вагах зважують 8 г $NaCl$, 0,8г - $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ і поміщають в колбу. Додають 616 мл води і перемішують до розчинення солей після чого закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві з режимом стерилізації 131°C 30хв.

ДР 2.2 Приготування та стерилізація поживних середовищ для ферментера на 30л .

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування 18 л поживного середовища наведений у табл. 4.3. На 10% припадає конденсат, який утворюється під час стерилізації середовища ферментері.

Таблиця 4.3.

Композиції для стерилізації компонентів поживного середовища в ферментері об'ємом 30 л

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 16,3 л середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, л
Сахароза	15	0,244	А	4,3
Дріжджовий екстракт	15	0,244		
Кукурудзяний екстракт	5	0.0815		
Вода		3,75		
$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	6	0,0978	Б	6
KH_2PO_4	2	0,0326		
Вода		5,87		
$NaCl$	5	0,0815	В	6
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5	0,00815		
Вода		5,91		
РАЗОМ		16,3		16,3

ДР 2.2.1. Приготування і стерилізація композиції А

Вимірюють 3,75л води, зважують сахарозу – 0,244кг/л, дріжджовий екстракт – 0,244кг/л, кукурудзяний екстракт – 0.0815кг/л. і через ваговий

дозатор (Д-8) подають в реактор змішувач (Р-9) об'ємом 5 л. Для кращого розчинення компонентів відбувається постійне перемішування (50-100 об/хв) за допомогою лопатевої мішалки, яка міститься в реакторі. Після розчинення середовище стерилізується гострою парою при температурі 112 °С, тиску 0,05 МПа, упродовж 30 хв. Після стерилізації композиція А насосом (Н-21) подається в ферментер (Фр-17) (до ТП 4.1).

ДР 2.2.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На вагах зважують 0,0978 кг - $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, iKH_2PO_4 – 0,0326 кг, потім, доливають 5,87 л води та і через ваговий дозатор (Д-10) завантажують до реактора змішувача (Р-11) об'ємом 10 л. Для кращого розчинення компонентів відбувається постійне перемішування (50-100 об/хв) за допомогою лопатевої мішалки, яка міститься в реакторі. Далі вміст реактора подають у апарат для виробничого виробничого біосинтезу (ФР-17) для стерилізації композиції. Ферментер (Фр-17), з композицією розчину солей, стерилізують подачею гострої пари з режимом стерилізації 130°C 40хв. Надходить (до ТП 4.1).

ДР 2.2.3. Приготування і стерилізація композиції В

На вагах зважують 0,0815 кг $NaCl$, 0,00815 кг - $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ та через ваговий дозатор (Д-12) завантажують до реактора змішувача (Р-13) об'ємом 10 л та додають 5,91 л води. Для кращого розчинення компонентів відбувається постійне перемішування (50-100 об/хв) за допомогою лопатевої мішалки, яка міститься в реакторі. Далі вміст реактора подають у апарат для виробничого виробничого біосинтезу (ФР-17) для стерилізації композиції. Ферментер (Фр-17), з композицією розчину солей, стерилізують подачею гострої пари з режимом стерилізації 130°C 40хв. Надходить (до ТП 4.1).

ДР 2.3. Підготовка розчину ПМС порошку молочної сироватки.

Порошок молочної сироватки розчиняють у фосфатному буфері (рН=7,0) до концентрації 270 г/л. Центрифугують 8000 g 20 хвилин для видалення твердих залишків.

Отриманий розчин стерилізують при 112°C, 0,05 МПа, 30 хв. Концентрацію лактози у розчині ПМС визначають ВЕРХ (До ТП 4.1)

ТП 3 Підготовка посівного матеріалу.

ТП 3.1. Підтримання колекційної культури *Bacillus subtilis* WB800.

Колекційну культуру зберігають у пробірках на скошеному сусло-агарі. Пересіви здійснюють кожні 3-4 місяці. Всі роботи з колекційною культурою проводять в строго асептичних умовах.

ТП 3.2. Одержання робочої культури на агаризованому середовищі

Колекційну культуру, що зберігається в пробірках з СА, розсівають петлею до ізольованих колоній на чашках Петрі з агаризованим сусло-агаровим середовищем в асептичних умовах. Вирощують при температурі 32°C упродовж 16 год .

ТП 3.3. Вирощування культури на агаризованому середовищі

Отримані ізольовані колонії в асептичних умовах пересівають петлею у пробірки з агаризованим сусло-агаровим середовищем. В пробірки засівають ізольовані колонії, що знаходяться на відстані не менше 1 см одна від одної. Тривалість інкубування 16 год при температурі 32°C.

ТП 3.4. Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках

Для вирощування рідкого посівного матеріалу у засівну колбу об'ємом 3 л, з композиції А (від ДР 2.1.1) вносять композицію Б (від ДР 2.1.2), та композицію В (від ДР 2.1.3).

Ретельно перемішують і розливають дванадцять попередньо простерилізованих качалочних колб об'ємом 750 мл.

У пробірку з робочою культурою, вирощеною на СА, асептично вносять 5 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини (змивають культуру), піпеткою відбирають одержану суспензію клітин і вносять у колби з розлитим поживним середовищем. Для засіву однієї колби використовують суспензію клітин, одержану з однієї пробірки.

Культивування здійснюють за температури 32°C упродовж 16 год.

Після вирощування штаму у колбах на качалці культуральну рідину з колб в асептичних умовах переносять у стерильну засівну колбу.

Після закінчення даного процесу проводять наступний контроль: мікробіологічний аналіз культуральної рідини кожної колби та визначення концентрацій біомаси, джерела вуглецю і азоту. Після його проведення посівний матеріал з колб вносять в стерильну засівну колбу.

ТП 4. Біосинтез

ТП 4.1. Виробниче культивування у ферментері об'ємом 30 л

У попередньо простерилізований апарат (ІН-17) об'ємом 30 л, де міститься 4,3 л композиції А (від ДР 2.2.1), за допомогою дозатора подається 6 л композиції Б(від ДР 2.2.2), та 6 л розчину композиції В (від ДР 2.2.3).Після цього подають посівний матеріал (від. ТП.3.4).

У сорочку ферментера подається пара, вмикається перемішувачий пристрій 150 об/хв і аерація та подається стерильне стиснене повітря через барботер(від ДР 1.7).

Біосинтез здійснюють за температури 32°C упродовж 16 год.

Під час культивування кожні 4 год відбирають проби культуральної рідини, щоб здійснити мікробіологічний контроль. Біосинтез закінчують при досягненні ферменту 4,5 Од/мл.

ТП 5. Відділення біомаси

ТП 5.1 Сепарування біомаси

По закінченню культивування культуральну рідину (Від ТП 4.1) за допомогою відцентрового насосу (Н-18) перекачують до проміжного збірника (ЗБ-19). А далі за допомогою насосу (Н-20) культуральна рідина перекачується до сепаратора (СП-21), де при 9000 об/хв. протягом 20 хвилин розділяється на тверду фазу - біомасу, яку збирають вручну та супернатант, який насосом (Н-22) подається у біореактор (БФ-25) на стадію біоконверсії лактози.

ТП 6. Біоконверсія

ТП 6.1. Біоконверсія у мембранному ферментері об'ємом 1,25 м³

У мембранний біореактор (БФ-25) подається субстрат (від ДР 2.3) і супернатант, що містить фермент (від ТП 5.1). Вмикають і проводять біоконверсію при температурі 75°C упродовж 26 год.

Після біоконверсії лактози в лактулозу проходить через мембранну установку, при цьому на мембрані затримується фермент, який потім можна відновити (зберігається до 42,4% ферменту після 10 циклів синтезу) та використовувати для наступного циклу синтезу.

ЗВ 7. Знешкодження відходів

ЗВ 7.1 Знешкодження рідких відходів

Стічні води можуть містити живу мікрофлору та інші шкідливі речовини. На виході з цеху стічні води спочатку стерилізують і нейтралізують. Потім їх спрямовують на очисні споруди, де здійснюють механічне очищення.

ЗВ 7.2 Знешкодження газоподібних відходів

Очищення газоподібних відходів здійснюють у фільтрах з попереднім охолодження відпрацьованого повітря та зниженням вологості у вологовідбійниках з подальшим нагріванням, щоб уникнути попадання крапельної вологи і змочування фільтрів.

Під час очищення відпрацьованого повітря використовують фільтри з волокнистих матеріалів.

4.3. Контроль ділянки біосинтезу

Упродовж процесу культивування періодично (кожні 4 год) відбирають проби культуральної рідини для мікробіологічного контролю, визначення концентрації біомаси і ферменту целобізо-2-епімерази, а також вмісту джерела вуглецю (сахарози) та азоту (амінний азот). Упродовж процесу ферментативної конверсії також відбирають кожну годину проби культуральної рідини для визначення концентрації лактулози та джерела вуглецю (лактози).

4.3.1. Мікробіологічний контроль

Мікробіологічний контроль здійснюється шляхом мікроскопіювання і висіву на чашки Петрі з агаризованими середовищами.

Проби культуральної рідини відбирають у стерильних умовах з колб за допомогою стерильної піпетки, а з інокуляторів і ферментера за допомогою пробоовідбірників.

Мікроскопіювання

Для мікроскопіювання готують препарат «роздавлена крапля» на знежиреному предметному склі, на яке наносять краплю культуральної рідини, накривають покривним скельцем і розглядають його з імерсією (збільшення 90×).

Під мікроскопом повинні спостерігатися грампозитивні рухливі паличкоподібні клітини *Bacillus subtilis* з закругленими кінцями, поодинокі або з'єднані попарно, розміри клітин $0,46-0,75 \times 1,42-1,92$ мкм. Є спори (рис 4.1) [115].

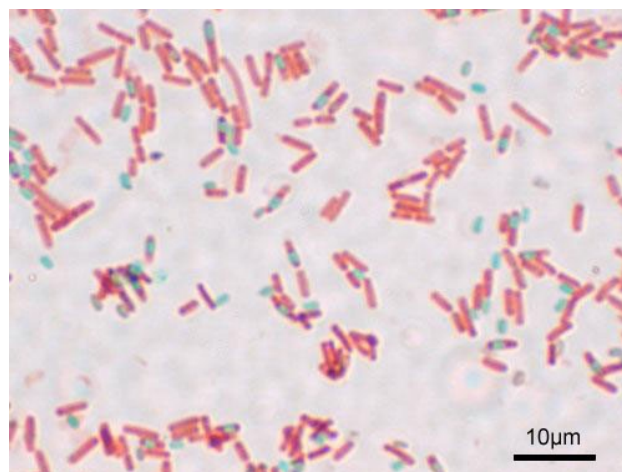


Рис 4.1. Клітини *B. subtilis* під мікроскопом

Відсутність під мікроскопом сторонньої мікробіоти свідчить про чистоту культури.

Висів на агаризовані середовища

Культуральну рідину розсівають петлею доо ізольованих колооній на чашки Петрі з м'ясоо-пептонним агаром (МПА) для виявлення бактерій та інкубують при температурі 37 °С та на чашки з сусло-агаром (СА) для виявлення грибів та дріжджів і інкубують при температурі 30 °С.

