

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 СТАБНІКОВ

“ 03 ” листопада 2021 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

МАТУСЕВИЧА Дмитра Сергійовича

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Мікробні мукоадгезивні лікарські засоби: біотехнологічні аспекти одержання

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

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від “02” листопада 2021 року № 865-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 1 лютого 2022 року

3. Вихідні дані до роботи

Культивування біологічного агенту Absidia repens CBS 102.32 проводиться в виробничому ферментері з робочим об'ємом культивування 6.9м3 для отримання мукоадгезивного лінійного полісахариду хітозану, з метою наступного виділення та очищення продукту, та виготовлення мукоадгезивного лікарського засобу

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

Переваги використання мукоадгезивних агентів. Мікробіологічні методи отримання мукоадгезивних агентів. Пререквізити, обґрунтування та проведення біосинтезу та стадій виділення та очищення мукоадгезивної сировини для подальшого використання для виготовлення ЛЗ. Обґрунтування підготовчих робіт для та технології отримання мукоадгезивного ГЛЗ. Контроль всіх стадій виробництва, включаючи: біосинтез, виділення та очищення та виготовлення ЛЗ.

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема виробничого біосинтезу у форматі А1, апаратурна схема виробничого біосинтезу у форматі А1, технологічна схема виділення та очищення продукту культивування у форматі А1, апаратурна схема виділення та очищення продукту культивування у форматі А1, технологічна схема отримання готового ЛЗ у форматі А1, апаратурна схема отримання готового ЛЗ у форматі А1

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 03 листопада 2021 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1.	Аналіз літературних даних.	03.11.2021 – 08.11.2021	
2.	Літературний огляд	09.12.2021 – 20.12.2021	
3.	Техніко-економічне обґрунтування випуску субстанції для лікарського засобу та виробництва готової форми ЛЗ. Розрахунок потужності виробництва субстанції. Розрахунок потужності виробництва ЛЗ.	21.12.2021 – 25.12.2021	
4.	Обґрунтування вибору технологічної схеми біосинтезу субстанції та технологічної схеми виробництва ЛЗ. Обґрунтування вибору біологічного агенту, поживного середовища для його культивування, способу культивування та методів виділення та очищення.	26.12.2021 – 30.12.2021	
5.	Обґрунтування підготовки виробничої ділянки виробництва ЛЗ.	31.12.2021 – 06.01.2022	
6.	Опис технологічного процесу виробничого біосинтезу та виділення та очищення продукту культивування. Контроль ділянки біосинтезу та ділянки виділення та очищення.	07.01.2022 – 17.01.2022	
7.	Опис технологічного процесу виробничого ЛЗ. Контроль ділянки виробництва ЛЗ.	18.01.2022 – 24.01.2022	
8.	Фіналізація змісту та оформлення роботи.	25.01.2022 – 01.02.2022	

Здобувач _____
(підпис)

Дмитро МАТУСЕВИЧ _____
(Ім'я та прізвище)

Керівник роботи _____
(підпис)

Світлана ТЕТЕРІНА _____
(Ім'я та прізвище)

УМОВНІ СКОРОЧЕННЯ

ГГ – гідролізат геміцелюлози

ГК – гіберелінова кислота

ГКА – глюкозо-картопляний агар

ГПД – глюкозо-пептонно-дріжджове середовище

ГПЦ – гідроксилпропілцелюлоза

ІМК – індол-3 масляна кислота

К – кінетин

МВ – м'ясомолочне виробництво

МС – мелясно-сольове середовище

МЦ – метилцелюлоза

ПВП – піровінілпіролідон

ПВ – паперове виробництво

СС – сироватково-сольове середовище

ХДА – хітозандеацетилаза

ХС – хітозансинтаза

Na-КМЦ – натрій карбоксиметилцелюлоза

РЕФЕРАТ

В даній кваліфікаційній роботі описано та обґрунтовано вибір технологічних рішень для одержання, виділення та очищення мікробного хітозану, отриманого зі штаму *Absidia repens* CBS 102.32. Пропонується технологія одержання мікробного хітозану як альтернатива хімічно одержуваному хітозан-N-ацетилцистеїну для використання в очних краплях Lacrimera® для лікування синдрому сухого ока. Технологічними етапами є підготовка аераційного повітря для забезпечення кисневих потреб грибка, чотирьох-етапна підготовка інокуляту для виробничого культивування, та безпосередньо саме виробниче культивування. Процес виробничого процесу триває 44 години, з досягненням хітозану концентрації в клітинній стінці на рівні 2,8 г/л. Для очищення та виділення, технологічними етапами є підготовка допоміжних розчинів для очищення та осадження хітозану, два етапи підготовки міцелярної маси, чотирьох-етапне очищення хітозану, осадження та сушіння в ліофільній сушарці, та пакування отриманого продукту.

Для отримання готового лікарського засобу, технологічними етапами є підготовка виробництва, етап приготування проміжного продукту ЛЗ, стерилізуюча фільтрація, наповнення у флакони та запаювання та пакування готового лікарського засобу. Технологія також містить стадію мийки виробничого реактору.

Курсовий проект складається з п'ятих розділів, списку використаних джерел з 105 найменувань, технологічної та апаратурної схем для технологічного біосинтезу, виділення та очищення продукту культивування та виготовлення готового лікарського засобу (6 схем формату А1). Загальний обсяг роботи – 115 сторінок, містить 14 таблиць та 5 рисунків.

Ключові слова: *хітозан, очищення, виділення, очні краплі, синдром сухого ока, грибок, Absidia repens, мукоадгезивні препарати.*

ЗМІСТ

ВСТУП.....	6
РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД	9
РОЗДІЛ 2. Техніко-економічне обґрунтування випуску субстанції для лікарського засобу (ЛЗ) та виробництва готової форми ЛЗ.....	33
2.1. Передумови виробництва ЛЗ.....	33
2.1.1. Аналіз фармакологічних властивостей цільового ЛЗ, галузей використання	33
2.1.2. Огляд потенційного ринку лікарського засобу	36
2.1.3. Перелік виробників кінцевого продукту і виробників (постачальників) субстанції.....	38
2.1.4. Опис лікарського засобу згідно АНД.....	39
2.1.5. Розрахунок потреби у субстанції для випуску ЛЗ	40
2.1.6. Розрахунок річної потужності виробництва субстанції, об'єму ферментера та кількості виробничих циклів.	42
2.1.7. Розрахунок річної потужності виробництва ЛЗ та кількості серій на рік.....	45
РОЗДІЛ 3. Обґрунтування вибору технологічної схеми біосинтезу субстанції та технологічної схеми виробництва ЛЗ.....	47
3.1. Обґрунтування вибору біологічного агенту, поживного середовища для його культивування	47
3.2. Обґрунтування вибору способу культивування і типу ферментера	56
3.3. Обґрунтування стадій виділення і очищення субстанції для виробництва ЛЗ	58
3.4. Обґрунтування вибору класів чистоти виробничих приміщень (підготовка персоналу, дезінфікуючих засобів, вентиляційного повітря).....	63
3.5. Обґрунтування вибору підготовки первинної упаковки.....	66
3.6. Обґрунтування вибору підготовки води.	66
3.7. Вибір технологічних стадій та операцій обладнання.....	68
РОЗДІЛ 4. Опис технологічного процесу виробничого біосинтезу та виділення та очищення продукту культивування.....	70
4.1. Специфікація обладнання ділянки	70
4.2. Опис технологічної схеми виробничого біосинтезу.	76
4.3. Опис технологічної схеми ділянки виділення та очищення.....	87
4.4. Контроль ділянки біосинтезу.....	90
4.5. Контроль ділянки виділення та очищення.....	94
РОЗДІЛ 5. Опис технологічного процесу виробництва ЛЗ.	98
5.1. Специфікація обладнання ділянки виробництва ЛЗ.	98
5.2. Опис технологічного процесу виробництва ЛЗ.....	100
5.3. Контроль ділянки виробництва ЛЗ	103

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

ГРАФІЧНА ЧАСТИНА

ВСТУП

Однією із важливих умов активності лікарської форми є необхідність її утримання в необхідному місці, достатній проміжок часу [1].

Проте успішна доставка лікарського засобу, є надзвичайно складним процесом, по причині наявності в організмі серії захисних механізмів, що ускладнюють можливість досягнення ефективної концентрації ЛЗ в місцях дії [1, 2].

Біоадгезія відноситься до процесу прикріплення лікарської форми до специфічної біологічної локації в організмі. Біологічною поверхнею може бути тканини епітелію, або слизова оболонка на поверхні тканини. Якщо поверхня прикріплення – слизова оболонка, процес називається мукоадгезією.

Біоадгезивні полімери значно пролонгують час утримання ліків, і в додаток створюють близький контакт між ЛЗ і поглинаючою тканиною, що може зумовити високу концентрацію ліків в місці введення і як наслідок кращу дію [1].

Значна кількість полімерів використовуються в формуляціях мукоадгезивних лікарських форм, але серед них, хітозан та його похідні вважаються найкращими [3].

Хітозан – катіонний полісахаридний біополімер, який володіє мукоадгезивними властивостями і вже довгий час розглядається як один з найперспективніших біополімерів при розробці пролонгованих лікарських форм для офтальмологічної доставки. Хітозан – це деацетильоване похідне природнього полісахариду хітину, який можна знайти в достатку в морських ракоподібних, комах та грибах.

Біосумісний та біорозкладний, хітозан має поширене застосування в біомедицині. Його перевагами є здатність контролювати вивільнення біоактивних агентів, покращувати парацелюлярну доставку ліків, здатність утворювати іонні зв'язки з багатовалентними аніонами [1, 4].

					НУХТ БТЕК 02.02.09 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Магусевич Д.С.			ВСТУП	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Тетеріна С.М.					6	115
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Завдяки своїй можливості пролонгувати час перебування антибіотиків в рогівці ока та формувати нанокапсули з високою очною проникністю, хітозан має високий потенціал використання в фармації [5].

В останні десятиліття хітозан інтенсивно застосовують в медицині, ветеринарії, косметології, сільському господарстві, харчовій промисловості, біотехнології. Хітин і його похідні застосовують при лікуванні таких важких запальних захворювань шлунково-кишкового тракту, як розлитої гнійний перитоніт і деструктивна форма запалення підшлункової залози. На основі хітозану розроблені детоксикуючі сорбенти. У гранулярній і гелевій формі вони забезпечують високу хімічну і біологічну активність полімеру, достатню проникність і високу гідрофільність. Хітозан зупиняє ріст патогенної мікрофлори, аглютенує мікроби, стимулює функціональну активність макрофагів, індукує секрецію арахідонової кислоти за допомогою активації фосфоліпази. Також, хітозан збільшує виділення медіаторів імунної відповіді, зокрема, інтерлейкіну I, стимулюючого проліферацію Т-хелперів, а також активність гранулоцитів, переважно нейтрофілів. Фагоцитарні частки хітину і хітозану підсилюють утворення активних форм кисню в альвеолярних макрофагах у мишей [6].

Крім того відмічено, що хітозан проявляє антисептичну активність по відношенню до найбільш поширених збудників гнійних ускладнень. За силою дії він поступається антибіотикам, але при контакті з мікробної флорою в рідкому середовищі зберігає бактеріостатичну активність протягом 2-2,5 доби [6].

Гемостатичні властивості хітозану дозволяють швидко згущувати кров, а також дозволяють зменшити біль, блокуючи нервові закінчення. У пластичній хірургії хітозан використовують при пересадці шкіри. Він сприяє швидкому загоєнню ран і зменшує утворення рубців після пластичної операції [7].

У фармацевтичному виробництві хітозан використовується в якості наповнювача в таблетках. Наприклад, його використовують як носій в ліках з контрольованим вивільненням. Пребіотичні властивості хітозану дозволяють краще засвоювати активні речовини ліків [7].

Наноккомпозити на основі хітозану важливі для регенеративної медицини і тканинної інженерії кісток і хрящів. Біорозкладаний, біосумісний хітозан, володіє

антибактеріальними і загоюючими властивостями, все частіше використовують при створенні каркасів. Для підвищення механічної міцності додають наночастинки CaP або CaCO₃, нановолокна гідроксиапатиту. Присутність наночастинок робить матрицю шорсткішою, що створює сприятливі умови для адгезії [8].

В області створення онковакцин актуальною задачею є пошук нових препаратів з ад'ювантною активністю. Хітозан активно вивчають як протипухлинний препарат. Також, сьогодні його розглядають як ад'ювант для вакцин проти онкозахворювань. Молекули хітозану надають дуже широкі можливості для регуляції інтенсивності і напряму імунної відповіді за рахунок можливості приєднання до хітозану лігандів TLR [6,9].

Ще одним перспективним напрямком розробки ад'ювантів на основі хітозану є матричні конструкції. Показано, що Хітозанова матриця для таргетної доставки вакцинного комплексу по лімфоїдним структурам може запобігати розпаду імуногенного компонента вакцини [9]. Також активно ведуться дослідження, що стосуються використання хітозану в офтальмології. Велика увага приділяється проблемі низької біодоступності лікарських препаратів, яка пояснюється наявністю природних фізіологічних і анатомічних окулярних бар'єрів [10].

Актуальність. На сьогоднішній день проблема підвищення біодоступності та здійснення прологнування ЛЗ є досить актуальною темою в фармацевтиці. Це в першу чергу зумовлено неможливістю певних лікарських форм затримуватися у місці дії тривалі проміжки часу, так як і необхідності створення лікарських засобів з уповільненим або пролонгованим вивільненням для хворих, з постійною потребою в підтриманні певних концентрацій ЛЗ в крові [1,2,5].

Новизна. Новизною кваліфікаційної роботи є те, що для отримання використовуваних в фармації мукоадгезивних сполук найбільшою часткою відбувається за допомогою загальноприйнятих хімічних методів, які є найбільш поширеними на ринку активних фармацевтичних інгредієнтів та допоміжних речовин для ЛЗ. Натомість, використання біотехнологічно отриманих сполук дозволяє гарантувати певні фізико-хімічні показники мукоадгезивної сировини, які виявляють кращі властивості густини, мукоадгезії та тривалості затримання [49.66].

РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

1.1. Перспективи застосування мукоадгезивних агентів у фармацевтичних формах, як передумова необхідності виробництва мукоадгезивних полімерів мікробіологічного походження

На сьогодні, ряд дослідників [11, 12, 13, 14] вважають, що створення мукоадгезивних лікарських форм є одним з найбільш перспективних і доступних шляхів вирішення контрольованої доставки лікарських речовин в цільові органи або клітини.

Слизові оболонки являють собою зволожені поверхні, що вистилають стінки органів шлунково-кишкового тракту, дихальних шляхів, внутрішню частину очних вік, а також носову і ротову порожнини, статеві органи. Наявність слизових оболонок дозволяє здійснювати трансмукальну доставку ліків наступними способами: букальний, назальний, інстиляційний, вагінальний, ректальний, та через шлунково-кишковий тракт [15].

Функціональне значення слизових оболонок полягає в формуванні захисного бар'єру, який захоплює або блокує сторонні предмети і патогенні бактерії і перешкоджає їх проникненню в клітини, викликаючи пошкодження або захворювання. Створений захист в забезпечується секрецією слизу який складається переважно з води (близько 95%), глікопротеїнів (2-5%), ліпідів і солей. Слиз присутній або у вигляді шару гелю, що прилипає до поверхні слизової оболонки, або у вигляді розчинної або суспендованої форми у просвіті. Глікопротеїни мають назву – муцини, які містять кислі полісахариди. Різноманітність органів-мішеней зумовлює широкий вибір лікарських форм для застосування на слизових оболонках [16, 17].

					НУХТ БТЕК 02.02.09 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Матусевич Д.С.			Розділ 1. Літературний огляд	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Тетеріна С.М.					9	115
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Використання явища мукоадгезії сприяло успішному створенню нових або вдосконалених офтальмологічних, букальних і вагінальних систем доставки ліків, включаючи гелі і плівки [18]

Полімерні плівки є відмінними кандидатами для таргетної доставки ліків, чого неможливо досягти з таблетками або рідкими складами. Їх використовують як для системного, так і локальної дії вводиться такими шляхами, як оральний, трансбуккально, сублінгвальний, і трансдермальний [19]. Серед різних шляхів використання тонких плівок для доставки ліків в під'язикову або на щічну слизову оболонку викликало величезний інтерес [20]. Також в даний час розробляються офтальмологічні плівки для подолання очних бар'єрів і запобігання втрати ліків через систему слізного дренажу. Таким чином, мукоадгезивна полімерна плівка набуває популярності і визнання на фармацевтичній арені в якості нової лікарської форми для доставки ліків.