Через 24 години росоту на МПА при 37 °С утворюються колонії *B. subtilis* - форма колоній ризоїдна з неправильними або лопатевими краями. Колонії плоскі, блискучі, безбарвні, консистенція колоній м'яка, діаметр колоній 3-8 мм [114] (рис 5.2).

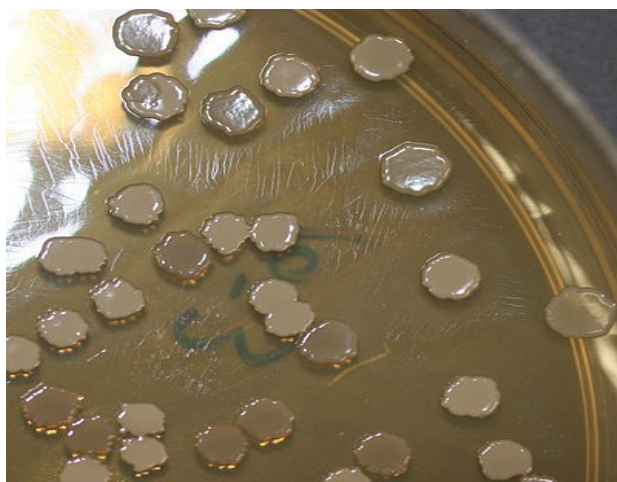


Рис. 4.2. Колонії *B. subtilis*

Відсутність колоній сторонніх бактерій на МПА, а також відсутність колоній грибів та дріжджів на СА свідчить проо чистоту культури.

Також прооводять мікробіологічний контроль чистоти поживного середовища. Для цього в асептичних умоовах відбирають пробу. Далі наливають по кілька крапель у чашки Петрі з СА та МПА і ставлять у термостати на 30°С та 37°С відповідно.

Відсутність колоній сторонніх мікроорганізмів свідчить про чистоту культури.

4.3.2. Показники росту і синтезу цільового продукту

Визначення концентрації біомаси

Концентрацію біомаси визначають за оптичною густиною клітинної суспензії з наступним перерахунком на суху біомасу за допомогою калібрувального графіка. У пробірки із 9 мл стерильної водопровідної води вносять по 1 мл культуральної рідини. Суміш збовтують, потім вимірюють оптичну густину за допомогою спектрофотометра (при 540 нм), отримані дані перераховують у біомасу за калібрувальним графіком [116].

Кількість живих клітин.

Датчик AberFutura. За допомогою датчика AberFutura проводять визначення кількості живих клітин. Моонітор біомаси Aber широко визнаний стандартом в режимі онлайн приладів для вимірювання життєздатної біомаси і був розроблений для задоволення вимог GAMP4. Це дозволяє в режимі реального часу точно вимірювати біомасу в біореакторах як в лабораторних, так і в промислових масштабах. Унікальний зонд, придатний для GMP, застосовує радіочастотне поле до біомаси в біореакторі. Вихід - це точне вимірювання концентрації життєздатних клітин.

Принцип роботи якого полягає в тому, що кожна жива клітина, з цілісною плазматичною мембраною, створює певний заряд. Електричний струм породжується датчиком Aber, який поляризує живі клітини з нешкодливою мембраною, яка непроникна для заряду (діелектрик), тим самим обмежуючи вільну частину іонів. Діелектрична природа плазматичної мембрани дозволяє заряду накопичуватися. Згідно використання цього датчика, отримуються надзвичайно точні результати через те, що заряд прямо пропорційний об'єму клітин, що містять непошкоджену мембрану і є залежним від типу клітини. На відміну від інших методів вимірювання біомаси, цей метод не вимірює мертві клітини, бульбашки газу, сміття або мікроносії. [117]

Визначення концентрації целобіозо-2-епімерази

Спочатку отримують супернатант культуральної рідини шляхом відділення біомаси центрифугуванням при 8000 об/хв при 4 °С протягом 10 хв.

У пробірку до 800 мкл 50 г/л розчину лактози в фосфатному буфері (рН 7,0) додають 200 мкл супернатанту. Реакцію проводять протягом 20 хв при 80 °С, ферментативну реакцію зупиняють, поміщаючи пробірку у киплячу водяну баню на 10 хв. Після цього визначають активність целобіозо-2-епімерази шляхом визначення кількості лактулози, що утворилася. Кількість утвореної лактулози аналізують за допомогою ВЕРХ (метод наведено у розділі 5.2.3). Одна одиниця (Од) активності целобіозо-2-епімерази відповідає кількості ферменту, при якій утворюється 1 мкмоль лактулози з лактози за 1 хов . Активність целобіозо-2-епімерази (Акр) переводять у концентрацію (С) у г/л за стандартною активністю целобіозо-2-епімерази (Аст): $C = A_{кр} / A_{ст}$

Визначення концентрації джерел вуглецю та лактулози

Визначення концентрації джерел вуглецю – сахарози та лактози, а також цільового продукту - лактулози проводять за допомогою вискоєфективної рідинної хроматографії (ВЕРХ).

Культуральну рідину центрифугують при 8000 об/хв при 4 °С протягом 10 хв. Відбирають супернатант і фільтрують через 0,22 мкм мембранні фільтри для проведення аналізу ВЕРХ.

Система ВЕРХ оснащена детектором показника заломлення (RI-101) та колонкою Rezex RCM-Моносахарид Ca²⁺ + (Phenomenex, США) для виявлення цукрових компонентів. 20 мкл супернатанту вводять у колонку. Елюцію здійснюють 88% ацетоном при 37 ° С при швидкості потоку 0,4

мл/хв. Час утримання субстрату лактози та цільового продукту - лактулози становлять 20,2 та 12,8 хв відповідно [118].

Визначення концентрації сазарози проводять з використанням колонки Aminex HPLX-87H при 65 °С. Елюоцію здійснюють 5 моль/л розчином H₂SO₄ при швидкості потоку 0,5 мл/хв [119].

Концентрацію цукрів визначають на основі того, що площа кожного піку пропорційна масовому відсотку відповідної сполуки у культуральній рідині.

Визначення концентрації джерела азоту

Дріжджовий екстракт є джерелом амінного азоту у середовищі. Вміст амінного азоту у культуральній рідині визначається за допомогою **формольного титрування** (метод Серенсена) [120,121]. Принцип методу заснований на блокуванні формальдегідом при значенні рН 7,0 вільних аміногруп і титрування лугом еквівалентної кількості карбоксильних груп.

Методика проведення аналізу: У мірну колбу вносять 1 мл супернатанту культуральної рідини, доводять до 20 мл водою. При необхідності розчин нейтралізують поотенціометрично до рН 7,0, шляхом додавання 0,1 М розчину натрію гідроксиду або 0,1 М розчину НСl. Після закінчення нейтралізації додають 2 мл 35% розчину формальдегіду, нейтралізованого в день аналізу 10% розчином натрію гідроксиду до рН 7,0, перемішують і титрують 0,1 М розчином натрію гідроксиду до значення рН 9,1, що не змінюється при перемішуванні протягом 2 хв, або до появи слабо-рожевого забарвлення (індикатор - фенолфталеїн 1% розчин).

Вміст амінного азоту в культуральній рідині у відсотках обчислюють за формулою:

$$X = \frac{V \times K \times 1,4 \times 100}{A \times 1000}$$

де: V - об'єм розчину натрію гідроксиду (0,1 моль/л) в мілілітрах, який пішов на титрування досліджуваної проби від рН 7,0 до 9,1;

К - поправка до титру розчину натрію гідроксиду (0,1 моль/л);

1,4 - кількість амінного азоту в міліграмах, еквівалентну 1,0 мл розчину натрію гідроксиду (0,1 моль/л);

А – об'єм культуральної рідини взятий на аналіз, мл;

100 - коефіцієнт перерахунку міліграмів в відсотки;

1000 - коефіцієнт перерахунку міліграмів в грами.

Таблиця 4.4

**Карта постадійного контролю біосинтезу ферменту целобіозо–2-
епімерази та біоконверсії лактози в лактулозу**

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
1	2	3	4	5
Кт 1.2 Грубе очищення повітря	Повітря на виході із фільтра грубої очистки, ступінь очищення, а також перепад тисків	Манометр технічний, перевірка ступеня очищення відповідно паспорта фільтра	Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення	Е = 95 %, тиск згідно паспорту
Кт 1.3 Стиснення повітря	Стиснене повітря, температура і тиск	Манометр технічний, термометр	Після компресування повітря	Р = 0,4 МПа, t = 120-150 °С

Продовження табл. 4.4

1	2	3	4	5
Кт 1.4 Охолодження повітря та видалення вологи	Охолоджене повітря, температура	Термометр технічний, вологомір	Після охолодження повітря	$t = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$, $W = 60\text{ }\%$
Кт 1.5 Нагрівання повітря	Нагріте повітря, температура	Термометр технічний	Після нагрівання повітря	$t = 35\text{ }^{\circ}\text{C}$
Кт 1.6 Очищення повітря в головному фільтрі	Очищене повітря, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр технічний, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у головного фільтра	$E = 99\text{ }\%$, тиск згідно паспорту
Кт 1.7 Очищення повітря в індивідуально му фільтрі	Очищене повітря, ступінь очищення, перепад тисків		Після очистки повітря в індивідуальному фільтрі	$E = 99,99\text{ }\%$, тиск згідно паспорту
Кт, Км 2.1.1 Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, стерильність	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура вимірюється безпе рервно під час стерилізації, мікроб. контроль після стерилізації	$t = 112\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 30\text{ хв}$, відсутність мікробіоти
Кт, Км 2.1.2 Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, стерильність	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура вимірюється безперервно під час стерилізації, мікроб. контроль після стерилізації	$t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 40\text{ хв}$, відсутність мікробіоти
Кт, Км 2.1.3 Приготування композиції В	Композиція В, температура, час, стерильність	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура вимірюється безперервно під час стерилізації, мікроб. контроль після стерилізації	$t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 40\text{ хв}$, відсутність мікробіоти
Кт, Км 2.2.1 Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, тиск, швидкість обертів мішалки та стерильність	Термометр технічний, годинник, манометр, тахометр, мікробіологічний контроль	Температура, тиск, швидкість обертів, вимірюються безперервно під час стерилізації, мікроб. контроль після стерилізації	$t = 112\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 30\text{ хв}$, $P = 0,05\text{ МПа}$, $n = 50\text{--}100\text{ об/хв}$ відсутність мікробіоти