З точки зору гнучкості та комфорту мукоадгезивні плівки можуть бути кращими перед клейкими таблетками. Крім того, вони можуть обійти відносно короткий час перебування пероральних гелів на слизовій, які легко змиваються і виводяться слиною. Більше того, у випадку місцевої доставки при захворюваннях порожнини рота, плівки також допомагають захистити поверхню рани, тим самим сприяючи зменшенню болю та більш ефективному лікуванню захворювання. Ідеальна плівка повинна бути гнучкою, еластичною та м'якою, але в достатній мірі міцною, щоб протистояти поломці через стрес від рухів рота. Він також повинен володіти хорошою слизово-адгезивною міцністю, щоб утримуватися в роті протягом бажаної тривалості дії. Набряк плівки, якщо він виникає, не повинен бути занадто великим, щоб запобігти дискомфорту [21].

Відомо, що найбільш поширеним і зручним серед всіх способів доставки речовини є використання лікарських форм, що вводяться перорально. Зокрема, за даного способу мукоадгезивні системи доставки мають ряд переваг перед іншими системами з контрольованим вивільненням [18, 22]:

- Націлювання та локалізація лікарської форми на конкретне місце.
- Забезпечення тісного контакту між лікарською формою та абсорбуючою слизовою, що призводить до високої доступності ліків в абсорбуючій тканині.

Окрім того, при прийомі ліків через ротову порожнину вони піддаються метаболічним перетворенням печінкою та ферментативному розщепленню в шлунково-кишковому тракті організму, що обмежує прийом певного класу ліків білкової природи, пептидів, нуклеотидів, а також через низьку проникність слизових оболонок - високомолекулярних полімерів. Мукоадгезивні полімери можуть не тільки сповільнювати рух лікарських форм по шлунково-кишковому тракті, а й пригнічувати дію протеолітичних ферментів, тим самим підвищувати біодоступність включених лікарських речовин з поганою стабільністю [23].

Іншим недоліком перорального способу прийому лікарських препаратів є їх досить швидке виведення їх з організму, що вимагає прийому більшої кількості ліків і може проявляти токсичний вплив на організм. Адгезія лікарських форм на слизовій поверхні веде до зростання концентрації лікарських речовин на місці аплікації і дозволяє знижувати загальну дозу введеного препарату як при системному введенні, так і при місцевому застосуванні. Тому висока проникність слизових оболонок розширює можливості мукоадгезивної лікарської форми в порівнянні з трансдермальними лікарськими формами [18, 24].

На відміну від звичайних таблеток, мукоадгезивні таблетки дозволяють пити та говорити без значного дискомфорту. Вони розм'якшуються, прилипають до слизової і утримуються в положенні до повного розчинення та / або вивільнення. Мукоадгезивні таблетки можуть бути адаптовані до будь-якої слизової тканини, включаючи ті, що знаходяться в шлунку, таким чином пропонуючи можливості локального та системного контрольованого вивільнення ліків. Нанесення мукоадгезивних таблеток на слизові тканини шлункового епітелію використовується для введення препаратів локалізованої дії. Мукоадгезивні таблетки широко використовуються, оскільки вони випускають препарат протягом тривалого періоду, зменшують частоту прийому препарату та покращують відповідність пацієнта. Основним недоліком мукоадгезивних таблеток є їх недостатня фізична гнучкість, що призводить до поганої відповідності пацієнта при тривалому та багаторазовому застосуванні. [25]

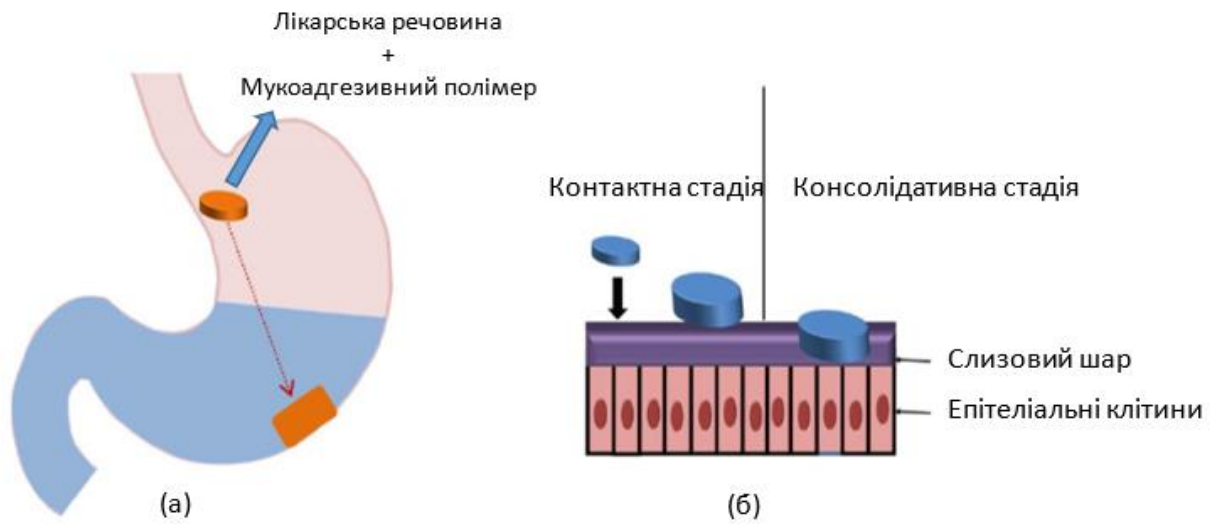


Рис. 1. Принцип мукоадгезивних систем: (а) – загальне уявлення; (б) - механізм мукоадгезивного прикріплення. Адаптовано з джерела [26]

В оглядах за останні 10 років [27, 28] повідомляється, що мукоадгезія складається з двох стадій: контактної та консолідаційної. На першій стадії відбувається контакт між мукоадгезивом та слизовою оболонкою, зволоження з подальшим набряканням препарату, що ініціює збільшення площі контакту з шаром слизу і більш глибокого контакту на наступній стадії мукоадгезії. Набухання полімеру спричинене його гарною спорідненістю з водою. На етапі консолідації мукоадгезивні матеріали активуються присутністю вологи, яка в свою чергу пластифікує систему, дозволяючи молекулам слизової адгезії звільнитися і зв'язатися слабкими Ван-дер-Ваальсовими та водневими зв'язками. Є дві теорії, що пояснюють етап консолідації: теорія дифузії та теорія дегідратації. Згідно з теорією дифузії, мукоадгезивні молекули та глікопротеїни слизу взаємодіють за допомогою взаємопроникнення їх ланцюгів та побудови вторинних зв'язків. Для цього мукоадгезивна система характеризується особливостями, що сприяють як хімічній, так і механічній взаємодії: молекули з угрупованнями водневих зв'язків ($-OH$, $-COOH$), поверхневим аніонним зарядом, високою молекулярною масою, гнучкими ланцюгами та поверхнево-активними властивостями. Взаємодія між негативно зарядженої слизової поверхнею і позитивно зарядженими полімерами може полегшити процес біоадгезії.

Властивості ідеального мукоадгезивного полімеру та продуктів його розпаду [29, 30, 31]:

- не є токсичними, гіпоалергенними, з відсутнім подразнюючим впливом, і не всмоктуються в гастроентеральний тракт [29, 30];
- володіє високою в'язкістю, належним ступенем полімерного зв'язування і просторової конформації полімеру. Середній розмір пор, середня молекулярна вага полімерів і щільність структури є трьома важливими і взаємопов'язаними структурними параметрами полімерної сітки. Тому зі збільшенням щільності полімерної структури дифузія води в полімерну мережу відбувається з меншою швидкістю, що в свою чергу викликає недостатній набряк полімеру і зниження ступеня взаємопроникнення полімеру і слизу [29, 30, 31];
- володіє специфічним сайтом на поверхні і швидко прикріпляється до більшості тканин [29, 30];
- не повинен руйнуватися протягом терміну придатності дозованої форми [29, 30];
- сильні Н-з'єднувальні групи (-ОН, -СООН) повинні бути присутніми в полімері для взаємодії з слизовою мембраною. Бажані полімери повинні мати функціональні групи, здатні формувати водневі зв'язку, і гнучкість полімеру важлива для поліпшення цього потенціалу зв'язування водню. Такі полімери, як полівініловий спирт, гідроксильований метакрилат та поліметакрилова кислота, а також всі їх сополімери мають гарну сполучною воднем здатністю [29, 31];
- має сильні аніонні заряди і велику молекулярну вагу. Деякі узагальнення про заряд мукоадгезивних полімерів були зроблені раніше, коли неіонні полімери, як видається, піддаються меншому ступені адгезії в порівнянні з аніонними полімерами. Сильнодіючий аніонний заряд на полімері є однією з необхідних характеристик для мукоадгезії. Деякі катіонні полімери також демонструють чудові властивості слизової оболонки, особливо в нейтральному або злегка лужному середовищі. Крім того, деякі катіонні високомолекулярні полімери, такі як хітозан, продемонстрували хороші адгезивні властивості. Проте відсутні літературні данні про вплив заряду мембрани на мукоадгезію, але рН мембрани впливає на мукоадгезію, оскільки він може впливати на іонізовані або неіонізовані форми полімерів. Мукоадгезивна сила полімеру зростає при молекулярній вазі понад 100 000

Да. Існує пряма кореляція між міцністю зв'язування поліоксіетиленових полімерів з слизом і їх молекулярною вагою від 200 000 до 7 000 000 Да [29, 30, 31];

- досить гнучкий, щоб проникати через слизову оболонку або в міжтканинні області і забезпечувати досягнення бажаного зв'язування полімерних ланцюгів з слизом. Для підвищення структурної гнучкості полімеру можливим є включення в його структуру поліетиленгліколю. В цілому мобільність і гнучкість полімерів можуть бути пов'язані з їх в'язкістю і коефіцієнтами дифузії, оскільки більш висока гнучкість полімеру призводить до більшої дифузії в слизову мережу [29, 30, 31];

- має здатністю до критичного ступеню гідратації мукоадгезивного полімеру. Це є важливим при оптимальному набряканні і мукоадгезії. Гідратація необхідна для розширення і створення макромолекулярних структур достатнього розміру, а також для індукування рухливості полімерних ланцюгів, щоб посилити процес взаємопроникнення полімеру і слизу. Розбухання полімерів дозволяє механічно заплутувати, піддаючи ділянки структури полімеру впливові водневих з'єднань та електростатичної взаємодії між полімером і слизовою оболонкою [30, 31];

Мукоадгезивні полімери можна розділити на дві групи за їхніми основними властивостями [17, 31]:

Гідрофільні полімери – містять карбоксильну групу, та проявляють гарні мукоадгезивні властивості: ПВП (піровінілпіролідон), МЦ (метилцелюлоза), На-КМЦ (натрій карбоксиметилцелюлоза), ГПЦ (гідроксилпропілцелюлоза).

Гідрогелі, при взаємодії з водою вони набухають і прикріплюються до слизової оболонки: аніонні полімери – карбопол, поліактилати; катіонні полімери - хітозан, неіонні полімери – поліметакрилова кислота, желатин, альбумін, альгінат, декстран [17].

Проблемою застосування неіонних полімерів є те, що вони виступають лише допоміжними носіями та стабілізуючими агентами, проте самостійно не можуть проявляти мукоадгезивні властивості, для чого їх модифікують та використовують в з'єднаннях з аніонними та катіонними полімерами [17].

Виходячи з вищесказаного з поміж усіх мукоадгезивних полімерів виділяється хітозан і його похідні. Це єдиний полімер, що може самостійно здійснювати мукоадгезію при його природньому походженні.

Хітозан має групи – OH та $-NH_2$, що підводить до його здатності утворювати водень та ковалентний зв'язок. Ця характеристика призводить до можливостей різних хімічних дериватизацій хітозану. Ці функціональні групи також відіграють важливу роль у характеристиці розчинності макромолекул хітозану. При низькому рН аміногрупи проходять протонування, що робить макромолекули хітозану позитивно зарядженими. Ця катіонна природа забезпечує сильну електростатичну взаємодію з негативно зарядженими компонентами слизу, включаючи сіалову кислоту, а також епітеліальні поверхні [32]. Водневий зв'язок та гідрофобна взаємодія також відіграють важливу роль у мукоадгезії хітозану [33].

Дериватизація хітозану для поліпшення його мукоадгезивних властивостей розглядаються у багатьох публікаціях [34, 35, 36, 37]. Деякі хітозани та його похідні показали потенціал у доклінічних та клінічних дослідженнях щодо застосування в трансмукозних лікарських засобах (наприклад, ChiSys® як платформа для назальної вакцинації [38] та очних крапель Lactimera® [39]).

1.2. Аналіз відомих методів отримання мікробіологічного хітозану

1.2.1. Отримання хітозану за допомогою мікробіологічного синтезу хітиндеацетилази та позаклітинного деацетилювання хітину

Як відомо, хітозан це деацетильована похідна хітину, який зустрічається в природі як упорядковані макрофібрили з яких побудовані екзоскелети ракоподібних, крабів і креветок, а також клітинні стінки грибів та дріжджів. [40, 41]. Залежно від орієнтації мікрофібрил хітин зустрічається у вигляді трьох форм, а саме α -, β -, та γ -форма, які можуть бути охарактеризовані за допомогою методів інфрачервоної та твердотільної ЯМР-спектроскопії разом з рентгенівською дифракцією [42].

Хітин розчиняється у водному кислому середовищі, коли ступінь деацетилювання досягає близько 50% (в залежності від походження полімеру), і саме така форма називається хітозаном. Він є єдиним псевдоприроднім катіонним полімером і, отже, знаходить безліч застосувань, що використовують його унікальні властивості, такі як відновлення і очистка білка. Будучи розчинним у водних

розчинах, хітозан може бути використаний в різних застосуваннях в якості розчинів, гелів, плівок і волокон. У твердому стані хітозан має напівкристалічних природу і поліморфологію [43].

Щодо виробництва хітозану, то незважаючи на те, що його можна добути з грибкових джерел, повідомляється [44], що поки що метод що комерційно не застосовується, оскільки забезпечує занадто низький урожай при занадто високій вартості. Тому зазначається, що хітозан все ще отримують обробкою морського похідного хітину термолужною речовиною - недорогий метод, що призводить до високих урожаїв, але екологічно небезпечний і важкий для контролю, отримуючи неоднорідний асортимент продуктів залежно від ступеня деацетилювання [45, 46]. Проте, ферментативне виробництво хітозану з використанням мікробної хітиндеацетилази (ХДА), яка може гідролізувати ацетамідогрупу в хітинових полімерах для отримання хітозанів, є екологічно чистим процесом, який легко контролювати і призводить до високого виходу однорідних кінцевих продуктів [47, 48].

Окрім того, в іншому дослідженні [49], порівнювали хітин та хітозан одержаний з відходів виробництва креветок мікробіологічним та хімічним методами. Було встановлено, що в результаті молочнокислого бродіння був досягнутий високий рівень депротейнізації та демінералізації, які склали 92% та 94% відповідно після 96 годин. Для порівняння, був отриманий хітин хімічним методом, який мав меншу молекулярну масу та рівень кристалічності. В свою чергу хітозан отриманий з біологічного хітину мав середню для хітозану вагу в 400 кДА і мав більшу ступінь деацетилювання, ніж хітозан після хімічного деацетилювання. Метод виробництва такого хітозану має більшу можливість уникати понаднормової деполімеризації та втрат кристалічності, що є великою перевагою для використання в медицині та фармації.