Продовження табл. 4.4

1	2	3	4	5
Кт, Км 2.2.2 Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, швидкість обертів мішалки та стерильність	Термометр технічний, годинник, тахометр, мікробіологічний контроль	Температура, швидкість обертів, вимірюються безперервно під час стерилізації, мікроб. контроль після стерилізації	$t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 40\text{ хв}$, $n = 50\text{-}100\text{ об/хв}$ відсутність мікробіоти
Кт, Км 2.2.3 Приготування та стерилізація композиції В	Композиція В, температура, час, швидкість обертів мішалки та стерильність	Термометр технічний, годинник, тахометр, мікробіологічний контроль	Температура, швидкість обертів, вимірюються безперервно під час стерилізації, мікроб. контроль після стерилізації	$t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 40\text{ хв}$, $n = 50\text{-}100\text{ об/хв}$ відсутність мікробіоти
Кт, Км 2.3 Підготовка розчину ПМС порошку молочної сироватки	Розчин ПМС, рівень рН, частота обертів, час центрифугування, температура, час стерилізації, тиск, стерильність	рН метр, тахометр, годинник, термометр, манометр, мікробіологічний контроль	рН буфера, частота обертів, час центрифугування та стерилізації, температура, тиск перевіряється перед і під час процесу, а мікроб. контроль в кінці	$\text{pH} = 7,0$ $n = 8000\text{ об/хв}$, $\tau_1 = 20\text{ хв}$, $\tau_2 = 30\text{ хв}$, $t = 112\text{ }^{\circ}\text{C}$, $P = 0,05\text{ МПа}$, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.1 Підтримання колекційної культури <i>Bacillussubtilis</i> WB800	Колекційна культура <i>Bacillussubtilis</i> WB 800, тривалість пересівів та відсутність сторонньої мікробіоти	Годинник, мікробіологічний контроль	Пересіви у визначений термін, мікробіологічний контроль після пересівів та збереження	$\tau = 3\text{-}4\text{ місяці}$, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 3.2 Одержання робочої культури на агаризованому середовищі	Робоча культура (морологічна однорідність) температура, тривалість вирощування, відсутність сторонньої мікробіоти	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час вирощування, мікроб. контроль проводять після вирощування	$t = 32\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 16\text{ год}$, відсутність сторонньої мікробіоти

Продовження табл. 4.4

1	2	3	4	5
Кт, Км 3.3 Вирощування культури на агаризованому середовищі	Посівний матеріал (морфологічна, однорідність), температура, тривалість вирощування, відсутність сторонньої мікробіоти	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час вирощування, мікроб.контроль проводять після вирощування	$t = 32^{\circ}\text{C}$, $\tau = 16\text{ год}$, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 3.4 Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках	Посівний матеріал (морфологічна однорідність), температура, тривалість вирощування, визначення концентрації біомаси, джерела вуглецю і азоту, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, спектрофотометр, ВВЕРХ, формольне титрування, мікробіологічний контроль	Температура контролюються автоматично весь час вирощування, концентрація біомаси, джерела вуглецю і азоту та мікроб. контроль після вирощування	$t = 32^{\circ}\text{C}$, $\tau = 16\text{ год}$, $c(X) = 7,5\text{ г/л}$ $c(C)$, $c(N)$, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Кх, Км 4.1 Виробниче культивування у ферментері об'ємом 30 л	Культуральна рідина, температура, тривалість вирощування, частота обертів мішалки, визначення концентрації біомаси, джерела вуглецю та азоту і визначення активності ферменту целобіозо-2-епімерази та мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, тахометр, спектрофотометр, ВВЕРХ, формольне титрування, метод ВВЕРХ з попередньо підготовленим зразком, мікробіологічний контроль	Температура і швидкість обертання підтримується на зазначеному рівні протягом всього процесу, визначення концентрації біомаси, джерела вуглецю, азоту та активності ферменту та мікроскопіювання кожні 4 год	$t = 32^{\circ}\text{C}$, $\tau = 16\text{ год}$, $n = 150\text{ об/хв}$ $c(X) = 7,5\text{ г/л}$ $c(C)$, $c(N)$, $c(\text{целобіозо-2-епімераза}) = 4,5\text{ од/мл}$, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт 5.1 Сепарування біомаси	Біомаса, частота обертів, тривалість процесу, активність ферменту у фугаті	Тахометр, годинник, ВВЕРХ	Частота обертів перевіряється безпосередньо перед і під час процесу, активність ферменту у фугаті після проведення процесу	$n = 9\,000\text{ об/хв}$, $\tau = 20\text{ хв}$, $c(\text{целобіозо-2-епімераза}) = 4,5\text{ од/мл}$,

Закінчення табл. 4.4

1	2	3	4	5
Кт, Кх, Км 6.1 Біоконверсія у мембранному ферментері об'ємом 1,25 м ³	Субстрат з супернатантом фермента із зазначеною активністю, температура, тривалість біоконверсії, стерильність	ВВЕРХ, термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Активність фермента перевіряється перед початком біоконверсії, температура впродовж всього часу проведення процесу, а мікробіологічний контроль в кінці	с(целібіозо-2-епімераза) = 4,5 од/мл, t = 75°C, τ = 26 год, відсутність сторонньої мікробіоти

РОЗДІЛ 5. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ ЛАКТУЛОЗИ

5.1. Специфікація обладнання ділянки виділення та очищення лактулози

Таблиця 5.1

Специфікація обладнання ділянки післяферментаційних процесів

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
РЗ – 26	Реактор-змішувач	1	Реактор-змішувач (100 л), оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (100 об/хв), виготовлений зі сталі 12Х18Н10Т. Виробник: Україна.[1].
Н-27 Н-30	Насос відцентровий	2	Насос відцентровий ДАВ КРФ (Україна). Потужність двигуна – 0,370 кВт; Продуктивність – 0,06 м³/год; Висота подачі – 25 м [2].
РПВ -28	Роторно-плівковий випарник	1	Роторно-плівковий випарник виробництва компанії «Гранд» (Росія). Габаритні розміри, м: 1,5х3х4,5 Продуктивність, кг: 100 - 1400 по випарюваній волозі в годину [3].
З - 29	Збірник	1	Збірник об'ємом 80 л, виготовлений із нержавіючої сталі AISI 304. Виробник: ТОВ «Метал сервіс груп», Україна [4].

					НУХТ БТЕК 02.02.08 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Піддубняк К.С.			РОЗДІЛ 5. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ ЛАКТУЛОЗИ	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Карлаш Ю.В.					140	11
Консультант						135 Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.								

РС-31	Розпилювальна сушарка	1	Сушильна установка А1-ОР2Ч. Установка А1-ОР2Ч є прямою розпилювальною сушаркою з відцентровим дисковим розпиленням, верхнім підведенням теплоносія, вертикальною циліндричною камерою і дном киплячого шару продукту, з наступним його охолодженням у віброохолоджувачі. Виробник: ПАТ «Калинівський машинобудівний завод», Україна [5].
ФПВ – 32	Фасувально-пакувальна машина	1	Автоматична лінія розливу та закупорювання лікарських сиропів у флакони компанії KenoPharma (Китай) [6].

Примітка:

1. <http://defro.ua> (Реактор-змішувач).
2. <http://www.dabpump.com.ua> (Відцентровий насос)
3. <https://www.oborud.info> (Роторно-плівковий випарник)
4. <https://odessa.flagma.ua/> (Збірник)
5. <https://www.kmbp.com.ua> (Розпилювальна сушарка)
6. <https://promoboz.com> (Фасувально-пакувальна машина)

5.2. Опис технологічного процесу виділення та очищення лактулози

Технологічна схема виділення та очищення лактулози включає наступні технологічні процеси: концентрування розчину лактулози до концентрації 40%; процес сушіння; етап фасування, пакування та маркування цільового продукту.

Технологічну схему виділення та очищення наведено у графічній частині проекту.

ТП 8. Концентрування.

ТП 8.1. Випарювання розчину лактулози у роторно-плівковому випарнику.

Супернатант після кожного циклу біоконверсії збирають в реакторі-змішувачі (РЗ-26) з сорочкою і охолоджують до температури 15 °С шляхом подачі оборотної води в сорочку реактора. Потім з метою концентрування

розчину його подають за допомогою насосу (Н-27) до роторно-плівкового випарника (РПВ-28) Випарювання проходить у випарних трубах, усередині яких вбудовано обертовий турбулізуючий механізми роторного типу. Речовина, що переробляється подається через патрубков у верхній частині кожної із труб. Воно розтікається рівномірно по поперечному перетину труби роторно-плівкового випарника і стікає по внутрішній поверхні донизу у вигляді плівки під дією сили ваги; по поверхні плівки «ковзають» робочі органи роторного механізму. Труба зовні підігрівається парою до температури випару речовини. Обертові лопаті роторно-плівкового випарника створюють у плівці вихрові структури, що прискорюють у ній тепло - масообмінні процеси, забезпечують ефективний поділ рідкої й парової фаз при випарі. При цьому максимально гальмується утворення відкладень на внутрішній поверхні випарної труби.

У результаті більша частина води, стікаючі донизу по випарній трубі роторно-плівкового випарника, перетворюється у «вторинну» пару. «Вторинна» пара проходить через сепаратор, при цьому на пластинах сепаратора залишаються найбільш великі краплі вологи, захоплені парою, які містять концентрат речовини, що випарюється; вони стікають із пластин у піддон сепаратора. Концентрат, що утворився в результаті випарювання речовини, надходить із випарних труб у піддон сепаратора роторно-плівкового випарника. Далі він переміщається шнековим транспортером, вбудованим у сепаратор випарника або відкачується насосом у накопичувальну ємність для концентрату (З-29) звідки потім йде на подальшу обробку. "Вторинна" пара надходить у конденсатор, де конденсується. Конденсат "вторинної" пари подається в накопичувальну ємність. Випарювання розчину відбувається за температури 80 °С протягом 15 хв за тиску 0,008-0,01 МПа до досягнення вмісту сухих речовин 40%.

ТП 9. Сушіння.

ТП 9.1. Розпилювальна сушка розчину лактулози.

Сконцентрований розчин лактулози з накопичувальної ємності (З-29) за допомогою відцентрового насосу (Н-30) подається у розпилювальну сушарку (РС-31) з метою отримання сухого порошку лактулози. Концентрат, що підлягає висушуванню, безперервно подається в апарат через отвір кришки. Через центр кришки проходить вал електродвигуна. Наприкінці валу закріплений диск діаметром 100... 400 мм зі спеціальним рельєфом. Диск обертається зі швидкістю 5...40 тис.обертів/хв. Для досягнення такої швидкості між диском та валом встановлюють редуктор, що підвищує швидкість обертання вала електродвигуна. Іноді для обертання вала використовують парову турбінку.

Після надходження потоку концентрату до центра диска під дією відцентрової сили рідина заповнює канали рельєфу диска, мікропотоки рухаються до його периферії, зриваються з краю диска і надходять у верхню частину камери у вигляді мікрокрапель. Одночасно зверху подають потік гарячого газового сушильного агента (повітря). Попереднє нагрівання агента здійснюють в калориферах, які в свою чергу, обігріваються електроенергією, природним газом або паром.

Після контакту сушильного агента з мікрокрапельками вологого матеріалу відбувається майже миттєве випаровування води, але температура на поверхні матеріалу дорівнює температурі мокрого термометра і ніколи не досягає температури теплоносія. У результаті висушений продукт виходить з нижньої частини апарату.

Параметр процесу: температура сушіння $140 \pm 1^{\circ}\text{C}$, швидкості подачі розчину 0,0003-0,00042 м³/год і швидкості потоку повітря 15 м³/год.

Після процесу сушіння сухий порошок лактулози використовується для приготування сиропу.

ПМВ 10. Пакування та маркування цільового продукту.

ПМВ 10.1. Пакування та маркування лактулози у мішки

Фасування та маркування в упаковку (мішки, які перешкоджають потраплянню вологи при транспортуванні та зберіганні) здійснюється автоматично за допомогою фасувально-пакувальної машини (ФМП-32). Вкладання наповнених та герметичного запакованих мішків з субстанцією лактулози на піддони для зручності подальшого переміщення здійснюється персоналом.

5.3. Контроль ділянки виділення та очищення лактулози

Основними показниками, які контролюються у продовж виробничого процесу виділення та очищення лактулози є:

- ✓ Масова частка сухих речовин в розчині лактулози;
- ✓ Масова частка лактулози і інших вуглеводів в розчині і сухій лактулозі;
- ✓ Якість готового продукту:
 - розмір частинок;
 - вологість;
 - індекс розчинності.

Масову частку сухих речовин в розчині лактулози визначають за використання поляриметричного методу. Для проведення досліджень поляриметричним методом проводиться попередня очистка розчину лактулози від білка, мінеральних солей, молочної кислоти і інших компонентів. Методика полягала в наступному. 33 г досліджуваного продукту розчиняють в стакані, місткістю 250 см³, і кількісно переносять в мірну колбу, місткістю 100 см³.

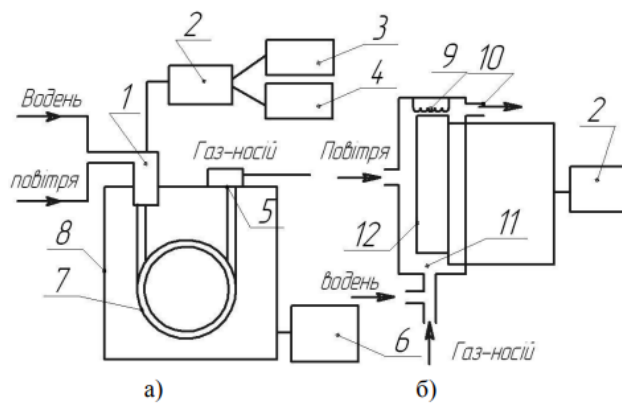
Додають 3 мл розчину оцтово-кислого цинку і 3 мл залізо-синеродистого калію. Після додавання реактивів вміст колби обережно перемішують, щоб уникнути утворення бульбашок. Потім обсяг доводять до мітки дистильованою водою при температурі 20 ± 2 °C, знову перемішують і через

20 ± 2 хвилини фільтрують через сухий складчастий фільтр. Фільтрат поляризують в поляриметричній трубці, довжиною 200 мм. Зняття показань поляриметра проводять не менше 5 разів, і з отриманих результатів беруть середньоарифметичне значення. У роботі використовується поляриметр Atago AP-300 (Японія) [122].

Для побудови калібрувальних залежностей використовують розчини лактози, лактулози і їх суміші, приготовані в різних співвідношеннях. Калібрувальні розчини мали концентрації сухих речовин, рівну концентрації сухих речовин в робочих розчинах [122].

Масова частка лактулози і інших вуглеводів в розчині і сухій лактулозі визначають методом газорідинної хроматографії (ГРХ) за допомогою хроматографа GCMS-QP2010 Ultra (Shimadzu, Japan) [123]. Даний метод використовується у зв'язку з складністю визначення точної (достовірної) масової частки лактулози у присутності інших вуглеводів.

Метод газорідинної хроматографії (ГРХ) заснований на розподілі аналізованих з'єднань між рідкою і газовою фазами. Завдяки високій чутливості і швидкості розділення він використовується для кількісного і якісного аналізів. Принципова схема газорідинного хроматографа приведена на рис. 5.1 [124].



1 – детектор; 2 – підсилювач; 3 – самописець; 4 – інтегратор;
 5 – місця введення проби; 6 – пристрій, регулюючий температуру термостата; 7 – хроматографічна колонка; 8 — термостат; 9 – запальний пристрій; 10 – вихідний отвір; 11 – полум'я; 12 – електрод.

Рис. 5.1. – Принципова схема газорідного хроматографа (а) і полум'яно – іонізаційного детектора (б).

Контроль якості готового продукту. *Розмір частинок.* Розмір частинок визначають мікроскопіюванням зразка лактулози на інверсійному мікроскопі - AxioVert.A1 (CarlZeiss AG, German) зі збільшенням $\times 40$ [123].

Вологість. Визначення масової частки вологи проводять за використання приладу Чижової [125].

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

нагрівання, а слабке – для підтримання необхідної температури (для перемикання режиму нагрівання спеціальний перемикач). Контактний термометр забезпечує сталість заданої температури в межах $\pm 1^{\circ}\text{C}$ [125].

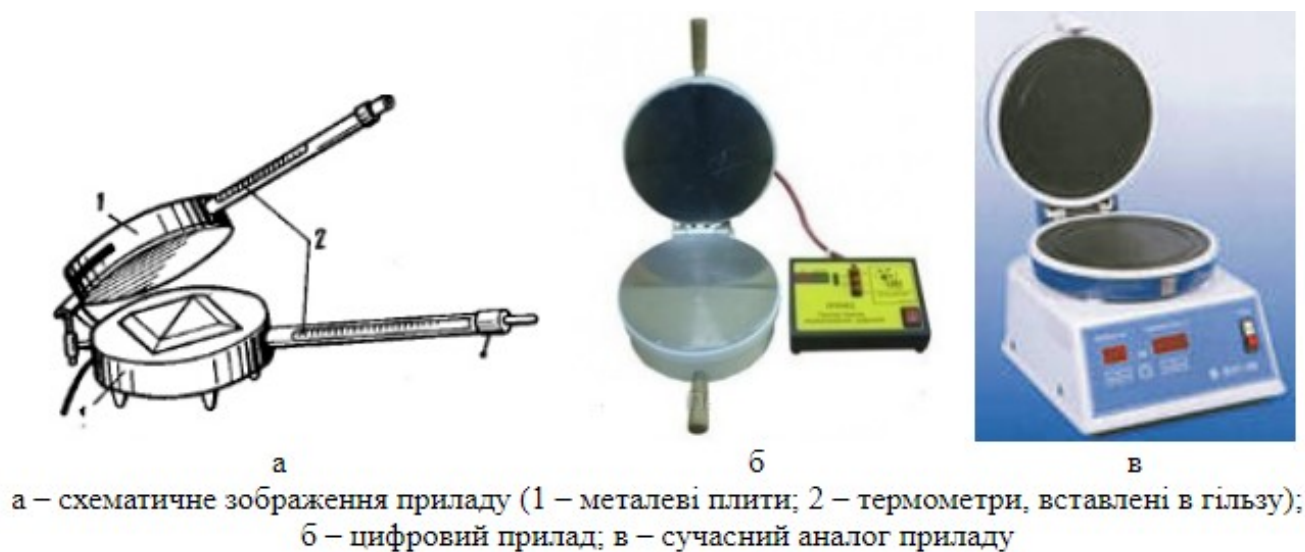


Рис. 5.2. Прилад Чигової

Висушують об'єкт в пакетах трикутної (для приладу круглої форми) або прямокутної форми (для приладу прямокутної форми). Для приладів Чигової старого зразку паперові пакети необхідно виготовити самостійно. Для виготовлення пакетів прямокутної форми лист паперу (газетного) форматом 20×14 згинають навпіл, а відкриті з трьох боків краї пакету загинають на 1,5 см (рис.3). Розмір готових пакетів $8,5 \times 11$ см. Для виготовлення пакетів трикутної форми папір форматом 15×15 см згинають по діагоналі і відкриті краї загинають на 1,5 см [125].

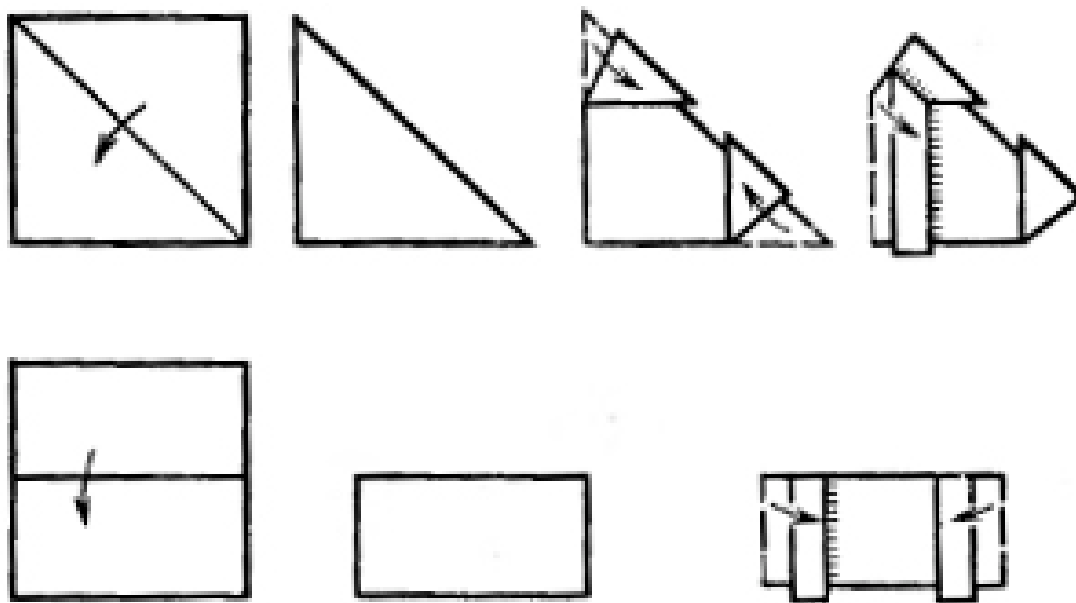


Рис. 5.3. Виготовлення паперових пакетів для приладу Чижової.

Для визначення масової частки вологи в продукті за допомогою експрес методу попередньо виготовляють 2 паперові пакети, які просушують у приладі Чижової за температури $160\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом 3 хв., охолоджують в ексикаторі 3 хв. та зважують. Далі їх розкривають та поміщають в них наважки лактулози (проводять два паралельних визначення). Пакети закривають та розміщують у приладі для висушування за температури $160\text{ }^{\circ}\text{C}$ на 4 хв. Після висушування пакети охолоджують в ексикаторі, зважують і за різницею мас наважки до та після висушування розраховують масову частку вологи [125].

Індекс розчинності. Визначення даного показника здійснюють у відповідності до ГОСТ 30305.4.95.

Методика заснована на вимірі об'єму нерозчинного осаду в відновленій пробі сухої лактулози.