Крім того, повідомляється [50], що ХДА були ідентифіковані у морських та ґрунтових бактерій, кількох грибів, кількох комах та вірусі. Грибкові ХДА існують здебільшого як *N*-глікозильовані (20–70%) глікопротеїни, тоді як бактеріальні ХДА - це в основному хітинолігосахариддеацетилази, які специфічно активні по відношенню до низькомолекулярних хітинолігосахаридів [51]. Однак деякі

бактеріальні ХДА також виявляють широку субстратну специфічність [52]. Відомо, що є невелика кількість бактеріальних штамів-продуцентів ХДА, і для цього необхідні спеціальні умови ферментації, які будуть розглянуті в п. 1.3.1 даного літературного огляду [53]. Оскільки виробництво ХДА ще не було промислово розвинене, ідентифікація бактеріального ХДА з високою активністю щодо полімерного хітину та хітозанів забезпечить прямий підхід до ферментативного перетворення хітину в хітозан.

N-деацетилювання хітину може здійснюватися шляхом гетерогенних або однорідних реакційних сумішей [54]. Розрізнення хітину та хітозану з різним ступенем деацетилювання не є суворим [55, 56]. Природно хітин має можливість пов'язуватися з іншими структурними полімерами, такими як білки або глюкани, які часто спричиняють більш ніж 50% від маси в хітині [57]. Хітин може бути *N*-деацетилюваний до такої міри, що він стає розчинним у розбавленій оцтовій та мурашиній кислотах. У хітині переважають ацетилювані одиниці, і ступінь ацетилювання зазвичай становить 0,90, тоді як хітозан є повністю або частково *N*-деацетилюваним похідним із типовим ступенем деацетилювання більше 0,65.

Здатність до синтезу ХДА різними продуцентами за останнє десятиріччя досліджується широким колом вчених. Зокрема, Кауг зі співавторів [58] провели дослідження в якому ізолювали 20 штамів бактерій з проб землі, відібраної на пляжах Індії. Метою експерименту було дослідження активності ферменту хітиндеацетилази в отриманих ізолятах та отримання кількісного визначення отриманого при ферментації хітозану. З двадцяти ізолюваних бактерій, дві (*Bacillus sp.* та *Serratia sp.*) проявили наявність хітиндеацетилази (ХДА) і були надалі ферментовані у середовищі, що містить хітин. За результатами якісного визначення було підтверджено отримання хітозану.

В свою чергу, іншою групою дослідників [59] на чолі з Pacheco N. було досліджено виділення деацетилятів хітину під час глибинної ферментації фітопатогенного грибу *Colletotrichum gloeosporioides*. Під час ферментації проводився контроль виробництва хітиндеацетилази протягом 120 годин, проте найвища позаклітинна активність спостерігалася на 96 годину культивування, з подальшим виходом на плато. Для випробування деацетилюючих здібностей ензиму,

був використаний деацетилований комерційний хітозан, зі ступенем деацетилювання 52%. У результаті наступного деацетилювання виділеним ензимом, було досягнуто 25% деацетилювання хітинового субстрату, з отриманням хітину з 80% ступенем деацетилювання, молекулярною вагою $10^2 \times 10^3$ г моль⁻¹ та індексом кристалічності 60%.

Під керівництвом Stevens W. F. [60] було проведено дослідження в якому хітиндеацетилаза *Rhizopus oryzae* була використана для позаклітинного деацетилювання звичайного, повторно осадженого та частково деацетилюваного хітину що додавалися в середовища для культивування. Найбільшу активність під час глибинного культивування продуценту спостерігалась для частково деацетилюваного хітозану, а для твердого середовища, з повторно осадженим хітином фермент виявив майже в 10 разів більшу активність порівняно з рідким середовищем. Авторами повідомляється, що отриманий ферментативно деацетилюваний хітин (хітозан) виявив схожу з природнім хітином здатність утворювати міцні зв'язки з білками, при цьому зберігши високу толерантність до сильного кислотного рН, притаманну хітину, тоді, як частково деацетилюваний хітин почав набрякати при слабкому кислотному рН.

Серед досліджень є повідомлення і про мутантні штамі здатних до надсинтезу хітиндеацетилазу варто відзначити *Penicillium oxalicum* ІТСС 6965 [61]. Даний штам був виділений та ізолюваний з відходів морепродуктів після чого був підданий мутагенезу шляхом використання броміду етидію в поєднанні з мікрохвильовим випромінюванням. В результаті культивування цього штаму було одержано покращений вихід ферменту по активності, а саме $210,71 \pm 1,65$ од/мл, порівняно із штамом дикого типу - $108,26 \pm 1,98$ од/мл). Максимальне виробництво ферментів було досягнуто глибинним типом культивування при 30°C та рН 6,0 і 8,0 протягом 144 годин. Відмічається помітно поліпшена продуктивність порівняно із штамом дикого типу - $1,46 \pm 0,82$ од/мл·год проти $0,75 \pm 0,53$ од/мл·год відповідно.

Іншими підходом, що застосували Sun Y. з командою вчених [62] була статистична оптимізація виробництва ХДА штамом *Rhodococcus erythropolis* HG05. Багатофакторна оптимізація полягала в знаходженні вмісту компонентів, значень параметрів культивування таких як температура, активна кислотність та об'єм

доданого інокуляту. Для цього було використано методи Плакета-Бірмана та центрального композиційного плану. В результаті була підібрана комбінація оптимальних значень вмісту глюкози – 7,00 г/л, NaCl – 0,70 г/л, MgSO₄ – 4,13 г/л, та концентрація інокуляту - 2%, що дозволили підвищити синтетичну активність штаму до значення 244,45 од/мл.

В свою чергу внаслідок додавання у культуральне середовище абсцисової кислоти для одержання ХДА з культури *Colletotrichum gloeosporioides* було підвищено активність ферменту в 9,5 разів порівняно з контролем - 1,05 од/мг білка проти 0,11 од/мг білка [63].

Нещодавно, Ма Q. разом з групою вчених [64] досліджували новий штам *Rhodococcus equi* F6 як перспективного продуцента ХДА і встановили що даний штам синтезує ХДА з активністю 87,2 од/мл протягом перших 5 годин культивування, а потім з максимальною активністю – 157,6 од/мл через 12 годин.

1.2.2. Синтез хітозану у стінках хітозан-продукуючих мікроорганізмів

Як було сказано в попередніх пунктах, хітозан в більшості випадків отримують в результаті переробки морепродуктів. Однак він має неоднорідні і непослідовні фізико-хімічні властивості, оскільки його накопичення в залишках морепродуктів схильне до сезонних коливань. Відповідно в цьому розрізі є конкурентною альтернатива - вирощування дріжджів і грибів, які містять хітин і хітозан в клітинній стінці, таких як наприклад, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Mucor rouxii*, *Phycomyces blakesleeanus*, *Coprinus cinereus*, *Neurospora crassa*, *Trichoderma reesei*, *Rhizopus spp.*, *Absidia spp.*, *Mucor spp.*, *Mortierella isabelina* і *Lentinus edodes*. Саме ці види зараз знаходяться в стадії вивчення на предмет виробництва хітозану. Ці мікроорганізми можуть бути легко вирощені на простих поживних середовищах і використані в якості альтернативного джерела хітозану. Крім того, хітозан, отриманий з них демонструє велику однорідність в молекулярній вазі, ступені деацетилювання та відсутність потенційно небезпечних для життя анафілактичних шоківих алергенів [43].

Для повного синтезу хітозану використовується схожа концепція що і описана в п.1.2.1. проте необхідною вимогою до продуцентів є не тільки здатність до синтезу ферменту ХДА а і здатність до внутрішньоклітинного синтезу хітину.

Біосинтез хітину і каталізування широко збереженим у природі ферментом, який називається хітинсинтаза (ХС). Цей фермент існує в кожному організмі, що синтезує хітин. Хітинсинтаза залишається пов'язаною зі зростаючим полімерним ланцюгом через багато етапів полімеризації, що послідовно додає одиниці N-ацетилглюкозаміну до нередукуючого кінця ланцюга. Лінійні полімери хітину, які спочатку отримують, потім мимовільно збираються в мікрофібрили різного діаметру та довжини. Після синтезу полімеру він транспортується у позаклітинний простір де піддається гідролітичному розщепленню [42], або включенню хітину або його діацильованої похідної - хітозану в зовнішні надмакромолекулярні структури, такі як кутикули членистоногих та клітинні стінки грибів.

Весь процес охоплює кілька окремих етапів і зображений на рис.1.2 [60, 65]:

1. Послідовна біотрансформація цукрів (переважно трегалози або глюкози). Цей етап включає біохімічні реакції, такі як фосфорилування, амінування, а також утворення ферментного субстрату, УДФ-N-ацетилглюкозаміну.
2. ХС синтезує фібрилярні ланцюги.
3. Орієнтація молекул хітину, які мають довгі ланцюги.
4. Транслокація полімеру через плазматичну мембрану
5. Часткове деацетилування хітину до хітозану ХДА
6. Кристалізація та утворення мікрофібрил за допомогою міжланцюгового водневого зв'язку.
7. Асоціація з білковими кутикулярними білками членистоногих або з іншими вуглеводами в клітинних стінках гриба.

Серед досліджених продуцентів, до повноцінного біосинтезу хітозану здатні штами *Mucor rouxii* MTCC 386, *M. rouxii* RCMB 015002, *M. circinelloides Rhizopus japonicus* M193, *R. oryzae* PAS 17, *R. oryzae* ME-F12, *R. oryzae* MTCC 262, *Cunninghamella elegans* UCP / WFCC 0542, *C. elegans* RCMB 012002, *Absidia butleri* NCIM 977, *A. repens* CBS 102.32, *Aspergillus niger* BBRC 20004. Наведені штами будуть зустрічатися в ході огляду.

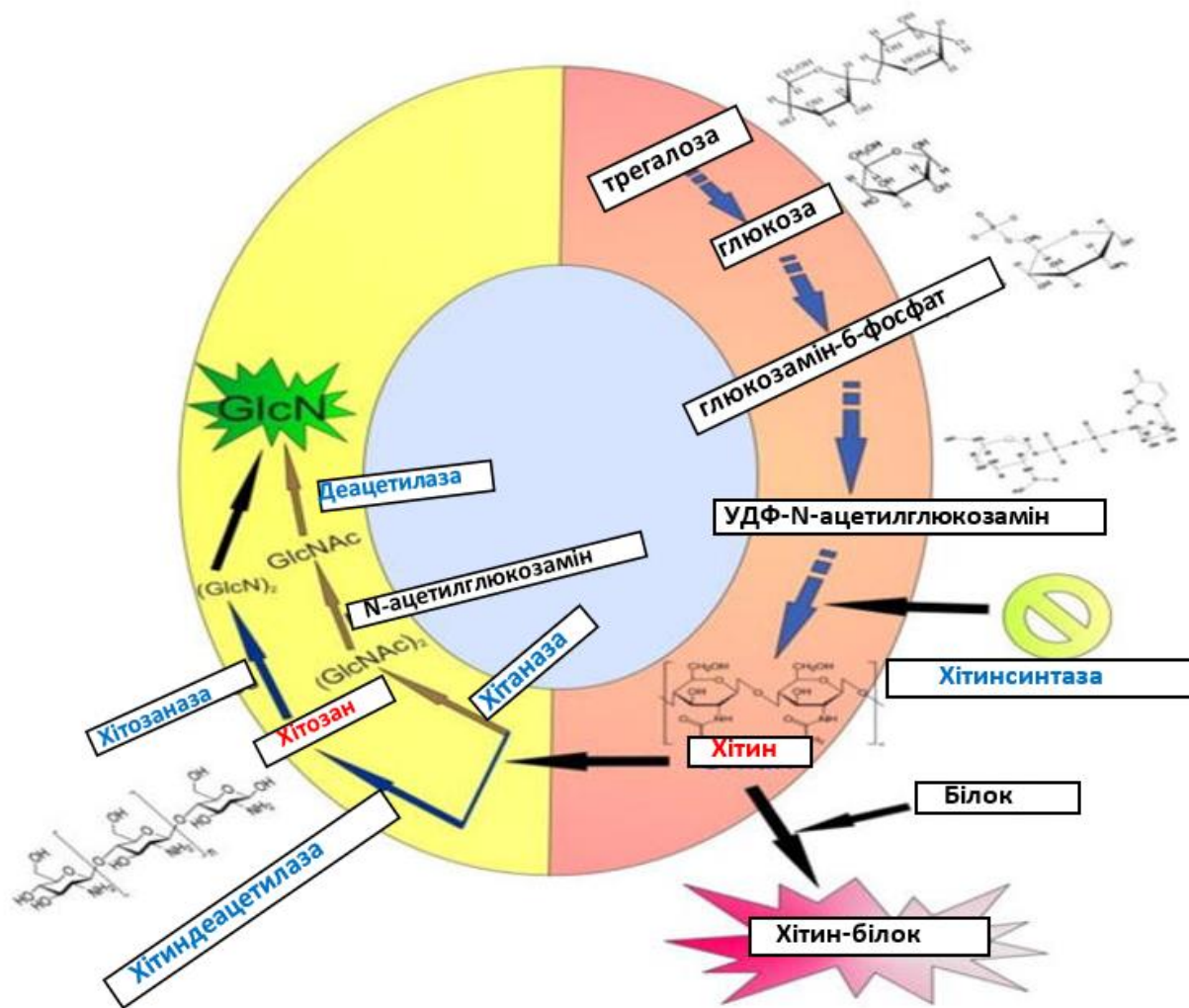


Рис.1.2. Схема біосинтез та деградація хітину і хітозану продукуючими клітинами. Адаптовано з джерела [42].

Окрім одностадійного типу перетворення субстрату в хітозан повідомляється і про трьохстадійну ферментацію хітозану, що була здійснена вченими [66] з порошку панцирів креветок, використовуючи *Serratia marcescens* B742, *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 та *Rhizopus japonicus* M193. Було проведено оптимізацію процесу малого масштабу за допомогою експериментального дизайну Тагучі. Для екстракції хітину з порошку панцирів креветок була застосована двохстадійна ферментація, використовуючи *S. marcescens* B742 та *L. plantarum* ATCC 8014. Було отримано вихід хітину – 18.9%, фінальний відсоток депротейнізації та демінералізації при визначених оптимальних умовах культивування, 94.5% та 93.0% відповідно. Перетворення хітину в хітозан відбувалося за допомогою ферментації з *R. japonicus* M193, за дизайном Плакетта-Бермана, параметрами для оптимізації були визначені: вміст хітину, вміст глюкози, об'єм посівного матеріалу, вміст $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ та тривалість культивування.

Застосувавши дизайн Тагучі, були отримані такі умови: 2.5% хітин, 5 г/л глюкози, 5% посівного матеріалу, 0,6 г/л $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 5-денне культивування. Відповідно за такого культивування рівень деацетилювання і молекулярна маса отриманого хітозану були 78.85 % і 125.63 кДа. При масштабуванні технології, ефективність депротейнізації використовуючи *S. marcescens* В742 росла зі збільшенням часу ферментації, проте досягала стану рівноваги на 4 день 83.56%, ефективність демінералізації досягла 47.51% та 49.32% на 1 та 2 дня, відповідно. Ефективність депротейнізації для *L. plantarum* АТСС 8014 була 83.56% та 92.31%, демінералізації – 93.52% та 95.38%, на 1 та 2 дня відповідно. Вихід хітину та хітозану по закінченню трьох стадій ферментації досяг 21.35 та 13.11%, коефіцієнт екстракції, 74.67 та 63.42%. Рівень деацетилювання та молекулярна маса отриманого хітозану, 81.23% та 512.06 кДа, рівень кристалічності, 82.67 та 27.15% для хітину та хітозану.