Пробопідготовка. Пробу продукту розчиняють маленькими порціями води температурою $(40 \pm 2)\text{ }^{\circ}\text{C}$, ретельно розтираючи грудочки скляною паличкою, доводять об'єм водою до 100 см і витримують протягом 15-20 хв при температурі $18-25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Проведення випробування. Проводять паралельно два виміри.

Відновлений продукт перемішують, заповнюють ним центрифужні пробірки до мітки "10 см³" і закривають пробками. Пробірки обгортають фільтрувальним папером і поміщають в патрони центрифуги, розташовуючи пробками до центру симетрично одну проти іншої. Пробірки центрифугують протягом 5 хв. Після закінчення центрифугування, при відсутності чіткої межі, надосадову рідину зливають, залишаючи над осадом її шар висотою близько 5 мм. Потім доливають у пробірки воду температурою 18-25 ° С до мітки "10 см³", перемішують вміст пробірок паличкою, закривають пробками і центрифугують протягом 5 хв. По черзі виймають їх з патронів центрифуги і відраховують обсяг осаду до найближчого найменшого ділення пробірки, тримаючи її пробкою вниз, у вертикальному положенні так, щоб верхній рівень знаходився на рівні очей. При нерівному розміщенні осаду відлік проводять по середній лінії між верхнім і нижнім положеннями.

Обробка результатів. Індекс розчинності виражають в кубічних сантиметрах сирого осаду за шкалою пробірки.

За остаточний результат вимірювання беруть середнє арифметичне значення результатів двох паралельних вимірювань, округлене до першого десяткового знака[126].

Карта постадійного контролю виробництва лактулози

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю та показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та відбору проб	Нормативні значення показника
1	2	3	4	5
Кт, Кх 7.1 Випарювання розчину лактулози у роторно-плівковому випарнику	Обладнання, розчин лактулози, температура, час, тиск, вміст сухих речовин	Термометр, годинник, манометр	Температура та тиск визначаються безперервно під час процесу випарювання	$t = 80^{\circ}\text{C}$, $T = 15 \text{ хв}$, $P = 0,008 - 0,01 \text{ МПа}$, $CP = 40\%$
Кт 8.1 Розпилювальна сушка розчину лактулози	Обладнання, швидкість подачі розчину та повітря, температура процесу	термометр технічний	Швидкість подачі розчину та повітря, а також температура визначаються безперервно під час сушіння	$t = 140^{\circ}\text{C}$, $v_{p-nu} = 0,0003 - 0,00042 \text{ м}^3/\text{год}$, $v_{\text{повітря}} = 15 \text{ м}^3/\text{год}$

РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ ВИРОБНИЦТВА ЛЗ

6.1. Специфікація обладнання ділянки виробництва ЛЗ

Таблиця 6.1

Специфікація ділянки допоміжних робіт та процесу виробництва сиропу з лактулозою

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
1	2	3	4
ПЗ-1	Повітрязабірник	1	Пристрій забірний, обладнаний металевою сіткою для видалення механічних забруднень. Фірма: ООО «НПЦ Вектор-Кондвент». Виробник: Україна[1].
Ф-2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтр першого ступеня очистки типу ФЯП, Фільтруючий матеріал – мати зі скловолокна, Е = 80 %, продуктивність – 1530 м³/год[2].
В-3	Вентилятор	1	Відцентровий вентилятор Ostberg TKS 300 А, Швеція [3].
Ф-4	Головний фільтр очистки повітря	1	Модель фільтра FMW. Ступінь очищення повітря 99%. Продуктивність фільтра складає 3400 м³/год.[4].
Т-5	Теплообмінник-охолоджувач	1	Теплообмінник-охолоджувач серії Swegon фірми «Parasol», (Німеччина) продуктивність 63 м³/год [5].
Т-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Теплообмінник нагрівач серії NP70 фірми "DEFRO NP ", потік повітря 8268 м³/год, потужність 500 Вт, виготовлений з високоякісної котлової сталі [6].
Д-7	Дозатор	1	Дозатор VD1-V8 (Україна). Обсяг дозуючої речовини - 0,2-400 кг [7].
РЗ-8	Реактор-змішувач	1	Реактор-змішувач (100 л), оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (100 об/хв), виготовлений зі сталі 12Х18Н10Т. Виробник: Україна [8].
НФ-9	Нутч-фільтр	1	Нутч-фільтр середньої продуктивності НСЕ 0,8-1-12-01 (продуктивність – не менше 0,6 м³/год) фірми «ГК Еврохиммаш К.О.» (Україна) [9].

					НУХТ БТЕК 02.02.08 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Піддубняк К.С.				РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ ВИРОБНИЦТВА ЛЗ	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.	Карлаш Ю.В.						151	5
Консультант						Кафедра БТМ ¹⁴⁶		
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							

АЛР-10	Автоматична лінія розливу	1	Лінія розливу у флакони компанії «Украинские Линии Розлива» (Україна). Продуктивність – 2000 флаконів/год [10].
ПФ-11	Автоматичну картонажну машину для пакування флаконів	1	Автоматична картонажна машина для пакування флаконів АКМ -6000 компанії «Аурога» (Росія). Характеристики: ✓ Висока швидкість роботи – до 70 шт. за хвилину; ✓ Контроль наявності продукту та інструкції в коробці; ✓ Вбудована функція відбраковування незаповнених коробок [11].

Примітка:

1. <https://www.c-o-k.ru> (Пристрій забірний).
2. <http://www.airpol.com.ua> (Фільтр першого ступеня очистки).
3. <https://bioclimat.com.ua> (Вентилятор).
4. <http://www.airpol.com.ua> (Модель фільтра FMW).
5. <https://promvit.com.ua> (Теплообмінник-охолоджувач серії Swegon фірми «Parasol»).
6. <http://defro.ua> (Теплообмінник нагрівач).
7. <https://prom.ua> (Дозатор об'ємно-ваговий);
8. <http://defro.ua> (Реактор-змішувач);
9. <http://euromash.kiev.ua> (Нутч-фільтр);
10. <https://rozlivua.com> (Автоматична лінія розливу);
11. <https://aurora-pack.ru> (Автоматична картонажна машина для пакування флаконів).

6.2. Опис технологічного процесу виробництва ЛЗ

Технологічна схема виготовлення сиропу з лактулози включає допоміжні роботи (підготовка вентиляційного повітря) та технологічний процес (попереднє розчинення компонентів сиропу; варка сиропу; фільтрування сиропу; наповнення флаконів готовим сиропом; пакування флаконів у вторинну упаковку).

Технологічну схему наведено у графічній частині.

ДР 1. Підготовка вентиляційного повітря.

ДР 1.1. Забір атмосферного повітря

При визначенні місця забору зовнішнього повітря необхідно враховувати існуючі таможливі джерела аерозольних і газоподібних забруднень (димарі, автотранспорт, газоподібні промислові викиди, квітучі

рослини та ін). Забір повітря проводиться за допомогою повітрязабірника (ПЗ-1). Забір атмосферного повітря відбувається на висоті близько 20 – 30 м.

ДР 1.2. 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 3 (Ф-2), злегка змащене пружне скловолокно спеціального плетіння. Всередині фільтра розташовані дві решітки, між якими поміщають фільтруючий матеріал. Ступінь очищення становить $E = 80\%$.

ДР 1.3. Попередня фільтрація на фільтрах тонкої очистки

Попередня фільтрація відбувається на фільтрі F 6 (Ф-3), який призначений для попередньої очистки повітря від великодисперсних часток розміром більше 5 мкм (великий пил, продукти корозії), а також для захисту більш ефективного фільтра тонкої очистки. Ступінь очищення повітря 98%.

ДР 1.4. Стабілізація термодинамічних показників

Повітря за допомогою вентилятора (В-4) подається до кожухотрубного теплообмінника (Т-5), охолоджується за допомогою хладагенту фреону або підігрівається до $21-23^{\circ}\text{C}$ за допомогою теплообмінника-нагрівача (Т-6) в залежності від пори року, коли проводиться забір повітря. Вологість повітря повинна перебувати в межах 30-60%. Після цього повітря направляється до виробничих приміщень класу чистоти D.

ТП 2. Виробництво сиропу з лактулозою.

ТП 2.1. Попереднє розчинення компонентів сиропу.

На даній стадії в реактор-змішувач (РЗ-8) за допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-7) вносять лактулозу (з розрахунку 667 г лактулози на 1 л сиропу) та лимонну кислоту (з розрахунку 0,05 г лимонної кислоти на 1 л сиропу) і змочують його невеликою кількістю води очиної. Суміш залишають на 30 хвилин – за цей час лактулоза стає рихлою і легше розчиняється.

Додають решту води очищеної (0,33 л на 1 л сиропу), в сорочку реактора-змішувача подають пару і нагрівають суміш до 60-70°C.

ТП 2.2. Варка сиропу.

Після повного розчинення компонентів сироп повинен скипіти 2 рази, піну, що утворюється при цьому, видаляють шумівкою. Процес варки сиропу повинен бути нетривалим: нагрівання суміші для розчинення лактулози – 35-40 хв. і двократне кип'ятіння суміші – 20-25 хв за температури 60-70°C. Це виключає карамелізацію лактулози, яка призводить до зміни кольоровості сиропу та збільшення вмісту редуруючих речовин, що спричиняє зниження стійкості сиропів при зберіганні. Ознакою готовності сиропу є відсутність утворення піни.

ТП 2.3. Фільтрування сиропу.

Готовий сироп проціджують крізь металеву сітку і в гарячому стані фільтрують протягом 30 хв використовуючи нутч-фільтр (НФ-9). Для цього у верхню частину нутч-фільтра заливається отриманий сироп, а в нижній частині під перегородкою з допомогою насоса створюється вакуум. Під дією вакууму відбувається поділ сиропу на тверду (нерозчинені компоненти) та рідку (власне сироп) фази. Насос з'єднується з фільтром через ресивер. Призначення ресивера - "згладжувати" пульсації насоса і запобігати попаданню рідини до його механізмів.

ПМВ 3. Розлив у флакони та пакування готового сиропу.

ПМВ 3.1. Наповнення флаконів готовим сиропом.

Для наповнення флаконів сиропом, готовий сироп з попередньої стадії направляється до автоматичної лінії розливу (АЛР-10). На першому етапі порожні флакони (первинна упаковка), в які надалі відбуватиметься розлив сиропу, подається на транспортер. Далі виконується етап дозування сиропу. Наступним етапом є процес закупорювання, який виконується за допомогою розливної машини, моноблока або триблока. Наступний етап – етикетування. Завдяки якісному обладнанню відбувається процес розміщення етикеток. Далі флакони з сиропом направляються на пакування у вторинну упаковку.

ПМВ 3.2. Пакування наповнених флаконів у вторинну упаковку.

Процес пакування флаконів з сиропом у вторинну упаковку відбувається за використання автоматичної картонажної машини для пакування флаконів АКМ-6000 (ПФ-11). Картонні коробки під впливом вакууму подаються з магазину картонних пачок у вузол подачі, де формуються правильним чином. Магазин подачі за допомогою пневмоциліндра подає флакони і складену інструкцію, після чого укладає їх усередину упаковки. Далі заповнена коробка закривається і скидається в лоток. Далі упаковані флакони вкладаються у групову тару та транспортуються на склад виробництва.