1.3. Біотехнологічні аспекти одержання хітозану

1.3.1. Особливості культивування продуцентів хітозану

Серед досліджень присвячених особливостям культивування продуцентів хітозану за останнє десятиріччя можна помітити що найбільшу нішу досі займають природні види грибів відділів *Zygomycota* та *Ascomycota*. Зокрема, першими часто зустріченими продуцентами є штами роду *Mucor*. Так Chatterjee S. зі співавторами [67] дослідили отримання хітозану, отриманого під час ферментації *M. rouxii* (МТСС 386) в трьох різних середовищах: м'ясно-сольове середовище (МС), глюкозо-пептон-дріжджевому середовищі (ГПД), глюкозо-картопляному бульйоні (ГКБ). Посівний матеріал був підготований на картопляно-глюкозному агарі (ГКА) при температурі 30°C протягом 3-х діб. Ферментація проводилась в вищезгаданих середовищах за однакових умов: об'єм посівного матеріалу – $\sim 6.4 \times 10^6$ спор/диск, температура – 30°C, в зануреному стані 120 об/хв на різні проміжки часу. Після того як хітозан був виділений, для нього був проведений контроль рівня деацетилювання, середньої молекулярної маси та інших фізичних характеристик. По результатам дослідження, найбільший вихід біомаси спостерігався при використанні середовища ГПД, де було отримано на 18% більше біомаси ніж інші середовища, проте необхідний для цього час культивування був майже вдвічі довше ніж у МС. Відсоток хітозану в сухій біомасі різнився від 6.0 до 7.7%, залежно від поживного середовища. Хітозан з

найвищим рівнем деацетилювання був отриманий при використанні середовища ГКБ (89.8%), для ГПД цей показник дорівнював 82.2%. Хітозан отриманий з МС був менш полідисперсний, ніж отриманий з ГКБ та ГПД, що вказує на високу якість отриманого полімеру. При перевірці молекулярної маси хітозанів, найменшим виявився хітозан отриманий з МС.

Інша дослідна група під керівництвом Chatterjee S. [68] дослідили вплив гормонів росту рослин на отримання хітозану з *M. rouxii* МТСС 386, були використані гормони: гіберелінова кислота (ГК), індол-3-оцтова кислота (ІОК), індол-3-масляна кислота (ІМК) та кінетин (К). Додавання до середовища 1 мл/л ІОК збільшило ріст міцелію та вихід хітозану на 14,7% та 36,4% відповідно, подальше збільшення концентрації негативно позначилося на цих параметрах. Використання 3 мг/л індол-3-масляна кислоти збільшило вихід хітозану на 34%. При такій самій концентрації гіберелінової кислоти (3 мг/л), вихід хітозану збільшувався на 69%. При оптимальній концентрації кінетину - 10мг/л, спостерігалось збільшення виходу хітозану на 42%. Рівень деацетилювання отриманого хітозану знаходився в приблизному діапазоні від 12,4 до 13,1%. Найменша середня молекулярна маса спостерігалась в контрольному випадку, найбільша – при використанні гіберелінової кислоти.

Для іншого виду – *M. Circinelloides*, були проведені дослідження по оптимізації синтезу хітозану Campos-Takaki з групою співавторів [69] використовуючи мексиканську ріпу як субстрат. Для цього кожні 24 год проводився контроль виходу біомаси, хітозану та хітину. Виробництво біомаси зростало протягом значення в 24 та 48 годин, та досягло свого піку на позначці в 72 години (20,7 г/л сухої речовини). Вміст хітозану досяг своєї константи на позначці 24 год, і до кінця процесу залишався на 64 мг/г. рН середовища знижувався з довжиною процесу, досягши рН 4,2 в кінці процесу (початковий рН 7), що відобразило собою звичайну поведінку для хітозан-продукуючих штамів. Ступінь деацетилювання отриманого хітозану отриманого з *M. circinelloides* вирощеного на середовищі з мексиканської ріпи дорівнював 83%, що відповідає результатам отриманими іншими авторами при перевірці грибного хітозану(80-90%). Молекулярна маса отриманого хітозану становила $2,70 \times 10^4$ г/моль, що узгоджується з результатами отриманими іншими дослідженнями($1,0 \times 10^4$ до $9,0 \times 10^5$ г/моль).

Gharieb M. M. зі співавторами [70] провели дослідження щодо одержання хітозану та оптимізації параметрів ферментування для декількох видів зигомікоти: *M. rouxii* RCMB 015002 та *Cunninghamella elegans* RCMB 012002 та для виділеного з запліснявілого хліба *Rhizopus sp.* Вченими було проведено дослідження впливу вибору поживного середовища, джерела вуглецю, джерела азоту та фізичних параметрів на виробництво хітозану. Для контролю впливу середовища, кожний з тестованих штамів грибів був внесений у досліджувані середовища та інкубований при однакових умовах – рН 5, температура $28\pm 2^\circ\text{C}$ і 125 об/хв на 7 днів з найкращими результатами на ГПД середовищі з виходом: 35 мг/50 мл, 29 мг/50 мл та 13 мг/50 мл для *Cunninghamella*, *Mucor* та *Rhizopus* відповідно. При визначенні ефективності вибору джерела вуглецю (рН 5, $28\pm 2^\circ\text{C}$, 7 днів, агар Чапека), найкращий результат спостерігався у випадках з глюкозою: 20мг/50мл, 10мг/мл та 7мг/мл. Для контролю впливу джерела азоту найкращим для *Cunninghamella* та *Mucor* виявився NaNO_3 з виходом 23 мг/50 мл та 10мг/50 мл, для *Rhizopus* найкращі результати виявила сечовина, 13 мг/50 мл. Спостерігалось збільшення виходу хітозану при збільшенні температури з 20°C до 30°C та подальше падіння при збільшенні до 35°C . Для піку при 30°C були отримані найкращі результати: 17 мг/50 мл, 5,6 мг/50 мл та 6,5 мг/50 мл для *Cunninghamella*, *Mucor* та *Rhizopus*. Початкові 5 рН виявилися найкращими для штамів *Cunninghamella* та *Mucor*, з виходом 30 мг/50 мл для *Cunninghamella* та 6,8мг/мл для *Mucor*. Найкращим результатом для *Rhizopus* був 4,5 рН з виходом 10мг/50мл.

Завдячуючи високому вмісту хітозану в клітинній стінці роду *Rhizopus*, види що представляють його також дуже часто використовуються для дослідження вченими.

В свою чергу Zhao Y. та його колеги [71] провели оптимізацію умов ферментації *Rhizopus japonicus* M193, для покращення виробництва хітиндеацетилази та хітозану. Метою дослідження була біоконверсія хітину та отримання хітозану з бажаною функціональністю, вплив поживного середовища та умов культивування на отримання ХДА з *Rhizopus japonicus* M193. Розглядалися такі параметри, як: вміст глюкози, об'єм посівного матеріалу, вміст $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ і тривалість ферментації. За дизайном Тагучі, оптимальними умовами були визначені, середовище ГКБ, з 2,5%-м вмістом хітину, 5 г/л глюкози, 5%-м об'ємом посіву, 0,6 г/л $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ і 5 днями ферментації. Оптимізовані умови ферментації привели до максимального виходу

ХДА 547,38 од/л, це в результаті гарантувало отримання хітозану з найбільшим ступенем діацетиляції 79% та найменшою молекулярною масою 126 кДа.

Під керівництвом Chatterjee S. [72] провели визначення кількості та якості отриманого при культивуванні *Rhizopus oryzae* (MTCC 262) хітозану, використовуючи побічні продукти переробки: сироватку та мелясу, як джерела поживних речовин. У ході експерименту було використано 3 середовища: сироватково-сольове середовище (СС), м'ясно-сольове середовище (МС) і глюкозо-картопляний бульйон (ГКБ). Найбільший вихід біомаси спостерігався при використанні ГКБ (6,5 г/л), на другому місці знаходилося середовище СС (6,2 г/л), найменший вихід у МС (3,4 г/л), відсоток вмісту хітозану в біомасі був 9,6%, 10,0% та 11,5% відповідно. Рівень деацетилювання хітозану в кожному випадку спостерігався більше ніж 80%, середня молекулярна маса отриманих хітозанів знаходилась в діапазоні 100-300 кДа, що в кілька разів менше молекулярної ваги хітозану отриманого з панцирів креветок (≥ 1000 кДа). Найменша молекулярна маса спостерігалась у хітозану отриманого з середовища WSM, найбільша, з PDB.

Tasar O. S. зі співавторами [73] дослідили отримання хітозану з психотолерантного *Rhizopus oryzae* PAS 17, в умовах нестерильної ферментації. Метою дослідження було використання низької температури ферментації та рН для попередження та лімітації небажаного мікробіологічного росту, при збереженні ефективності отримання хітозану, по результатам тестування найкращим кандидатом був визначений психотолерантний *R. oryzae* PAS17, в якому найбільший об'єм росту міцелію спостерігався при 15°C, та починав зменшуватись при збільшенні вище 20°C. Було досліджено, що зменшення рН до 4,5 не проявило збільшення в мікробній контамінації, тому подальше дослідження проводилось для 15°C та рН 4,5. Оптимізуючи процес за допомогою дизайну Тагучі, найкращий отриманий вихід біомаси та хітозану відповідав 10,67 г/л та 1,50 г/л, з подальшою оптимізацією та врахуванням допустимих відхилень, було отримано 11,07 г/л та 1,59 г/л, біомаси та хітозану відповідно. Найбільший вплив на процес виявив вміст меляси, найбільший вихід хітозану для якого спостерігався при концентрації 70 мл/л. Інші фактори, швидкість перемішування та тривалість культивування, досягли максимального виходу при 150 об/хв та 8 днях відповідно.

Tai C. зі співавторами [74] дослідили потенціал використання гідролізату геміцелюлози (ГГ) у виробництві хітозану за допомогою *Rhizopus oryzae* ME-F12. Дослідження були проведені з використанням трьох середовищ, глюкозне, ксилозне та середовище з ГГ. Порівняно з глюкозним середовищем, ксилоза посилила ріст міцелію на 12%, а вміст хітозану на 37%, для середовища з ГГ ці показники були 10% та 64%, при порівнянні з ксилозою. Крім того, під час гідролізу кукурудзяної соломи сірчаною кислотою, утворювалися глюкоза, арабіноза, маноза та галактоза, у результаті дослідження їх впливу: арабіноза та маноза, пригнічували ріст міцелію і продукцію хітозану, галактоза дещо посилювала ці показники. Додавання глюкози підвищило синтез хітозану на 21%. Наявність всіх чотирьох в середовищі підвищувало ріст міцелію на 6%, проте не мало значного впливу на отримання хітозану. Іншими продуктами гідролізу, були мурашина кислота, оцтова кислота та фурфурол. Використання фурфуролу визначило підвищення біомаси на 37% більше ніж у контрольному зразку, для оцтової кислоти цей показник був 24%, також штам добре ріс у присутності мурашиної кислоти. Проте, при використанні кислот у концентраціях, в яких вони утворюються при гідролізі, приріст біомаси не тільки був менше, а ще і спостерігалось його інгібування. Вміст хітозану також стимулювався додаванням цих хімічних речовин, так у випадку з фурфуролом та оцтовою кислотою, було отримано вдвічі більше хітозану ніж з контрольного зразку. При додаванні всіх трьох речовин у фактичних кількостях до середовища, було відмічено стимулювання приросту біомаси та вмісту хітозану (на 64% більше ніж в ксилозі). Рівень деацетилювання в жодному випадку сильно не відрізнявся, що призвело до рішення, що наявність вмісту ГГ ніяк на нього не впливає.

Chatterjee S. зі співавторами [75] дослідили вплив гормонів росту рослин, гіберелінової кислоти (ГК), індол-3-оцтової кислоти (ІОК), індол-3-масляної кислоти (ІМК) та кінетину (К) на отримання хітозану з *Rhizopus oryzae* (MTCC 262). Всі використані в ході експерименту гормони виявили позитивний вплив на ріст міцелію та вміст хітозану в їх оптимальній концентрації. Додавання до середовища гіберелінової кислоти збільшило ріст міцелію та вміст хітозану на 32 та 14,3% відповідно. Наявність у вмісті середовища 3 мг/л ІОК збільшило ріст міцелію та вміст

хітозану на 28,2 та 5,04%, для ІМК такої же концентрації, ці показники були 19,2 та 1,68%. При концентрації 2 мг/л К, спостерігалось 22,2 та 3,36% покращення виходу.

У дослідженні Cardoso A. [76] було досліджено потенціал *Rhizopus arrhizus* UCP 402 для отримання хітозану. Зокрема, було встановлено одержання найвищої кількості міцеліальної маси (20,61 г/л) у культуральних середовищах що містили концентрований кукурудзяний екстракт – 8 %, мед – 6 %, протягом 96 годин бродіння. Відмічається до кінця цього періоду споживання загальної редукуючих цукрів, присутніх в культуральному середовищі, становило близько 80%. Одночасно спостерігалось збільшення рівню рН ферментаційного середовища з 5,6 до 6,1. При оптимізації синтезу хітозану було досягнуто значень його концентрації 29,3 мг / г біомаси, в культуральних середовищах, що включають концентрований кукурудзяний екстракт - 6% та мед - 13,24%.

Також серед продуцентів активно досліджуються умови одержання хітину родами *Cunninghamella*, *Penicillium*, *Absidia* та *Aspergillus*.

Namboodiri M. T. зі співавторами [77] дослідили використання екологічно чистого методу отримання хітозану з біомаси *C. elegans* та *P. citrinum* ІТГ_КР1. Метою дослідження було порівняння здатності отримувати хітозан за допомогою культивування новітнім ізолятом *P. citrinum*, використовуючи стічні води паперового (ПВ) та м'ясомолочного (МВ) виробництва як субстрат, результати були порівнянні з попередньо відомою з літератури *C. elegans*. В першому експерименті стічні води були об'єднанні МС середовищем в різних пропорціях. В другому до стічних вод ПВ був доданий кислотний гідролізат, оцтова кислота, в концентраціях 20–150 мг/л, для визначення його впливу на вихід хітозану. Для іншого експерименту був використаний 3-літровий біореактор, ферментація в якому відбулася з стічною водою ПВ, 28°C, 200 об/хв, 2 об'єми повітря/об'єм культуральної рідини/хвилину, рН 4,5, був доданий посівний матеріал в об'ємі 2×10^6 спор/мл. Найвищий вихід хітозану в першому експерименті спостерігався для стічних вод ПВ з додаванням МС в співвідношенні 9:1, з виходом 108 мг/л для *P. citrinum*. Найкращий результат при додаванні оцтової кислоти спостерігався для концентрації 50 мг/л, було отримано найбільший вихід біомаси (983 мг/л) та хітозану (133 мг/л). За використання біореактору був досягнутий найбільший вихід хітозану (141 мг/л), який відповідав

48–60 г проміжку часу ферментації. Рівень деацетилювання хітозану отриманого з *P. citrinum* відповідав 77%, при додаванні до води ПВ, цей рівень збільшився до 81%, тоді як для комерційного хітозану він відповідав 71%.

Dos Santos E. R. з співавторами [78] провели оцінку впливу надлишку амінокислот, аспарагіну та кукурудзяного екстракту на отримання біомаси та вміст в ній хітозану з *C. elegans* UCP / WFCC 0542. Була проведена оптимізація процесу, при якій було виявлено оптимальну концентрацію аспарагіну (0,025%), сахарози (0,15%) та кукурудзяного екстракту (0,45%), які дали вихід 16,95 г/л біомаси та 2,14 г/л хітозану по сплину 96 год ферментації. Індекс кристалічності отриманого хітозану становив 60,92%, ступінь деацетилювання – 75,25%.

Під керівництвом Vaingankar P. N. [79] було проведено оптимізацію поживного середовища для отримання хітозану з грибів зигомикотів. Після проведеного скринінгу різних штамів грибів, найбільший вихід хітозану був відзначений для *A. butleri* NCIM 977, що послужило причиною його вибору як біологічного агенту в даному дослідженні. Вченими був застосований метод оптимізації зміною одного фактору за раз. Факторами з найбільшим впливом на вихід хітозану були визнані, початковий рН, температура, вміст вуглецю та азоту. За результатом оптимізації були застосовані такі параметри, як: 72 год час ферментації, початковий рН 5,5, температура 30°C, глюкоза як джерело вуглецю та триптон та екстракт дріжджів як джерело азоту. Оптимальними концентраціями для глюкози, триптону та екстракту дріжджів були визначені 1,58%, 1,61% та 1,11% відповідно. У результаті оптимізації вихід хітозану збільшився з 683 мг/л до 1 г/л. Рівень деацетилювання отриманого хітозану дорівнював 79.89%, молекулярна маса – 7.07×10^4 Да.