Таблиця 6.2

Карта постадійного контролю виробництва лікарського засобу - сиропу з лактулозою

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
1	2	3	4	5
Кт 1.2. Грубе очищення повітря	Повітря на виході з фільтра грубої очистки, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення	E = 80 %, тиск згідно паспорту
Кт 1.3. Попередня фільтрація на фільтрах тонкої очистки	Повітря, ступінь очищення	Манометр технічний, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі тонкого очищення	E = 98 % тиск згідно паспорту
Кт 1.4. Стабілізація термодинамічних показників	Охолоджене повітря, нагрівання повітря, вологість	Термометр технічний, логометр	Після кондиціонування повітря	t = 21-23 ⁰ C, W= 30-60%
Кт 2.1. Попереднє розчинення компонентів сиропу	Лактулоза, лимонна кислота, температура води очищеної, час розчинення компонентів сиропу	Термометр технічний, годинник	Під час процесу розчинення	t = 60-70 ⁰ C T = 30 хв
Кт 2.2. Варка сиропу	Сироп, температура та час варки	Термометр технічний, годинник	Під час варки сиропу	t = 60-70 ⁰ C T ₁ = 35-40 хв T ₂ = 20-25 хв

Закінчення табл. 6.2

1	2	3	4	5
Кт 2.3. Фільтрування сиропу	Зварений сироп, фільтрувальний матеріал час фільтрування	Металева сітка і нутч-фільтр, годник	Під час проведення фільтрації	Вчасна заміна фільтрувального матеріалу T = 30 хв
Кт 3.1. Наповнення флаконів готовим сиропом	Об'єм сиропу в 1 флаконі, наявність закупорювальних матеріалів та етикетки	Програма в апараті (автомат для розливу сиропу та закупорки і етикетуванню флаконів), візуальний контроль	Під час наповнення та закупорки флаконів	V = 200 мл, візуальний контроль
Кт 3.2. Пакування наповнених флаконів у вторинну упаковку	Закупорені флакони із сиропом, кількість флаконів у коробках	Візуальний контроль	Під час пакування	1 флакон + 1 інструкція в пачки

ВИСНОВКИ

1. При прийомі лактулози відмічається низька частота побічних ефектів навіть у грудних дітей з перших днів життя, у вагітних і жінок, які годують грудьми. Тривале застосування лактулози не супроводжується такими небажаними явищами, як втрата електролітів або розвиток толерантності, що спостерігаються при застосуванні інших проносних засобів. Тому лактулоза є ефективним і безпечним засобом, тому її виробництво є досить актуальним.

2. Целобіозо-2-епімераза є найефективнішим каталізатором у синтезі лактулози. З її допомогою вдається отримати лактулозу з виходом, що перевищує 50%.

3. Зважаючи на найнижчу умовну вартість лактулози та найвищу продуктивність синтезу серед порівнюваних у роботі біологічних агентів обираємо штам *Bacillus subtilis* WB800, що синтезує целобіозо-2-епімеразу, за допомогою якої здійснюється ферментативний синтез лактулози.

4. Очищення лактулози переважно здійснюється шляхом адсорбції, а видалення залишків лактози найчастіше здійснюють за допомогою екстракції, за допомогою наведених методів вдається отримати лактулозу зі ступенем чистоти до 95%.

5. Найкращою лікарською формою для виробництва лактулози є сироп, так як дана форма володіє високою біодоступністю у порівнянні з твердими лікарськими формами, і вона обумовлена тим, що лікарська речовина знаходиться у розчиненому стані. Крім того, пероральний спосіб прийому є найбільш комфортним у педіатрії, як найбільш простий та природний.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Panesar P.S., Kumari S. Lactulose: Production, purification and potential applications. *Biotechnology Advances*. 2011; 29(6): 940–948. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.08.008
2. Wang H., Yang R., Hua X., Zhao W., Zhang W. Enzymatic production of lactulose and 1-lactulose: current state and perspectives. *Appl microbiol biotechnol*. 2013; 97(14): 6167-6180. DOI 10.1007/s00253-013-4998-3
3. Wu L., Xu C., Li S., Liang J., Xu H., Xu Z. Efficient production of lactulose from whey powder by cellobiose 2-epimerase in an enzymatic membrane bioreactor, *BioresTechnol*. 2017; 233, 305-312. doi: 10.1016/j.biortech. 2017.02.089
4. Aburto C., Guerrero C., Vera C., Illanes A. Improvement in the yield and selectivity of lactulose synthesis with *Bacillus circulans* β -galactosidase. *LWT*. 2020; 118. doi:10.1016/j.lwt.2019.108746
5. Karim A., Aider M. Contribution to the Process Development for Lactulose Production through Complete Valorization of Whey Permeate by Using Electro-Activation Technology Versus a Chemical Isomerization Process. *ACS omega*. 2020; 5(44): 28831-28843. doi:10.1021/acsomega.0c04178
6. Karim A., Aider M. Sustainable Electroisomerization of Lactose into Lactulose and Comparison with the Chemical Isomerization at Equivalent Solution Alkalinity. *ACS Omega*. 2020; 5(5): 2318-2333. doi:10.1021/acsomega.9b03705
7. Aider M., Gimenez-Vidal M. Lactulose synthesis by electro-isomerization of lactose: Effect of lactose concentration and electric current density. *Innov Food Sci Emerg Technol*. 2012; 16: 163–170. doi:10.1016/j.ifset.2012.05.007
8. Aït Aïssa A., Aider M. Lactose isomerization into lactulose in an electro-activation reactor and high-performance liquid chromatography (HPLC) monitoring of the process. *J Food Eng*. 2013; 119(1): 115–124. doi:10.1016/j.jfoodeng.2013.05.011

9. Aït Aissa A., Aïder M. Electro-catalytic isomerization of lactose into lactulose: The impact of the electric current, temperature and reactor configuration. *Int Dairy J.* 2014; 34(2): 213–219. doi:10.1016/j.idairyj.2013.08.010
10. Aït Aissa A., Aïder M. Ion exchange membranes controlled electro-catalytic synthesis of lactulose from lactose under refrigerated conditions. *Inn Food Sci Emerg Technol.* 2013; 20: 299–309. doi:10.1016/j.ifset.2013.09.013
11. Nooshkam M., Madadlou A. Microwave-assisted isomerisation of lactose to lactulose and Maillard conjugation of lactulose and lactose with whey proteins and peptides. *Food Chem.* 2016; 200: 1–9. doi:10.1016/j.foodchem.2015.12.094
12. Nagasawa T., Sato K., Kasumi T. Efficient alkaline isomerization of lactose to lactulose in the presence of an organogermanium compound. *J. Appl. Glycosci.* 2017; 64: 27–32. doi: 10.5458/jag.jag.JAG-2016_018
13. Wang M., Gasmalla M.A.A., Admassu Tessema H., Hua X., Yang R. Lactulose production by efficient isomerization of lactose catalyzed by processed sodium aluminate. *Food Chem.* 2017;233: 151-158.doi: 10.1016 / j. food chem. 2017.04.080
14. Soisangwan N., Gao D.-M., Kobayashi T., Khuwijitjaru P., Adachi S. Production of Lactulose from Lactose in Subcritical Aqueous Ethanol. *J Food Proc Eng.* 2016; 40(2). doi:10.1111/jfpe.12413
15. Nahla T. K. The Chemical Isomerization of Lactose to Lactulose by Using Sodium Hydroxide as Batch Reaction. *Pak. J. Chem.* 2016; 5(3): 1-7. doi: 10.15228/2016.
16. Hashemi S.A., Ashtiani F.Z. The isomerization kinetics of lactose to lactulose in the presence of sodium hydroxide at constant and variable pH. *Food Bioprod Process.* 2010; 88(2-3): 181–187. doi:10.1016/j.fbp.2009.11.001
17. Seo Y.H., Park G.W., Han J.-I. Efficient lactulose production from cheese whey using sodium carbonate. *Food Chem.* 2015; 173: 1167–1171. doi:10.1016/j.foodchem.2014.10.109.

18. Seo Y.H., Sung M., Han J.I. Lactulose production from cheese whey using recyclable catalyst ammonium carbonate. *Food Chem.* 2016; 197: 664–669. doi:10.1016/j.foodchem.2015.10.078
19. Awad R.A., Hagrass A.E., Salama W.M., Elmalek F.A., Eldardiry A.I. Lactulose production from milk permeate and its performance in healthy functional frozen yoghurt. *World J Dairy Food Sci.* 2014; 9(1): 1-9. DOI: 10.5829/idosi.wjdfs.2014.9.1.1127
20. Zimmer F., Souza A., Silveira A., Santos M., Matsushita M., Souza N., Rodrigues A. Application of Factorial Design for Optimization of the Synthesis of Lactulose Obtained from Whey Permeate. *JBrazChemSoc.* 2017. doi:10.21577/0103-5053.20170083
21. Сульман А.М., Долуда В.Ю., Лакина Н.В., Матвеева В.Г., Молчанов В.П., Сульман М.Г. Синтез лактулозы с использованием органических и неорганических катализаторов. *Вестник Тверского государственного технического университета.* 2019; 1(1): 88-99.
22. Сульман А.М. Изомеризация лактулозы на магнитных частицах с иммобилизованными борат ионами. *Символ науки.* 2015; 10(2): 62-64.
23. Бугаева А.А., Лодыгин А.Д. Исследование процесса синтеза лактулозы в ультрафильтратах молочной сыворотки. *Вестник Северо-Кавказского государственного технического университета.* 2012; 3: 123-125
24. Храмцов А.Г., Лодыгин А.Д., Евдокимов И.А., Рябцева С.А. Инновационные технологии пребиотических концентратов на основе нанокластеров вторичного молочного сырья. *Техника и технология пищевых производств.* 2012; 3(26): 1-7.
25. De Albuquerque T.L., Gomes S.D.L., D’Almeida A.P., Fernandez-Lafuente R., Gonçalves L.R.B., Rocha M.V.P. Immobilization of β -galactosidase in glutaraldehyde-chitosan and its application to the synthesis of lactulose using cheese whey as feedstock. *Proc Biochem.* 2018. doi:10.1016/j.procbio.2018.08.010
26. De Freitas M.de F.M., Hortêncio L.C., de Albuquerque T.L., Rocha M.V.P., Gonçalves L.R.B. Simultaneous hydrolysis of cheese whey and lactulose

production catalyzed by β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* NRRL Y1564. *Bioproc BiosystEng*. 2020; 43(4): 711-722.doi:10.1007/s00449-019-02270-y

27. Sitanggang A.B., Drews A., Kraume M. Continuous synthesis of lactulose in an enzymatic membrane reactor reduces lactulose secondary hydrolysis. *Biores Technol*. 2012; 167: 108–115. doi:10.1016/j.biortech.2014.05.124

28. Hua X., Yang R., Shen Q., Ye F., Zhang W., Zhao W. Production of 1-lactulose and lactulose using commercial β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* in the presence of fructose. *Food Chem*. 2013; 137(1-4): 1–7. doi:10.1016/j.foodchem.2012.10.003

29. Song Y.S., Lee H.U., Park C., Kim S.W. Batch and continuous synthesis of lactulose from whey lactose by immobilized β -galactosidase. *Food Chem*. 2013; 136(2): 689–694. doi:10.1016/j.foodchem.2012.08.074.