Davoust N. та Persson A. [80] провели аналіз впливу морфології та часу збору на вихід хітозану з *A. repens* CBS 102.32. Для ферментації був використаний реактор з мішалками, обладнаний рН електродом для утримання рівня рН до значення 6,0 методом автоматичної титрації 2,0 М NaOH в ферментаційний розчин. У ході експерименту був перевірений вплив трьох різних режимів перемішування на морфологічні показники досліджуваних колоній та вихід хітозану з сухої маси. Перевірка відбувалась в режимах сильного перемішування, слабого перемішування, та слабого перемішування зі збільшенням в плинні процесу. Найкращий результат був

виявлений при контролі процесу в першому експерименті, з найшвидшим перемішуванням, де найкращий результат спостерігався на 44 годину культивування. Вихід хітозану для найкращого досліджуваного випадку процесу ферментації *A. repens* CBS 102.32 – 2.8 г/л.

Вчені на чолі з Maghsoodi V. [81] провели дослідження виробництва хітозану глибинною ферментацією з *As. niger* BBRC 20004. Під час ферментації максимальна кількість біомаси була досягнута через 6 днів та зменшувалась надалі. Кількість отриманого хітозану через 12 днів була 0.8455 г/л. Було досліджено залежність збільшення об'єму глюкози в поживному середовищі на вихід хітозану. При використанні середовища, що містило 8% глюкози (початкове значення 2%), вихід хітозану на 12 день ферментації дорівнював 0,9121 г/л, що відповідає майже 8% збільшенню в продуктивності процесу.

В дослідженні Logesh A. [82] відзначається перевагу в утворенні хітозану ізолятом з лишайнику *Roccella montagnei* ідентифікованим як *A. niger*. Окрім даного ізоляту було виділено ще 3 ізоляти які були протестовані – *F oxysporum*, *R. oryzae*, *P. citrinum*. Проте *A. niger* характеризується як найбільш перспективний штам серед зазначених за його найвищою здатністю синтезувати хітозан, а саме – 1,3 г/л за 12 діб. Окрім того, в даному дослідженні було встановлено значний вплив вмісту глюкози в ферментаційному середовищі. Зокрема найвищий вихід хітозану – 1,93 г/л було досягнуто при присутності в складі 10 % глюкози.

Зокрема, підсумовані данні по поживним середовищам і технологічним параметрам було зібрано вченими на чолі з Sebastian J. Зокрема їх наведено в таблиці 1.1 [43]

Таблиця 1.1.

Вплив варіантів умов та параметрів культивування [33]

Ферментаційний параметр	Значення
Температура	25 °С та 30 °С ідеально підходить для грибкових культур хітозанових продуцентів - <i>M. rouxii</i> , <i>M. racemosus</i> , <i>C. elegans</i> , <i>P. oryzae</i>

рН	рН 5,5-6,5 найкраще підходить для виробництва грибного хітозану з використанням штамів грибів <i>M. racemosus</i> , <i>C. elegans</i> і <i>G. butleri</i> .
Інкубаційна фаза	Пізній експоненціальний етап найбільш ефективний для збору міцелію в процесі отримання максимального врожаю хітозану із штамів грибів <i>M. racemosus</i> , <i>C. elegans</i> , <i>G. butleri</i> та <i>C. echinulata</i> .
Азот	Азот, необхідний для виробництва хітозану з грибкових штамів, <i>G. butlerii</i> , <i>A. coerulea</i> , <i>M. rouxii</i> і <i>R. oryzae</i> можуть бути отримані з використанням більш різних N-джерел (наприклад, пептон).
Перемішування	Низька швидкість привела до зменшення росту і виходу хітозану <i>A. coerulea</i>
Розчинений кисень	<i>M. rouxii</i> вимагає продування кисню для росту міцелію
Тип ферментації:	
- твердофазна	Характеризується більш високим виходом хітозану з грибків <i>G. butlerii</i> і <i>P. oryzae</i> , і є ідеальним для хітозану низької молекулярної маси
- рідинна	
- Безперервний тип	Безперервна ферментація привела до акреції міцелію і низького виходу хітозану з <i>A. coerulea</i> і <i>A. glauca</i>

1.3.2. Методи та особливості виділення хітозану з міцелярної маси

Synowiecki J. зі співавторами [83] описали метод виділення хітину та хітозану з міцелію *M. Rouxii*. Після бажаного часу росту міцелій *M. rouxii* відокремлювали, промивали до отримання прозорого фільтрату та ліофілізували. Надалі проводилася депротейнізація 2% розчином NaOH, відділення нерозчинної в лузі фракції центрифугуванням, розчинення хітозану з нерозчинної в лузі фракції оцтовою кислотою та відділення від хітину центрифугуванням. Осад хітину промивали, потім хітозан осаджували за допомогою луку, центрифугували для відділення рідкої фракції та промивали.

Більш детально метод виділення хітину описується в роботах [82] де міцелій грибної культури *A. niger* збирали, додавали 50 мл 1 N розчину NaOH на г (вологої

маси) міцелію та гомогенізували. Гомогенізований вміст стерилізували в автоклаві при 121 ° С протягом 20 хвилин. Нерозчинні в лугах матеріали осаджували центрифугуванням при 6000 об/хв протягом 20 хв, а потім кілька разів промивали дистильованою водою для їх нейтралізації (рН 7). Далі осад висушували в сушильній шафі при температурі 40 °С та обробляли оцтовою кислотою 2% (об./об.) для розчинення хітозану в умовах зворотного потоку протягом 6 годин при 95° С (1:30 м./об.) Фракцію, нерозчинну у кислоті, відокремлювали центрифугуванням при 6000 об/хв протягом 15-20 хв і виділяли надосадову рідину, що містить хітозан. рН регулювали 2 н. розчином NaOH для осадження грибкового хітозану. Осаджений хітозан центрифугували при 6000 об/хв протягом 15 хв. Ізольований хітозан чотири-п'ять разів промивали дистильованою водою для нейтралізації. Одночасно для промивання хітозану використовували етанол (96%) та ацетон, а потім його сушили у вакуумній сушильній шафі при 60 ° С.

Схожий на попередній метод можна зустріти в інших дослідженнях [76]. Тут хітозан екстрагують починаючи з депротейнізації свіжої біомаси шляхом додавання 30 мл 1 М розчину гідроксиду натрію протягом 15 хв при 121°С. Нерозчинна у лугах фракція відокремлюється центрифугуванням (4000 об / хв / 15 хв) та вакуумною фільтрацією. Суху біомасу промивали чергуючи стадії подачі сольового розчину (0,85%) і холодної дистильованої води до рН 7,0. Залишок, отриманий після цієї стадії, піддавали обробці 2% оцтовою кислотою в кількості 30 мл протягом 15 хв при 100 °С, центрифугували при 4000 об / хв і фільтрували. Супернатант підлужували до рН 9,0, та зберігали в холодильнику протягом 24 год, після чого центрифугували (4000 об / хв / 15 хв) до випадання осаду хітозану. Хітозан промивали холодною дистильованою водою та сольовим розчином до рН 7,0. Після чого зразки поміщали в чашки Петрі для сушіння при 30 ° С протягом 24-48 год.

Екстракція хітозану з грибкового міцелію ферментативним методом описаним в дослідженні [84] базується була обробці 1 М розчином NaOH, а отриманий лужно-нерозчинний матеріал обробляється 0,35 М розчином оцтової кислоти при 25°С протягом 2 годин. У цьому дослідженні вихід хітозану, отриманого з грибкового міцелію, вирощеного під час твердофазної ферментацією, склав 2-3 г / 100 г міцелії.

Ефективна процедура вилучення хітозану необхідна для економічного виробництва грибкового хітозану.

Підсумувавши більшість методів з досліджень можна вивести загальну схему для виробництва хітозану будь-яким грибковим штамом (рис.1.3.)

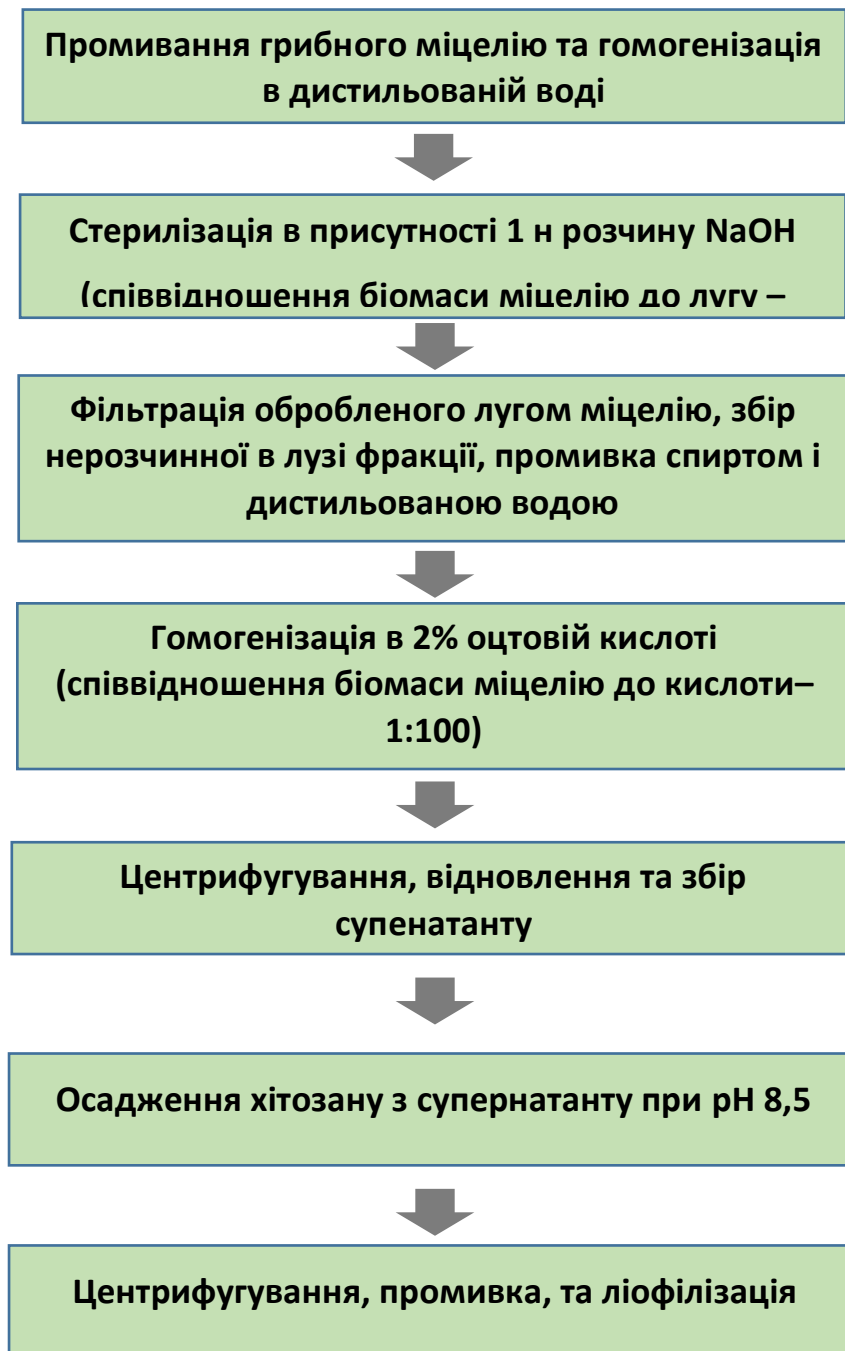


Рис. 1.3. Загальна схема виділення хітозану з клітинної стінки грибів.

РОЗДІЛ 2. Техніко-економічне обґрунтування випуску субстанції для лікарського засобу (ЛЗ) та виробництва готової форми ЛЗ.

2.1. Передумови виробництва ЛЗ

2.1.1. Аналіз фармакологічних властивостей цільового ЛЗ, галузей використання

В останні десятиліття хітозан інтенсивно застосовують в медицині, ветеринарії, косметології, сільському господарстві, харчовій промисловості, біотехнології. За даними 1988 року, в Японії виробили 2500 тон хітозану, в США близько 1000 тон, в Італії, Норвегії 100 тон, в Росії близько 80 тон [6].

Хітин і його похідні застосовують при лікуванні таких важких запальних захворювань шлунково-кишкового тракту, як розлитої гнійний перитоніт і деструктивна форма запалення підшлункової залози. На основі хітозану розроблені детоксикуючі сорбенти. У гранулярній і гелевій формі вони забезпечують високу хімічну і біологічну активність полімеру, достатню проникність і високу гідрофільність. Хітозан зупиняє ріст патогенної мікрофлори, аглютенує мікроби, стимулює функціональну активність макрофагів, індукує секрецію арахідонової кислоти за допомогою активації фосфоліпази. Також, хітозан збільшує виділення медіаторів імунної відповіді, зокрема, інтерлейкіну I, стимулюючого проліферацію Т-хелперів, а також активність гранулоцитів, переважно нейтрофілів. Фагоцитарні частки хітину і хітозану підсилюють утворення активних форм кисню в альвеолярних макрофагах у мишей [6].

Застосування 40% аскорбату хітозану в мембранному діалізі гнійних ран прискорювало на 5-7 доби загоєння експериментальної гнійної рани на тлі мембранного діалізу в порівнянні з використанням 33% полівінілпіролідону, і скорочувало тривалість госпіталізації в середньому на 4 доби [6].

					НУХТ БТЕК 02.02.09 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Магусевич Д.С.			Розділ 2. Техніко-економічне обґрунтування випуску субстанції для лікарського засобу (ЛЗ) та виробництва готової форми ЛЗ.	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Тетеріна С.М.					33	115
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Крім того відмічено, що хітозан проявляє антисептичну активність по відношенню до найбільш поширених збудників гнійних ускладнень. За силою дії він поступається антибіотикам, але при контакті з мікробної флорою в рідкому середовищі зберігає бактеріостатичну активність протягом 2-2,5 доби [6].

Якщо звести все до загальної картини, то спектр біологічної активності хітозану включає цілий ряд функцій, серед яких [7]:

- нормалізація фракцій тригліцеридів
- нормалізація холестерину і жовчних кислот в організмі
- зв'язування клітинного жиру
- нормалізація роботи шлунково-кишкового тракту
- зниження концентрації сечової кислоти
- прискорення загоєння ран і виразок
- знеболюючу дію
- взаємодія з біологічно активним кальцієм
- стабілізація кровоносної тиску
- антимікробну і фунгіцидну дію

Гемостатичні властивості хітозану дозволяють швидко згущувати кров, а також дозволяють зменшити біль, блокуючи нервові закінчення. В даний час збройні сили США і Великобританії успішно використовують перев'язувальні матеріали з хітозаном на полях битв. У пластичної хірургії хітозан використовують при пересадці шкіри. Він сприяє якнайшвидшому загоєнню ран і зменшує утворення рубців після пластичної операції [7].

Волокна з хітозану застосовуються в якості хірургічних ниток, вони розсмоктуються в організмі і не надають алергічного впливу [7].

У фармацевтичному виробництві хітозан використовується в якості наповнювача в таблетках. Наприклад, його використовують як носій в ліках з контрольованим вивільненням. Пребіотичні властивості хітозану дозволяють краще засвоювати активні речовини ліків [7].

Хітозан застосовують для зниження рівня холестерину, також він допомагає боротися з анемією і покращує фізичну силу, апетит і сон у людей з нирковою недостатністю. По визнанню фахівців Державного Наукового Центру біофізики

хітозан і до цього дня залишається найефективнішим протипроменевим засобом. Численними дослідженнями доведено його протипухлинні властивості [7].

Жувальні гумки і рідини для полоскання ротової порожнини, що містять хітозан, запобігають розвитку мікроорганізмів, які викликають карієс. Згідно з дослідженнями, аскорбат хітозану виявляє ефективність при лікуванні періодонтиту, [6, 7].

Звичайні продукти харчування в поєднанні олігосахаридами хітозану, стають функціональними. Спостерігаються такі ефекти як відновлення суглобів, гепатопротекція, проти атеросклеротична дія, корекція артеріального тиску, підвищення імунітету, поліпшення роботи шлунково-кишкового тракту, поліпшення засвоюваності поживних речовин, зниження вісцерального жиру [7].