30. Khatami S., Zokaee Ashtiani F., Bonakdarpour B., Mehrdad M. The enzymatic production of lactulose via transglycosylation in conventional and non-conventional media. *Int Dairy J*. 2014; 34(1): 74–79. doi:10.1016/j.idairyj.2013.07.010 .

31. Guerrero C., Vera C., Illanes A. Synthesis of lactulose in batch and repeated-batch operation with immobilized β -galactosidase in different agarose functionalized supports, *Biores Technol*. 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.037>.

32. Guerrero C., Vera C., Serna N., Illanes A. Immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase in an agarose matrix functionalized by four different methods and application to the synthesis of lactulose. *Biores Technol*. 2017; 232: 53–63. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.02.003>

33. Guerrero C., Valdivia F., Ubilla C., Ramírez N., Gómez M., Aburto C., Vera C., Illanes A. Continuous enzymatic synthesis of lactulose in packed-bed reactor with immobilized *Aspergillus oryzae* β -galactosidase, *Biores Technol*. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.12.018>.

34. Guerrero C., Vera C., Acevedo F., Illanes A. Simultaneous synthesis of mixtures of lactulose and galacto-oligosaccharides and their selective fermentation. *J Biotechnol.* 2015; 209: 31–40. doi:10.1016/j.jbiotec.2015.06.394.
35. Ubilla C, Ramírez N, Valdivia F, Vera CV, Illanes A and Guerrero C. Synthesis of lactulose in continuous stirred tank reactor with β -galactose of *Aspergillus oryzae* immobilized in monofunctional glyoxyl agarose support.. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2020; 8:699. doi:10.3389/fbioe.2020.00699
36. Guerrero C., Vera C., Araya E., Conejeros R., Illanes A. Repeated-batch operation for the synthesis of lactulose with β -galactosidase immobilized by aggregation and crosslinking. *Biores Technol.* 2015; 190: 122–131. doi:10.1016/j.biortech.2015.04.039
37. Guerrero C., Aburto C., Suárez S., Vera C., Illanes A. Improvements in the production of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase crosslinked aggregates and their use in repeated-batch synthesis of lactulose. *Int J Biol Macromol.* 2019; 142: 452–462. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.09.117
38. Guerrero C., Vera C., Illanes A. Fed-batch operation for the synthesis of lactulose with β -galactosidase of *Aspergillus oryzae*. *Biores Technol.* 2017; 237: 126–134. doi:10.1016/j.biortech.2017.01.042
39. Sitanggang A.B., Drews A., Kraume M. Development of a continuous membrane reactor process for enzyme-catalyzed lactulose synthesis. *Biochem Eng J.* 2016; 109: 65–80. doi:10.1016/j.bej.2016.01.006
40. Cardoso B.B., Silvério S.C., Abrunhosa L., Teixeira J.A., Rodrigues L.R. β -galactosidase from *Aspergillus laticoffeatus*. A promising biocatalyst for the synthesis of novel prebiotics. *Int J Food Microbiol.* 2017; 257: 67–74. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.013.
41. Tang L., Li Z., Dong X., Yang R., Zhang J., Mao Z. Lactulose biosynthesis by β -galactosidase from a newly isolated *Arthrobacter sp.* *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2011; 38:471–476. doi: 10.1007/s10295-010-0897-0.
42. Corzo-Martínez M., Copoví P., Olano A., Moreno F.J., Montilla A. Synthesis of prebiotic carbohydrates derived from cheese whey permeate by a

combined process of isomerisation and transgalactosylation. *J Sci Food Agricult.* 2012; 93(7): 1591–1597. doi:10.1002/jsfa.5929

43. Wang H., Yang R., Hua X., Zhang W., Zhao W. An approach for lactulose production using the CotX-mediated spore-displayed β -galactosidase as a biocatalyst. *J Microbiol Biotechnol.* 2016; 26: 1267-1277. DOI: 10.4014 / jmb.1602.02036

44. Mayer J., Kranz B., Fischer L. Continuous production of lactulose by immobilized thermostable β -glycosidase from *Pyrococcus furiosus*. *J Biotechnol.* 2010; 145(4): 387–393. doi:10.1016/j.jbiotec.2009.12.017

45. Hashem A.M., Wafaa S.A.E.A.I., Helmy A., El-mohamady Y., Abouromia R. Factors affecting the production of lactulose by *Lactobacillus acidophilus* NRRL 4495 β -galactosidase and its biological activity. *Malaysian J Microbiol.* 2013; 9(1): 1-6.

46. Liao X.-Y., Zheng Q.-W., Zhou Q., Lin J.-F., Guo L.-Q., Yun F. Characterization of recombinant β -galactosidase and its use in enzymatic synthesis of lactulose from lactose and fructose. *J Mol Catalysis B: Enzymatic.* 2016; 134: 253–260. doi:10.1016/j.molcatb.2016.09.019

47. Song Y.-S., Lee H.-U., Park C., Kim S.-W. Optimization of lactulose synthesis from whey lactose by immobilized β -galactosidase and glucose isomerase. *Carbohydr Res.* 2013; 369: 1–5. doi:10.1016/j.carres.2013.01.002

48. Letsididi R., Hassanin H.A., Koko M.Y., Zhang T., Jiang B., Mu W. Lactulose production by a thermostable glycoside hydrolase from the hyperthermophilic archaeon *Caldivirga maquilingensis* IC-167. *J Sci Food Agricult.* 2017; 98(3): 928–937. doi:10.1002/jsfa.8539

49. Рябцева С.А., Храпцова А.Г., Павлова О.А. Дрожжи в биотехнологии пребиотиков из лактозосодержащего сырья. *Материалы Международ. науч.-практ. конф. Перспективные аграрные и пищевые инновации.* 2019; 6-9.

50. Shen Q., Zhang Y., Yang R., Pan S., Dong J., Fan Y., Han L. Enhancement of isomerization activity and lactulose production of cellobiose 2-

epimerase from *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. *Food chem.* 2016; 207: 60-67. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.02.067

51. Wang M., Yang R., Hua X., Shen Q., Zhang W., Zhao W. Lactulose production from lactose by recombinant cellobiose 2-epimerase in permeabilised *Escherichia coli* cells. *Int J Food Sci Technol.* 2015; 50(7): 1625–1631. doi:10.1111/ijfs.12776

52. Wang M., Hua X., Yang R., Shen Q. Immobilization of cellobiose 2-epimerase from *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* on commercial resin Duolite A568. *Food Biosci.* 2016; 14: 47–53. doi:10.1016/j.fbio.2016.03.001

53. Wang M., Wang H., Feng Y., Xu Q., Admassu H., Yang R., Hua X. Preparation and Characterization of Sugar-Assisted Cross-Linked Enzyme Aggregates (CLEAs) of Recombinant Cellobiose 2-epimerase from *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* (CsCE). *J Agricult Food Chem.* 2018; 66(29): 7712–7721. doi:10.1021/acs.jafc.8b02333

54. Kim Y.-S., Kim J.-E., Oh D.-K. Borate enhances the production of lactulose from lactose by cellobiose 2-epimerase from *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. *BioresTechnol.* 2013; 128: 809–812. doi:10.1016/j.biortech.2012.10.060

55. Kim Y.-S., Oh D.-K. Lactulose production from lactose as a single substrate by a thermostable cellobiose 2-epimerase from *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. *BioresTechnol.* 2012; 104: 668–672. doi:10.1016/j.biortech.2011.11.016

56. Rentschler E., Schuh K., Krewinkel M., Baur C., Claaßen W., Meyer S., Fischer L. Enzymatic production of lactulose and epilactose in milk. *JDairy Sci.* 2015; 98(10): 6767–6775. doi:10.3168/jds.2015-9900

57. Chen Q., Levin R., Zhang W., Zhang T., Jiang B., Stressler T., Mu W. Characterisation of a novel cellobiose 2-epimerase from thermophilic *Caldicellulosiruptor obsidiansis* for lactulose production. *J Sci Food Agricult.* 2016; 97(10): 3095–3105. doi:10.1002/jsfa.8148

58. Kuschel B., Seitzl I., Glück C., Mu W., Jiang B., Stressler T., Fischer L. Hidden Reaction: Mesophilic Cellobiose 2-Epimerases Produce Lactulose. *J Agricult Food Chem.* 2017; 65(12): 2530–2539. doi:10.1021/acs.jafc.6b05599
59. Kuschel B., Claßen W., Mu W., Jiang B., Stressler T., Fischer L. Reaction investigation of lactulose-producing cellobiose 2-epimerases under operational relevant conditions. *J Mol Catalysis B: Enzym.* 2016; 133: 80–87. doi:10.1016/j.molcatb.2016.11.022
60. Kim J.-E., Kim Y.-S., Kang L.-W., Oh D.-K. Characterization of a recombinant cellobiose 2-epimerase from *Dictyoglomus turgidum* that epimerizes and isomerizes β -1,4- and α -1,4-gluco-oligosaccharides. *Biotechnol Lett.* 2012; 34(11): 2061–2068. doi:10.1007/s10529-012-0999-z
61. Hua X., Yang R., Zhang W., Fei Y., Jin Z., Jiang B. Dual-enzymatic synthesis of lactulose in organic-aqueous two-phase media. *Food Res Int.* 2010; 43(3): 716–722. doi:10.1016/j.foodres.2009.11.008
62. Wang M., Ye F., Wang H., Admassu H., Feng Y., Hua X., Yang R. Phenylboronic Acid Functionalized Adsorbents for Selective and Reversible Adsorption of Lactulose from Syrup Mixtures. *J Agricult Food Chem.* 2018; 66(35): 9269-9281. doi:10.1021/acs.jafc.8b02152
63. Wang M., Ye F., Wang H., Yang R., Hua X. Highly Efficient Production and Simultaneous Purification of Lactulose via Isomerization of Lactose through an Innovative Sustainable Anion-Extraction Process. *ACS Sustainable Chem Eng.* 2020; 8(8): 3465-3476. <https://dx.doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b07779>
64. Wang M., Admassu H., Gasmalla M.A., Hua X., Yang R. Preparation of high-purity lactulose through efficient recycling of catalyst sodium aluminate and nanofiltration: a pilot-scale purification. *J Sci Food Agricult.* 2018; 98(14): 5352-5360. doi:10.1002/jsfa.9076
65. Guerrero C., Vera C., Illanes A. Selective bioconversion with yeast for the purification of raw lactulose and transgalactosylated oligosaccharides. *Int Dairy J.* 2018; 81: 131–137. doi:10.1016/j.idairyj.2018.02.003

66. Zanganeh N., Zabet M. Studying the Effect of Ethanol and Operating Temperature on Purification of Lactulose Syrup Containing Lactose. *IntJNutrFoodEng*. 2016; 9(3): 342-345.

67. Долганюк В.Ф., Асякина Л.К., Линник А.И., Носкова С.Ю. Анализ качественных характеристик лактулозы полученной способом распылительной сушки. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2015; 10(1): 17-20.

68. Долганюк В.Ф., Гаврилов Б.Г., Пискаева А.И., Козлова О.В. Оптимизация параметров получения сухой лактулозы. *Техника и технология пищевых производств*. 2013; 4 (31): 39-43.

69. Рябцева С.А., Храмцов А.Г., Будкевич Р.О., Анисимов Г.С., Чукло А.О., Шпак М.А. Физиологические эффекты, механизмы действия и применение лактулозы. *Вопросы питания*. 2020; 89(2).

70. Яковлева Л.В., Леницька О.Б., Ковальова Є.О., Бабенко Д.М. Клінічна ефективність лактулози. *Раціональна фармакотерапія*. 2012; 3(24): 56-62.

71. Лактулоза [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://www.gastroscan.ru/handbook/144/1516>

72. Новые перспективы развития рынка лактулозы в Украине. 2011; 3(774). <https://www.apteka.ua/article/69031>

73. Маркетинг производства добавок нового поколения с функциональными свойствами на основе подсырной и творожной сыворотки [Электронный ресурс] – Режим доступа: https://www.dairynews.ru/news/marketing_proizvodstva_dobavok_novogo_pokolenija_s.html

74. Lactulose market size 2020, Анализ доли промышленности, бизнес-стратегий, новых потребностей, темпов роста, последние тенденции, возможности и прогноз до 2026 года [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://icrowdru.com/2020/08/11/lactulose-market-size-2020-анализ-доли-промышленности-бизн/>

25D0%25BA%25D1%2582%25D1%2583%25D0%25BB%25D0%25BE%25D0%25B7%25D0%25B0__%25D1%2581%25D0%25B8%25D1%2580%25D0%25BE%25D0%25BF_180613.docx%3F1531295960&usg=AOvVaw3ErCxj69KjrcY-5ZEgIYu7

84. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». — 1- вид. — Харків: PIPEГ, 2001. — Доповнення 1. — 2004. — 520 с.

85. ОФС.1.4.2.0002.15 Извлекаемый объем [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-4-2-0002-15-izvlekaemyj-obem/>

86.ОФС.1.2.1.0014.15 Плотность [Електронний ресурс] – Режим доступу: <http://pharmacopoeia.ru/ofs-1-2-1-0014-15-plotnost/>

87. Романуха В.В. Особливості перебігу цирозу печінки у жінок та чоловіків. *Науковий журнал*. 2018; 21(21): 40-43.

88. Чисельність населення України в 2020 р. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://index.minfin.com.ua/ua/reference/people/2020/>

89. Fadeenko G.D., Solomentseva T.A. Хронічний запор у практиці сімейного лікаря. *Український терапевтичний журнал*. 2020; 1: 83-89. doi: <https://doi.org/10.30978/UTJ2020-1-83>

90. Wu L., Xu C., Li S., Liang J., Xu H., Xu Z. Efficient production of lactulose from whey powder by cellobiose 2-epimerase in an enzymatic membrane bioreactor, *Biores Technol*. 2017; 233, 305-312. doi: 10.1016/j.biortech.2017.02.089

91. Chen Q., Levin R., Zhang W., Zhang T., Jiang B., Stressler T., Mu W. Characterisation of a novel cellobiose 2-epimerase from thermophilic *Caldicellulosiruptor obsidiansis* for lactulose production. *J Sci Food Agricult*. 2016; 97(10): 3095–3105. doi:10.1002/jsfa.8148

92. Hashem A.M., Wafaa S.A.E.A.I., Helmy A., El-mohamady Y., Abou-romia R. Factors affecting the production of lactulose by *Lactobacillus acidophilus* NRRL 4495 β -galactosidase and its biological activity. *Malaysian J Microbiol*. 2013; 9(1): 1-6.

93. Клінічна ефективність лактулози [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://rpht.com.ua/ua/archive/2012/3%2824%29/pages-56-62/klinichna-efektivnist-laktulozi>
94. Shendurse A. M., & Khedkar C. D. Lactose. *Encyclopedia of Food and Health*. 2016; 509–516.
95. Данилов І. П. Апарати мікробіологічної промисловості [Текст]: навч. посібник І. П. Данилов, С. І Самійленко.-Харків : НТУ «ХП», 2008. – 272.
96. Карлаш Ю.В. Основи проектування біотехнологічних виробництв. [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобувачів освітнього ступеня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» освітньо-професійної програми «Біотехнологія» денної та заочної форм навчання /Ю.В. Карлаш, Є.О. Омельчук - К: НУХТ, 2019. – 252 с.
97. Мосичев М.С. Общая технология микробиологических производств / Мосичев М.С., Складнев А.А., Котов В.Б. - М.: Легкая и пищевая промышленность, - 1982, - 264 с.
98. Дытнерский Ю.И. Основные процессы и аппараты химической технологии. Пособие по проектированию. М.: Альянс, 2010. 495 с.
99. Соколов В. А., Яблокова М. А. Аппаратура микробиологической промышленности / Л.: «Машиностроение. Ленинград», 1988 – 277с.
100. Інноваційне обладнання галузі. Змістовий модуль 1. Виробництво препаратів мікробіологічного синтезу [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобувачів освітнього ступеня «Магістр» спеціальності 133 «Галузеве машинобудування» освітньо-професійної програми «Інжиніринг фармацевтичних та біотехнологічних виробництв» денної та заочної форм навчання / О.О. Губеня, В.І. Теличкун, М.Г. Десик, Ю.С. Теличкун. – К.: НУХТ, 2020. – 278 с.
101. Marcial-Coba MS., Knøchel S., Nielsen DS. Low-moisture food matrices as probiotic carriers. *FEMS Microbiol Lett*. 2019; 366 (2).

102. Santivarangkna C., Kulozik U., Foerst P. Inactivation mechanisms of lactic acid starter cultures preserved by drying processes *J. Appl. Microbiol.* 2008;105: 1–13.
103. Долганюк В.Ф., Гаврилов Б.Г., Пискаева А.И., Козлова О.В. Оптимизация параметров получения сухой лактулозы. *Техника и технология пищевых производств.* 2013; № 4: 39-43.
104. Правила организации производства и контроля качества лекарственных средств (GMP) [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://gmpua.com/World/Ru/OCT4251098/GMP.htm>.
105. Дезінфекція поверхонь [Електронний ресурс] – Режим доступу: http://www.lysoform.net/ua/products/2-dezinfekcija_poverkhon.
106. Мотина Г., Абрамов А. Система подготовки вентиляционного воздуха. Ремедиум. Журнал о российском рынке лекарств и медицинской технике. 2003; (3):72-74.
107. Glass as a packaging material in pharmaceutical packaging. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.slideshare.net/shwetashelke35/glass-as-a-packaging-material-in-pharmaceutical-packaging-71496789>.
108. Consumers demand very particular types of packaging [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.comar.com/news-rom/probiotics-consumers-demand-very-particular-types-of-packaging/>
109. Das S., Bhattacharjee D., Manna A., Basu S. et al. Effect of different excipients and packaging materials on commercial preparation. Das, et al., *IJPSR.* 2014; 5 (5): 1830-1836.
110. Методичні рекомендації щодо виконання санітарно-гігієнічних вимог та проведення мікробіологічного контролю у виробництві нестерильних лікарських засобів. Наказ N 502 від 14.12.2001. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://zakon.rada.gov.ua/rada/show/v0502282-01#Text>
111. Очищення та підготовка води [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://buklib.net/books/36176/>.

112. А.Е. Приходько, А.А.Пантелеев. Предварительная подготовка и получение воды очищенной – Режим доступа: <http://www.medbusiness.ru/248.php>.

113. Технологія та обладнання одержання питної та технічної води. Практикум. Частина 1. [Електронний ресурс]: навчальний посібник для студ. спеціальності 161 «Хімічні технології та інженерія», спеціалізації «Хімічні технології неорганічних речовин та водоочищення» / Н.М. Толстопалова, М.І. Літинська, Т.І. Обушенко; КПІ ім. Ігоря Сікорського – Електронні текстові дані (1 файл: 4,00 Мбайт). – Київ : КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2019. – 101 с.

114. Пат. RU2553518C1 Асатунова А.М., Дубяга В.М. Штамм бактерій *Bacillus subtilis* для отримання біопрепарату проти фітопатогенних грибів. 2015-06-20. – Режим доступу: <https://patents.google.com/patent/RU2553518C1/ru>.

115. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія // Підручник. – К.: НУХТ. – 2010. – 632 с.

116. Датчик Aber Futura [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://www.futura-pico.com>.

117. KimY.-S., OhD.-K. Lactulose production from lactose as a single substrate by a thermostable cellobiose 2-epimerase from *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. BioresTechnol. 2012; 104: 668–672. doi:10.1016/j.biortech. 2011.11.016.

118. De Freitas M.de F.M., HortêncioL.C., de Albuquerque T.L., Rocha M.V.P., GonçalvesL.R.B. Simultaneous hydrolysis of cheese whey and lactulose production catalyzed by β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* NRRLY1564. Bioproc Biosyst Eng. 2020; 43(4): 711-722.doi:10.1007/s00449-019-02270-y

119. Подкопаев Я.В., Домотенко Л.В., Шепелин А.П. Разработка питательных сред для выделения и культивирования возбудителей гнойных бактериальных менингитов. – 2017. – Режим доступа: <https://www.obolensk.org/center/diss/podkopaev/%D0%9F%D0%BE%D0%B4%>

D0%BA%D0%BE%D0%BF%D0%B0%D0%B5%D0%B2%20%D0%94%D0%B8%D1%81%D1%81%D0%B5%D1%80%D1%82%D0%B0%D1%86%D0%B8%D1%8F.pdf

120. МУК 4.2.2316–08. Методические указания. Методы контроля бактериологических питательных сред. — М. : Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2008. — 67 с.

121. Гнездилова А. И. Сравнительная оценка способов и обоснование оперативного метода экспериментального определения доли изомеризации лактозы в лактулозу. Молочнохозяйственный вестник. 2019; 1(33): 79-88.

122. Долганюк В.Ф., Гаврилов Б.Г., Пискаева А.И., Козлова О.В. Оптимизация параметров получения сухой лактулозы. *Техника и технология пищевых производств*. 2013; № 4: 39-43.

123. Хроматографічні методи аналізу. Методичні вказівки для студентів, що навчаються за спеціальністю 133 Галузеве машинобудування, спеціалізації "Обладнання переробних і харчових виробництв" ОС Бакалавр - Таврійський державний агротехнологічний університет, 2019. – 20 с.

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

126. ГОСТ 30305.4-95. Методика выполнения измерений индекса растворимости.