Нанокompозити на основі хітозану важливі для регенеративної медицини і тканинної інженерії кісток і хрящів. Біорозкладаний, біосумісний хітозан, володіє антибактеріальними і загоюючими властивостями, все частіше використовують при створенні каркасів. Для підвищення механічної міцності додають наночастинки CaP або CaCO_3 , нановолокна гідроксиапатиту. Присутність наночастинок робить матрицю шорсткішою, що створює сприятливі умови для адгезії і проліферації (зростання) клітин на каркасі [8].

В області створення онковакцин актуальною задачею є пошук нових препаратів з ад'ювантною активністю. Хітозан активно вивчають як протипухлинний препарат. Також, сьогодні його розглядають як ад'ювант для вакцин проти онкозахворювань. Молекули хітозану надають дуже широкі можливості для регуляції інтенсивності і напряму імунної відповіді за рахунок можливості приєднання до хітозану лігандів TLR [6, 9].

Ще одним перспективним напрямком розробки ад'ювантів на основі хітозану є матричні конструкції. Показано, що Хітозановий матриця для таргетної доставки вакцинного комплексу до лімфоїдним структурам може запобігати розпад імуногенною компонента вакцини [9].

Активно ведуться дослідження, що стосуються використання хітозану в офтальмології. Велика увага приділяється проблемі низької біодоступності

лікарських препаратів, яка пояснюється наявністю природних фізіологічних і анатомічних окулярних бар'єрів [10].

Не менш інноваційними можна вважати дослідження, що стосуються використання хітозану в ході хірургічних втручань. У 2009 році було проведено дослідження, де застосовували 0,5% водний розчин хітозану для вітреосінерезиса в лікуванні відшарування сітківки. В результаті післяопераційних спостережень відзначено повне анатомічне прилягання сітківки, достовірно підвищилася гострота зору в 5,8 рази, збільшилася сумарне поле зору на 373 градуси, підвищилися характеристики електроретинограми, в той час як в контрольній групі ці показники були нижчими [10].

2.1.2. Огляд потенційного ринку лікарського засобу

Захворювання сухого ока (також відоме як синдром сухого ока) відноситься до групи порушень слізної плівки, які обумовлені зниженим виробництвом сліз або нестійкістю слізної плівки, що асоціюється з дискомфортом в очах і/або візуальними симптомами і запальним захворюванням поверхні ока. Найчастіше захворювання розвивається внаслідок шкідливої звички – тривалої концентрації на певному предметі: екран монітора, телевізора, робота, пов'язана зі спостереженням за певними об'єктами. Не менш важливим фактором є проживання в певній кліматичній зоні, що вимагає використання опалювальних систем і кондиціонерів. Сухе повітря викликає підвищене випаровування рідини з поверхні очей та виникнення неприємного відчуття в оці [85, 86].

Згідно зі статистичними даними, синдром сухого ока спостерігають частіше – у жінок (70 %) і людей старшого віку (понад 60 %). Частота виявлення зниженої функції слізних залоз і ознак синдрому сухих очей становить 76,5 % серед жінок і 60,2 % – серед чоловіків, які кожного дня працюють за комп'ютером. У групу особливого ризику входять особи понад 30 років, а також працівники, які працюють за комп'ютером більше 8 годин на день. Данна статистика вказує на той факт, що захворювання доволі поширене та привертає до себе увагу [86].

Дослідження, проведені американськими офтальмологами в 2013 р., виявили залежність частоти виникнення синдрому сухих очей від рівня забрудненості повітря в районі проживання пацієнтів. Для жителів мегаполісів, де забрудненість повітря

значно вища, ніж у сільській місцевості, шанси розвитку синдрому збільшуються в 3–4 рази порівняно з жителями сільської місцевості. Крім того, жителі високогірних районів також більш схильні до цього захворювання [86].

Найчастіше для лікування цього захворювання використовують препарати, що отримали назву «штучні сльози». Серед них розрізняють препарати з низькою, середньою і високою в'язкістю [86]:

- для синдрому сухого ока лікування краплями розпочинають із застосування препаратів з низькою в'язкістю (Лакрисифи, сльоза натуральна). Перед закапуванням крапель контактні лінзи потрібно знімати;
- при тяжкому перебігу і вираженому порушенні сльозопродукції призначають препарати середньої в'язкості (Лакрисин);
- та високої в'язкості (гелі «Відісік», «Офтагель», «Лакропос»).

Для зняття запалення і нормалізації зволоження очей можуть призначити протизапальні засоби, в тому числі гормональні краплі «Махідех», «Алгех», «Офтан», «Дексаметазон». Зважаючи на підвищений ризик розвитку побічних ефектів від застосування кортикостероїдів, використання цих крапель має відбуватися під суворим контролем лікаря [86].

Сучасний ринок пропонує великий асортимент очних крапель для лікування та профілактики синдрому сухого ока. Одним із таких лікарських засобів є Lacrimera®, що наглядно демонструє гарні показники при лікуванні цього захворювання [87].



Рис. 2.1. Очні краплі Lacrimera®

Діючою речовиною препарату є хітозан-N-ацетилцистеїн, який в промислових масштабах виробляється хімічним способом. Слід зазначити, що виробництво цієї сполуки біохімічним методом є доволі вартісним та довготривалим процесом, оскільки передбачає закупку додаткових реагентів та обладнання [87, 88].

В 2018 році, дослідниками було порівняно вплив звичайного хітозану із хітозан-N-ацетилцистеїном на клітини очного епітелію. Як показало дослідження, звичайний хітозан має аналогічний вплив щодо порівняної сполуки, а в деяких випадках навіть перевищує його показники. В статті застосовувались однакові концентрації речовин та умови, в яких вони реагували. Це є підставою для розгляду можливого створення препарату для очей на основі хітозану, спираючись на препарат Lacrimera® [89].

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

Для визначення рентабельності створення власного виробництва для забезпечення фармацевтичної компанії необхідним АФІ, необхідно проаналізувати та визначити ймовірних виробників. Для розрахунків пропонується обрати очні краплі Lacrimera® з діючою речовиною хітозан-N-ацетилцистеїн. Але зважаючи на те, що цю діючу речовину неможливо придбати через інтернет, а також маючи пропозицію замінити основний компонент на хітозан, доречно проаналізувати останню сполуку. Такий аналіз представлено в табл.2.1.

Таблиця 2.1.

Аналіз ринку виробників хітозану

Виробник, країна/місто	Ціна	Джерело
«Epin Biotech Co.,Ltd», Китай	2741	1
Китай	2500	2
Німечина	4750	3
«XIAN Tian Guangyuan Biotech Co.,Ltd», Китай	3756	4
«Merck KGaA», США	30515	5

Примітка: 1 - https://www.alibaba.com/product-detail/Chitosan-Supply-Chitosan-Oligosaccharide-Water-Soluble_1600261662446.html?spm=a2700.7735675.normal_offer.d_image.3f66328aLpmJ3s&s=p, 2 - <https://prom.ua/p710650786-hitozan-suhoj-poroshok.html?>, 3 - <https://city-soap.com.ua/products/hitozan>, 4 - https://www.alibaba.com/product-detail/Chitosan-Chitosanchitosan-Chitosan-Price-Factory-Best_1600122586527.html?spm=a2700.7735675.normal_offer.d_image.3f66328aLpmJ3s&s=p, 5 -

https://www.sigmaldrich.com/UA/ru/search/9012-76-4?focus=products&gclid=Cj0KCQjw8vqGBhC_ARIsADMSd1CD2E5Yfm6QkD_TKHGiKSWbuMZUYqv5kusTs1rrP9PfF_54lmbGNY4aAoV3EALw_wcB&page=1&perPage=30&sort=relevance&term=9012-76-4&type=cas_number

Тож, як видно з табл.1.1., в Україні не представлено виробників хітозану, що дозволяє нам обрати ще незайману нішу на вітчизняному ринку.

2.1.4. Опис лікарського засобу згідно АНД.

Хітозан, краплі для очей має вигляд прозорої, без забарвлення рідини.

Препарат містить отриманий шляхом мікробіологічного синтезу мукоадгезивний полісахарид – хітозан та оцтову кислоту у якості підкислювача.

Випускається у пластикових флаконах по 5 доз у пластинці, у картонних пакуваннях по 1-й пластинці у кожній.

Методи контролю препарату Хітозан, краплі очні проводяться згідно Аналітичної нормативної документації (АНД).

Для підготовки проби, 10 мл готового продукту поміщають в бікс для висушування та висушують в сухожаровій шафі при 100 °С. Отриманий осад використовують для постановки тестів ідентифікації, розчинності.

Опис препарату

Прозора, безбарвна рідина. Визначається візуально

Ідентифікація препарату

До отриманого осаду додають 2-3 краплі розчину йодиду/калію йодиду і перемішують, після чого, осад повинен змінити колір на темно-коричневий, а розчин стати безбарвним. Далі суміш підкислюється 2-3 краплями 1% H₂SO₄, при додаванні сірчаної кислоти темно-коричневий колір повинен стати темно-фіолетовим.

Прозорість препарату

Проміжна продукція має бути прозорою в порівнянні з водою. Визначають методом порівняння за ДФУ, 2.2.1.

Ступінь забарвлення

Препарат має бути безбарвним в порівнянні з водою. Визначають методом порівняння за ДФУ, 2.2.2.

pH препарату

Від 6.3 до 6.7. Визначають за ДФУ, 2.2.3.

Об'єм вмісту контейнера

Не менше 1.0 мл, визначається за допомогою каліброваного механічного дозатора.

Стерильність

Препарат має бути стерильним. Визначають методом мембранної фільтрації за ДФУ, 2.6.1.

Механічні включення

Мають бути практично відсутні. Визначають методом візуальної інспекції за ДФУ, 2.9.20.

Кількісне визначення хітозану

1 мл готового продукту поміщають в бікс для висушування та висушують в сухожаровій шафі при 100 °С. Отриманий осад зважується на аналітичних вагах. Дослід повторюється 10 разів, середнє значення всіх замірів береться як результат дослідіду.

2.1.5. Розрахунок потреби у субстанції для випуску ЛЗ

Як вже зазначалось вище, для лікування синдрому сухого ока пропонується виробництво вітчизняного препарату згідно відомої рецептури очних крапель Lacrimera[®], але з заміною наведеного активного фармацевтичного інгредієнту на хітозан. Оскільки показники впливу хітозану та діючої речовини препарату майже не відрізняються один від одного, пропонується залишити звичайну дозу для олігосахариду, що становить 0,3 г в одному флаконі. В одній упаковці препарату знаходиться 5 флаконів [90].

Препарат рекомендовано для людей старше 18 років. Періодичність прийому: 1 раз на добу по 1 краплі в кожне око (1 флакон). Тривалість лікування/профілактики: 1 місяць [87, 90].

За даними дослідження індексу здоров'я Україна 2016, лише 28% українців звертаються до лікаря у випадку хвороби, 52% займаються самолікуванням (серед яких 32% лікуються ліками і 20% намагаються видужувати за допомогою народних методів та засобів) і 20% взагалі не лікуються [93].

За статистикою, станом на 2019 рік в Україні проживає близько 41 млн людей. З них, близько 7.5 млн. діти до 18 років [91].

Враховуючи загальну кількість пацієнтів, які можуть і будуть користуватися ліками, кількість пацієнтів які лікуються лікарськими засобами становить $\approx 50\%$ і дорівнює:

$$\frac{33,5 \cdot 28}{100} = 9,38 \text{ млн}$$

Поширеність хвороби «сухого ока» серед населення України приблизно дорівнює 18% населення. [92]. Тому, кількість уражених синдромом сухого ока на 2,09 млн людей становить:

$$\frac{9,38 \cdot 18}{100} = 1,68 \text{ млн}$$

При виході на ринок також потрібно враховувати наявність на ринку конкурентних препаратів.

Для лікування хвороби «сухого ока» можуть використовувати такі препарати, як: «Лакрисифи», «Сльоза натуральна» при легкому переході хвороби, «Лакрисин» при більш тяжких випадках та препарати більш високої в'язкості (гелі) при потребі в пролонгуванні дії лікарського засобу, такі як «Відісік», «Офтагель», «Лакропос» також є такі препарати, як «Лакрімера», основною перевагою якого є наявність в складі мукоадгезивного агенту. Кожен з цих препаратів займає свою (різну) долю на ринку лікування хвороби «сухого ока», проте для усереднення та спрощення розрахунків, нами буде прийнято, що кожний із них займає рівну «нішу».

$$\frac{1,68 \cdot 12,5}{100} = 0,21 \text{ млн}$$

Необхідна кількість хітозану на 1 людину за весь період лікування становить:

$$30 \cdot 1 \cdot 0,3 = 9 \text{ г}$$

Тож, за весь період лікування 1 людина використає близько 30 флаконів (що дорівнює 6 упаковкам), які в загальному містять 9 г хітозану. Необхідна кількість хітозану на порашовану кількість населення:

$$210000 \cdot 9 = 1900 \text{ кг}$$

Узагальнені дані представлено в табл.2.2.

Узагальнюючі дані

Препарат	К-ть діючої речовини в 1 флаконі, г	Кількість ураженого населення Києва	Особливості прийому	Необхідна кількість хітозану для 1 людини, г	Річна потреба в хітозані, кг
Очні краплі Lacrimera® з хітозаном як діюча речовина	0,3	490 тис.	1 раз на день по 1 краплі в кожне око (1 флакон) протягом місяця	9	1900

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

Річна потреба в хітозані була зазначена раніше і становить 1906 кг. За даними що будуть описані в п.2.1 обраним штамом *A. repens* (CBS 102.32) утворюється близько 2,8 г/л полімеру. Приймаючи попередні данні як вхідні для розрахунку, кількість культуральної рідини необхідної для отримання 1900 кг хітозану становить:

$$\frac{1900 \cdot 1000}{2,8} = 681000 \text{ л} = 681 \text{ м}^3$$

Враховуючи сумарні втрати цільового продукту при виділенні (до 30 %), необхідно отримати таку кількість культуральної рідини:

$$V_{кр} = 681 / (1 - 0,3) = 973 \text{ м}^3$$

Приймаємо, що для отримання 2250 м³ культуральної рідини необхідно 330 робочих трудоднів (Т_{рд}). Відповідно кількість культуральної рідини на добу (V_д) становитиме:

$$V_{д} = V_{кр} / T_{рд} = 973 / 330 \approx 2,95 \text{ м}^3$$

Розрахуємо кількість культуральної рідини за один цикл, (V_{крц}):

$$V_{крц} = K_1 \cdot V_{д} \cdot T_{цф} / 24 = 1,1 \cdot 2,95 \cdot 51 / 24 \approx 6,8 \text{ м}^3$$

де T_{цф} - цикл роботи ферментера, який включає: мийку та огляд – 1,5 год, перевірку на герметичність – 0,5 год, підігрів та стерилізацію апарату – 1,5 год, охолодження ферментеру – 1 год, завантаження поживного середовища – 1,5 год,

засів культурою – 0,5 год, ферментацію – 44 год, та вивантаження – 0,5 год, і становить 51 годину. K_1 – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій ($K_1 = 1,1$).

Геометричний об'єм ферментера для отримання $6,8 \text{ м}^3$ культуральної рідини, з коефіцієнтом заповнення $0,6$ має становити:

$$V_{\Gamma} = V_{\text{цк}}/K_{\text{зап}} = 6,8/0,6 \approx 11,3 \text{ м}^3,$$

де $K_{\text{зап}}$ – коефіцієнт заповнення ферментера.

Отже, вибираємо ферментер об'ємом $V_{\phi} = 11 \text{ м}^3$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зф}} = V_{\text{цк}}/V_{\phi} = 6,8/11 = 0,62$$

За виробничий цикл отримують $V_{\text{кр}} = 6,8 \text{ м}^3$ культуральної рідини.

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом з врахуванням втрат в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря (10%) становитиме:

$$V_{\text{роб.1}} = V_{\text{кр}}/(1-E_{\phi}) = 6,8/(1-0,1) = 7,6 \text{ м}^3,$$

де E_{ϕ} – втрати культуральної рідини під час біосинтезу.

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері з робочим об'ємом $V_{\text{роб.1}} = 7,6 \text{ м}^3$.

При вибраному коефіцієнті заповнення $K_{\text{зап}}=0,6$ можливий геометричний об'єм ферментера $V_{\phi.1} = 7,6/0,6 = 12,6 \text{ м}^3$. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{сф}} = 12 \text{ м}^3$ та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап.1}} = V_{\text{роб.1}}/V_{\text{сф}} = 7,6/12 \approx 0,63$$

Уточнений коефіцієнт дозволяється для ферментерів з аерацією.

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить 10% від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища у ферментері становитиме:

$$V_{\text{пс1}} = V_{\text{роб.1}}/(1+X_{\phi}) = 7,6/(1+0,1) \approx 6,9 \text{ м}^3$$

де X_{ϕ} – доза посівного матеріалу для ферментера.

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить:

$$V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб.1}} - V_{\text{пс1}} = 7,6 - 6,9 = 0,7 \text{ м}^3$$

Для одержання 0,7 м³ інокуляту в інокуляторі враховуємо втрати в результаті краплиносу через колектор відпрацьованого повітря (10%). Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу в інокуляторі становить:

$$V_{\text{роб.2}} = V_{\text{пм1}} / (1 - E_{\text{ф}}) = 0,7 / (1 - 0,1) \approx 0,78 \text{ м}^3$$

Можливий геометричний об'єм інокулятора $V_{\text{ін}} = 0,78 / 0,6 \approx 1,3 \text{ м}^3$. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний посівний апарат $V_{\text{сін}} = 1,5 \text{ м}^3$ та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап.2}} = V_{\text{роб.2}} / V_{\text{сін}} = 0,78 / 1,5 = 0,52$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у дозволених межах.

Кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{пс2}} = V_{\text{роб.2}} / (1 + X_{\text{ін}}) = 0,78 / (1 + 0,1) \approx 0,71 \text{ м}^3$$

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пс2}} = 0,78 - 0,71 = 0,07 \text{ м}^3 \text{ або } 70 \text{ л}$$

Для одержання 70 л інокуляту в інокуляторі враховуємо втрати в результаті краплиносу через колектор відпрацьованого повітря (10%). Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу в інокуляторі становить:

$$V_{\text{роб.3}} = V_{\text{пм2}} / (1 - E_{\text{ф}}) = 70 / (1 - 0,1) \approx 78 \text{ л}$$

Можливий геометричний об'єм інокулятора $V_{\text{ін}} = 78 / 0,6 \approx 130 \text{ л}$. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний посівний апарат $V_{\text{сін}} = 150 \text{ л}$ та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап.3}} = V_{\text{роб.3}} / V_{\text{сін}} = 78 / 150 = 0,52$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у дозволених межах.

Кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{пс3}} = V_{\text{роб.3}} / (1 + X_{\text{ін}}) = 78 / (1 + 0,1) \approx 71 \text{ л}$$

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{\text{пм3}} = V_{\text{роб.3}} - V_{\text{пс3}} = 78 - 71 = 7 \text{ л}$$

Для одержання 7 л інокуляту в посівному апараті враховуємо втрати в результаті краплиносу через колектор відпрацьованого повітря (10%). Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу в інокуляторі становить:

$$V_{\text{роб.4}} = V_{\text{пм3}} / (1 - E_{\text{ф}}) = 7 / (1 - 0,1) \approx 7,8 \text{ л}$$

Можливий геометричний об'єм інокулятора $V_{ін}=7,8/0,6\approx 13$ л. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний посівний апарат $V_{сін}=15$ л та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{зап.4}=V_{роб.4}/V_{сін}=7,8/15=0,52$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у дозволених межах.

Кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{пс4}=V_{роб.4}/(1+X_{ін})=7,8/(1+0,1)\approx 7,1 \text{ л}$$

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{пм4}=V_{роб.4}-V_{пс4}=7,8-7,1=0,7 \text{ л}$$

0,7 л посівного матеріалу ми можемо отримати використовуючи колби об'ємом 750 мл та коефіцієнтом заповнення $K_з = 0,2$. Кількість колб становитиме:

$$N_{колб}=V_{пм4}/(V_{колб}\times K_{зап})=700/(750\times 0,2)=5 \text{ шт.}$$

Таким чином, для одержання посівного матеріалу необхідно 5 колб.

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого культивування у ферментері об'ємом 12 м^3 з коефіцієнтом заповнення 0,6 буде проходити у 4 етапи:

1. Вирощування посівного матеріалу в колбах качалках
2. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі на 15 л
3. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі на 150 л
4. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі на $1,5 \text{ м}^3$.

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

Враховуючи інформацію наведену в розділі вище, можемо розрахувати необхідний об'єм готового лікарського засобу на рік:

$$\frac{1900000}{0,3} = 6333333 \text{ одиниць}$$

Маючи на увазі необхідний річний об'єм ГЛЗ, проте беручи до уваги наявність не термінового, а річного попиту, пропонується розділити виробництво на 1 рік (11 місяців за виключенням одного місяця на проведення тех. обслуговування та кваліфікаційних робіт):

$$\frac{6333333}{11} = 575757 \text{ одиниць}$$

Враховуючи можливі втрати, а також допустимий рівень відхилення вмісту АФІ, необхідне місячне виробництво продукту буде дорівнювати $575757 \pm 10\%$ ($518181 \div 633332$) одиниць.

Швидкість приготування та наповнення серії подібних однодозних флаконів може варіюватися у досить широких діапазонах, даний чинник сильно залежить від типу та швидкості машини наповнення. У середньому для них визначається швидкість наповнення приблизно 9000 флаконів за годину. Беручи до уваги тривалість робочої зміни оператора наповнення (12 год.), оператор може наповнювати у середньому 100 тис. флаконів на одну зміну, враховуючи можливі втрати, а також допустимий рівень відхилення вмісту АФІ, пропонується розмір серії буде дорівнювати $100000 \pm 10\%$ ($90000 \div 110000$) флаконів.

Таким чином, кількість змін необхідна для задоволення місячної потреби дорівнює:

$$\frac{575757}{100000} = 5.75 \text{ змін}$$

Що з можливим відхиленням в 20% (на непередбачені обставини, можливі зупинки та відхилення в процесі) дорівнює 6 змінам і визначається, як 3 робочі дні.

РОЗДІЛ 3. Обґрунтування вибору технологічної схеми біосинтезу субстанції та технологічної схеми виробництва ЛЗ

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

Як вже було зазначено у попередньому розділі, завдяки своїм властивостям, хітозан здобув широке застосування в біомедицині та побудові механізмів доставки ліків. Наразі він розглядається, як один із найбільш багатообіцяючих мукоадгезивних агентів в фармації, з найкращою можливістю його застосування в офтальмологічній медицині.

Здебільшого, отримання хітозану відбувається за допомогою хімічного методу, він містить недоліки притаманні всім комплексним термохімічним процедурам (важко контролюється, екологічно небезпечний). Крім того, мікробіологічно отриманий хітозан має кращі фізичні властивості: рівень деацетилювання, індекс кристалічності, молекулярну масу [41, 49, 58, 67].

Існує декілька способів отримання мікробіологічного хітозану [94]: перший метод використовує здатність грибів синтезувати хітин деацетилазу, що є обов'язковою умовою трансформації хітину в хітозан, та позаклітинним синтезом у присутності хітину [60, 66, 95]. Другий метод базується на екстракції хітозану зі стінок певних видів грибів(зокрема зигомікотів), як *Mucor rouxii*, *Absidia glauca*, *Aspergillus niger*, *Gongronella butleri*, *Pleurotus sajor-caju*, *Rhizopus oryzae*, *Lentinus edodes* та *Trichoderma reesei*, кожний з яких розглядається як можливе джерело мікробіологічного хітозану [68, 70, 72-75, 79, 81, 83].

					НУХТ БТЕК 02.02.09 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Магусевич Д.С.			Розділ 3. Обґрунтування вибору технологічної схеми біосинтезу субстанції та технологічної схеми виробництва ЛЗ	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Тетеріна С.М.					47	114
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Каур К. зі співавторами [58] були ізольовані та характеризовані зі зразків землі, поміж інших, два штами хітин-деацетилаза продукуючих бактерій: *Bacillus sp.* та *Serratia sp.* Зразки землі були проконтрольовані на вміст органічного вуглецю, вільного фосфору та мікробіологічну популяцію. Бактеріальні штами зі здатністю до культивування були ізольовані, колонії підраховані та перенанесені. Була проведена їх морфологічна та біохімічна характеристика та скринінг культур на хітиндеацетилазу (ХДА). Для трансформації хітину в хітозан, ізолятами з наявною ХДА активністю, була проведена ферментація в флаконах на ротаційному шейкері. По закінченню процесу було проведене якісне та кількісне визначення отриманого хітозану.

Gharieb M. M. зі співавторами [70] провели дослідження щодо отримання хітозану та оптимізації параметрів біосинтезу для декількох видів зигомикотів: *Mucor rouxii* RCMB 015002, *Cunninghamella elegans* RCMB 012002 та *Rhizopus sp.* Спорову суспензію інкубували на шейкері. Вченими було проведено дослідження впливу вибору поживного середовища, джерела вуглецю, джерела азоту та фізичних параметрів на синтез хітозану. Для контролю впливу середовища, кожний з тестованих штамів грибів вносили у досліджувані середовища та інкубували за однакових умов, найкращі результати було отримано за використання Yeast Extract–Peptone–Glycerol (YPG). При визначенні ефективності вибору джерела вуглецю (рН 5, 28±2°C, 7 днів, Czapek's agar (CZA)), найкращий результат спостерігався у випадках з глюкозою. У ході досліджень щодо впливу джерела азоту найкращим для *Cunninghamella* та *Mucor* виявився NaNO₃, для *Rhizopus* найкращі результати отримали за використання сечовини. Також спостерігалось збільшення виходу хітозану при збільшенні температури з 20°C до 30°C та подальше зниження при її збільшенні до 35°C. За температури 30°C було отримано найкращі результати у всіх випадках культивування. Крім того, слід зазначити, що рН на рівні 5 виявилися найкращим для штамів *Cunninghamella* та *Mucor*, а для *Rhizopus* найкращим було рН 4.5.

Dos Santos E. R. з співавторами [78] дослідили збільшення кількості біомаси та вмісту хітозану в *Cunninghamella elegans* UCP/WFCC 0542, за допомогою утворення надлишку амінокислот. Дослідження було проведено відповідно до 2³ факторіального

дизайну. Найбільша кількість хітозану була отримана в випадку зі вмістом середовища: аспарагін 0,025%, цукроза 0,15% і 0,45% кукурудзяний екстракт. Під час виконання експерименту відбувався потенціометричний контроль рН, спостерігалось незначне підвищення зі збереженням кислого рН, Після закінчення інкубації був проведений аналіз кількості загального органічного вуглецю та залишкового азоту. Проведена характеристика отриманого хітозану, показала більшу ступінь деацетилювання та індекс кристалічності ніж у комерційного хімічного хітозану.

Davoust N. та Persson A. [80] провели аналіз впливу морфології та часу збору на вихід хітозану з *Absidia repens* (CBS 102.32). Для ферментації був використаний стандартний реактор 10л з мішалками, обладнаний рН електродом для контролю рівня рН в ході процесу. рН утримувався до значення 6.0 методом автоматичної титрування 2.0 М NaOH в ферментаційний розчин. У ході експерименту був перевірений вплив трьох різних режимів перемішування на морфологічні показники досліджуваних колоній та вихід хітозану з сухої маси. Перевірка відбулася в режимах сильного перемішування, слабкого перемішування, та слабкого перемішування зі збільшенням в плинні процесу. Найкращий результат був виявлений при контролі процесу в першому експерименті, з найшвидшим перемішуванням, де найкращий результат спостерігався на 44 годину культивування.

Maghsoodi V. зі співавторами [81] провели дослідження виробництва хітозану глибинною ферментацією з *Aspergillus niger* BBRC, 20004. У ході експерименту штам був активований і внесений в ферментаційні розчини з різними об'ємами внесеної глюкози (до 12%), для кожної концентрації була проведена ферментація на різні проміжки часу. Найбільший вихід біомаси клітин спостерігався для 6 днів ферментації, проте найкращий вихід хітозану був отриманий на 12 день. Надалі був проведений аналіз виходу хітозану, базуючись на вмісті глюкози в середовищі, середовище з 8% вмістом виявило найкращий вихід.

Tasar O. C. зі співавторами [73] було проведено дослідження отримання хітозану з *Rhizopus oryzae* PAS 17 в нестерильних умовах, та оптимізацію його виходу методом ортогонального дизайну Тагучі (4⁵). Були розглянуті п'ять змінних параметрів на чотирьох рівнях. Розглянуті параметри включали в себе ті, які були визнані найважливішими в збільшенні отриманої кількості біомаси та хітозану: вміст меляси,

MgSO₄*7H₂O, об'єм посівного матеріалу, режим перемішування та час інкубації. У рамках дослідження був проведений аналіз найкращого вибору фізичних параметрів культивування, методом одного зміни одного фактору, був перевірений діапазон температур від 5 до 35°C та рН від 3 до 8, основним критерієм був, як і найкращий вихід біомаси та хітозану, так і умови, які допоможуть уникати небажаного розвитку мікроорганізмів. Оптимальною температурою було визначено 15°C, наступним кроком був досліджений діапазон рН в умовах культивування при температурі, яка була найкращим випадком в попередньому досліді, оптимальний рН був визначений як 4.5. Застосування цих результатів призвело до збільшення кількості отриманого хітозану, яка була більше в 14.45 раз ніж на початковому середовищі.

Для систематизації отриманої інформації, дані необхідні для проведення порівняльної характеристики наведено в табл. 3.1

Таблиця 3.1

Порівняльна характеристика складу поживного середовища та умов культивування продуцентів хітозану

Біологічний агент	Склад поживного середовища, г/л	Тривалість культивування, год	Особливості процесу біосинтезу	Концентрація хітозану, г/л	Література
<i>Bacillus sp.</i>	Дріжджовий екстракт - 1 Амоній сульфат - 0,4 КН ₂ РО ₄ - 0,15 Хітин - 50	48	Орбітальний шейкер Температура - 25°C рН - 8.0 Глибинне культивування	0.16	Kaur, Kuldeep & Dattajirao, Vikrant & Shrivastava, Vikas & Bhardwaj, Uma. (2012). Isolation and Characterization of Chitosan-Producing Bacteria from Beaches of Chennai, India. <i>Enzyme research.</i> 2012. 421683. 10.1155/2012/421683.
<i>Serratia sp.</i>				0.1	
<i>Mucor rouxii</i> RCMB 015002	Дріжджовий екстракт, 10 Гліцерол, 20 мл Пептон, 20	168	Інкубаційний шейкер 125 об/хв Температура 28±2°C рН 5 Глибинне культивування	0.64	Gharieb, M.M., El-Sabbagh, S.M., Shalaby, M., & Darwesh, O. Production of chitosan from different species of zygomycetes and its antimicrobial activity. 2015.
<i>Cunninghamella elegans</i> RCMB				0.44	
<i>Rhizopus sp.</i>				0.24	
<i>Cunninghamella elegans</i> UCP/WFCC 0542	Аспарагін, 0.25 Цукроза, 1.5 Кукурудзяний екстракт, 4.5 мл	96	Орбітальний шейкер 150 об/хв Температура 28 °C Глибинне культивування	2.14	Dos Santos ER, da Silva MC, de Souza PM, da Silva AC, de Paiva SC, Albuquerque CD, Nascimento AE, Okada K, Campos-Takaki GM. Enhancement of <i>Cunninghamella elegans</i> UCP/WFCC 0542 biomass and chitosan with amino acid supply. <i>Molecules.</i> 2013 Aug 22;18(9):10095-107. doi: 10.3390/molecules180910095. PMID: 23973987; PMCID: PMC6270231.

Закінчення табл. 3.1

<i>Absidia repens</i> (CBS 102.32)	Глюкоза, 20 Дріжджовий екстракт, 1 (NH ₄) ₂ SO ₄ , 11 KH ₂ PO ₄ , 3 MgSO ₄ , 0.6 ZnSO ₄ *7H ₂ O, 1.8 мг MnSO ₄ *H ₂ O, 0.3 мг CuSO ₄ *5H ₂ O, 0.4 мг FeEDTA, 1.3	44	Стандартний реактор з мішалкою та рН електродом (STR), Chemofarm, робочий об'єм 10 л Автоматична підтитровка до рН 6.0 Температура 25 °С. Подача стерильного повітря зі швидкістю 1 об'єм повітря/об'єм культуральної рідини/хв. Швидкість перемішування 350 об/хв	2.8	Davoust, N., Persson, A. Effects of growth morphology and time of harvesting on the chitosan yield of <i>Absidia repens</i> . <i>Appl Microbiol Biotechnol</i> 37, 572–575 (1992). https://doi.org/10.1007/BF00240727
<i>Aspergillus niger</i> BBRC, 20004	Декстроза, 8 Мікологічний пептон, 10	228	Інкубаційний шейкер 150 об/хв Температура 30°С Глибинне культивування	0.9121	Maghsoodi, Vida & Razavi, Javad & Yaghmaei, Soheila. (2010). Production of Chitosan by submerged fermentation from <i>Aspergillus niger</i> . <i>Transactions C: Chemistry and Chemical Engineering</i> . 16.
<i>Rhizopus oryzae</i> PAS 17	(NH ₄) ₂ SO ₄ , 3 KH ₂ PO ₄ , 1.5 FeSO ₄ *7H ₂ O, 0.02 Меляса, 70 мл MgSO ₄ *7H ₂ O, 0.5	192	Орбітальний шейкер 150 об/хв Температура 15 °С Початковий рН середовища 4.5	1.59	Tasar OC, Erdal S, Taskin M. Chitosan production by psychrotolerant <i>Rhizopus oryzae</i> in non-sterile open fermentation conditions. <i>Int J Biol Macromol</i> . 2016 Aug;89:428-33. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.05.007. Epub 2016 May 3. PMID: 27154516.

Згідно приведеної інформації найбільший вихід отриманого хітозану спостерігається для *C. elegans* UCP/WFCC 0542 – 2.14 г/л, *R. oryzae* PAS 17 – 1.59 г/л та *A. repens* (CBS 102.32) – 2.8 г/л. Найменший вихід – у випадку культивування *Bacillus sp.* та *Serratia sp.*, у яких найбільший вихід складає всього 0.16 г/л за 48 год. для *Bacillus sp.*

У випадку наявності декількох біологічних агентів в одному джерелі, до уваги беремо тільки ті, що мають найбільший вихід хітозану.

Виходячи з аналізу даних наведених у таблиці 2.1, в подальшому з точки зору вибору найбільш перспективного біологічного агента не доцільно розглядати: *Bacillus sp.* (занадто низький вихід), *M. rouxii* RCMB 015002 (низький вихід і висока тривалість ферментації), *A. niger* BBRC, 20004 (занадто висока тривалість культивування).

Проте, представленої інформації недостатньо для проведення об'єктивного вибору біологічного агента, це рішення доцільно приймати після проведення аналізу економічної складової виробництва.

Так як одним з основних критеріїв вибору біологічного агента є його здатність рости на найбільш дешевих поживних середовищах, наступним етапом аналізу перспективності продуцента є розрахунок та порівняння вартості поживних середовищ для культивування продуцентів, що синтезують хітозан у найбільших концентраціях (табл. 3.2).

Таблиця 3.2

Вартість компонентів поживного середовища для культивування продуцентів хітозану

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн./кг	Вартість компонента (грн.) на 1 л середовища	Джерело інформації
<i>Cunninghamella elegans</i> UCP/WFCC 0542	Аспарагін, 0.25	580	0.145	1
	Сахароза, 1.5	17	0,0255	2
	Кукурудзяний екстракт, 4.5 мл	50	0.225	3
	Вартість 1 л середовища – 0.40 грн			
<i>Absidia repens</i> CBS 102.32	Глюкоза, 20	29.40	0.588	4
	Дріжджовий екстракт, 1	284	0.284	5
	(NH ₄) ₂ SO ₄ , 11	11	0.121	6

	KH ₂ PO ₄ , 3	60	0.18	7
	#MgSO ₄ *7H ₂ O, 1.2	12	0,0144	8
	ZnSO ₄ *7H ₂ O, 1.8 мг	14	0,0000252	9
	MnSO ₄ *H ₂ O, 0.3 мг	20	0,000006	10
	CuSO ₄ *5H ₂ O, 0.4 мг	45	0,000018	11
	FeEDTA, 1.3	169	0,2197	12
	Вартість 1 л середовища – 1.41 грн			
<i>Rhizopus oryzae</i> PAS 17	(NH ₄) ₂ SO ₄ , 3	11	0.033	6
	KH ₂ PO ₄ , 1.5	60	0.09	7
	FeSO ₄ *7H ₂ O, 0.02	4	0,00008	13
	Меляса, 70 мл	34	2.38	14
	MgSO ₄ *7H ₂ O, 0.5	12	0.006	8
	Вартість 1 л середовища – 2,51 грн			

- У випадку MgSO₄, для придбання був вибраний кристалогідрат, проте об'єм використаної в середовищі солі був коригований, для відповідності вмісту чистої.

Примітка. * – Ціни наведено станом на лютий 2021 р. 1 - <https://kiev.flagma.ua/uk/asparagin-o9357812.html>, 2 - <https://lvov.flagma.ua/uk/cukor-50-kg-o4491622.html>, 3 - https://bigl.ua/p1310282824-ekstrakt-kukuruznyj-cs1?click_track_data=.eJwdjs0KgkAYAN_I0xu4_pR5qzQrSbQVyyLCdDO1dmW1jYzePYs5DXOZN9ScZY-0PRUZmEhFsmL0aBKkyb1Oipz-g4JUdawZEjTswVMCjpyL_AYStKwitFfrOXtnlxnZbTTjGZaDbNuRi5Nwf-VQOSKOant4Sf01u-55E6xFjd0qvtt1NB31WFhhucLzwBNxtAh1iy-5OxGh3IEMv5GW5Iy_-pEGzAMykCxr88Xct07vg.QTy7ABxm8Pqw3JMCuQw9nREOC_Q, 4 - <https://www.systopt.com.ua/item-glyukoza>, 5 - https://russian.alibaba.com/product-detail/yeast-extract-cas-8013-01-2-60740128916.html?spm=a2700.7724857.normal_offer.d_title.3cba2d57QS6Snk&s=p, 6 - <https://prom.ua/ua/p1195175374-dobrivo-sulfat-amoniyu.html?&primelead=My4wMw>, 7 - https://russian.alibaba.com/product-detail/pharmaceutical-grade-potassium-dihydrogen-phosphate-kh2po4-7778-77-0-price-60474822490.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal_offer.d_title.78e83c21R1qDJ6, 8 - <https://prom.ua/ua/p40341252-magnij-sernokislyj-mnogovodnyj.html?&primelead=MS4xNw>, 9 - https://russian.alibaba.com/product-detail/manufacture-of-zinc-sulphate-heptahydrate-znso4-7h2o-231020032.html?spm=a2700.7724857.normal_offer.d_title.10cb2bcdqpuSNG, 10 - <https://kiev.flagma.ua/marganec-sernokisly-sulfat-marganca-tu-6-47-53028-10-93-o10359044.html>, 11 - <https://russian.alibaba.com/product-detail/blue-crystal-copper-sulphate-copper-sulfate-factory-price-direct-supplier-fob-price-iso-certified-1600113113190.html?spm=a2700.8699010.normalList.2.4c8d6889uuCqfL&s=p>, 12 - <https://agrobiz.net/mikroudobrenie-helat-zhelezha-fe-edta-k-13-proizvodstvo-adob-polsha.html>, 13 - <https://kiev.flagma.ua/uk/kuporos-zhelezny-o10358680.html>, 14 - <https://harkov.flagma.ua/uk/melyasa-malyas-patoka-buryakova-o3412141.html>.

За результатом аналізу даних наведених в табл. 3.2, найдешевшим є середовище, для культивування *C. elegans* UCP/WFCC 0542, яке у 3.52 рази дешевше, за середовище для *A. repens* (CBS 102.32). Найдорожчою виявилася вартість одного літру середовища для *R. oryzae* PAS 17, вартість якого склала на 78 % більше, ніж середовище для *A. repens* CBS 102.32.

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

Умовна вартість хітозану

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища, грн	Концентрація хітозану, г/л	Умовна вартість 1 г хітозану, грн./ г	Тривалість культивування, год	Кількість утвореного хітозану за годину, г /год
<i>Cunninghamella elegans</i> UCP/WFCC 0542	0.40 грн	2.14	0,19	96	0,0223
<i>Absidia repens</i> CBS 102.32	1,41 грн	2.8	0,50	44	0,0636
<i>Rhizopus oryzae</i> PAS 17	2,51 грн	1.59	1,58	192	0,0083

У результаті проведення розрахунку умовної вартості 1 г хітозану на 1 л середовища (без урахування інших фінансових факторів), найдешевшим виявилось культивування *C. elegans* UCP/WFCC 0542, 1 г хітозану якого більш ніж в у 2.5 рази дешевший ніж для *A. repens* CBS 102.32, та більш ніж у 8 разів, ніж для *R. oryzae* PAS 17. Продуктивність біосинтезу *R. oryzae* PAS 17 виявилась найменшою, вона на 63% та 87% менше ніж для *C. elegans* UCP/WFCC 0542 та *A. repens* CBS 102.32 відповідно. Окрім зазначеного, *A. repens* (CBS 102.32) має найменший час культивування, який у 2 рази менше, ніж для другого по продуктивності агенту (*C. elegans* UCP/WFCC 0542), також процес його культивування масштабований і найбільш придатний до повномасштабного виробничого культивування, порівняно з *C. elegans* UCP/WFCC 0542 та *R. oryzae* PAS 17, виробництво яких відбувалося у лабораторному масштабі.

Також, не зважаючи на відносну давність дослідження культивації та отримання хітозану з *A. repens* CBS 102.32 (опубліковано в 1992 р), дане дослідження залишається одним із найбільш актуальних і на сьогодні, пропонуючи нам одні із найкращих умов виробництва мікробіологічного хітозану разом з найкращим виходом бажаного компоненту, середовище культивування цього агенту не є самим дешевим з оглянутих, проте його висока продуктивність і низький час культивування створюють кращі можливості для потенційного промислового виробництва.

3.2. Обґрунтування вибору способу культивування і типу ферментера

Спосіб культивування та відповідний тип ферментеру

Обираючи спосіб культивування продуценту описаного в минулому пункті перш за все розглядаємо беручи до уваги, що продуктом є хітозан, який є зв'язаний з клітинною стінкою грибку. Таким чином для великомасштабного виробництва грибкової біомаси найбільш вигідним і зручним методом є глибинне культивування, адже згідно ТЕО описаним в розділі 1 річна потреба в хітозані становить 1900 кг, що враховуючи 330 робочих трудоднів складе 5.75 кг за добу. Для досягнення такої продуктивності глибинним методом достатньо ферментеру об'ємом 12 м³, тоді як для поверхневого накопичення міцелію необхідним є великі площі приміщення і маса стелажів, що значно ускладнює процес як на стадіях підготовки, основного культивування та післяферментаційної обробки міцелію. Окрім того глибинне культивування на відміну від поверхневого піддається автоматизації процесів, що дає значну перевагу в стабільності такого виробництва. Друге що необхідно враховувати для вибору технології, це факт тривалого росту міцелію продуцентом. Відбувається накопичення хітозану грибом в стаціонарній фазі при оптимальній тривалості процесу близько 44 годин. Це виключає можливість безперервного вирощування грибкової культури, адже воно передбачає постійну підтримку культури в експоненційній фазі. Таким чином єдиним прийнятним варіантом є нарощування міцелію періодичним способом в ферментері. Для рівномірного розповсюдження ферментер має бути обладнаний паровою сорочкою для стерилізації та підтримки сталої температури в ході процесу. Окрім того для інтенсифікації масообмінних процесів в об'ємі поживного середовища і уникненню застійних зон необхідним є обирати ферментер з можливістю підводу до середовища культивування механічної енергії перемішування. Враховуючи об'єм ферментаційного середовища та те що тип міцеліальних клітин досить чутливий до зрізових зусиль адже є несептованим - необхідним є встановлення перемішуючого пристрою що буде запезпечувати низькі зрізові зусилля з декількома рівнями лопастей. Найбільш збалансованим є вибір мішалки з наклонними лопастями (рис.3.1).

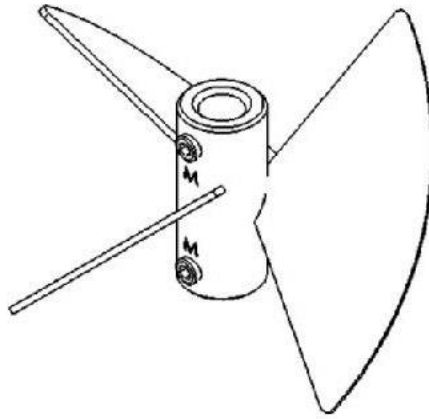


Рис. 3.1. Мішалка з наклонними лопастями [37].

Такі лопасті встановлюються під кутом 45° що одночасно створює осьовий та радіальний потік рідини в ферментері. Така комбінація забезпечує краще загальне перемішування та більш високу швидкість масопереносу поживних речовин та кисню порівняно з однонаправленими мішалками з осьовим потоком а також має значно менші зрізові зусилля порівняно з однонаправленими мішалками з радіальним потоком [96].

Передбачається встановлення декількох таких мішалок на осі перемішуючого пристрою для рівномірного розподілу речовин всередині всього об'єму вмісту ферментеру. Перемішування згідно технології описаної в статті для культивування *A. repens* CBS 102.32 передбачається за швидкості 350 об/хв.

Аерація

Відомо, що *A. repens* як і будь-який грибовий мікроорганізм має лише аеробний тип метаболізму і саме тому необхідним є постійне продування через весь об'єм культуральної рідини підготовленого стерильного повітря та подальший розподіл кисню всередині культуральної рідини за рахунок потоків створюваних перемішуючим пристроєм. Для штаму *A. repens* CBS 102.32 розглядається подача стерильного повітря зі швидкістю в 1 об'єм повітря на об'єм культуральної рідини за хвилину. Таким чином технологія повинна включати в себе підготовку аераційного повітря, куди входить стадії нормалізації термодинамічних показників повітря і подальше очищення від грубих часток та мікроорганізмів.

3.3. Обґрунтування стадій виділення і очищення субстанції для виробництва ЛЗ

Найбільш поширеним та прийнятним для екстракції хітозану з міцелію, є метод лужно-кислотної обробки. Відповідно до цього методу, гомогенізований міцелій необхідно депротейнізувати лугом, відділити луг-нерозчинну фракцію за допомогою кислоти та вирівняти рН до нейтрального для висадження хітозану в осад [58, 66, 67, 73, 80].

S. Chatterjee [67] проводив очищення за такою методикою: Міцелій автоклавувався при 121 °С протягом 15 хв після гомогенізації в блендері з 1Н NaOH. Луг-нерозчинна фракція ретельно промивалася водою, потім етанолом. Далі до нерозчинної фракції додавалася оцтова кислота і проводилося кип'ятіння зі зворотним холодильником протягом 24 годин при температурі 95 °С. Суспензія центрифугувалася при 12 000 об/хв протягом 45 хв при 4 °С. Хітозан осаджувався з супернатанту шляхом коригування рН до 8,5 за допомогою 1Н NaOH та промивався кілька разів водою.

O. Tasar [73] описував цей процес таким чином: Отримана біомаса збиралася на пластині, тричі промивалася дистильованою водою і висушувалася в термостаті при температурі 40 °С до постійної маси. Для видалення залишків білка, висушена біомаса оброблялася 0,5 М NaOH при 121 °С протягом 20 хв. Луг-нерозчинна фракція відокремлювалася від суміші центрифугуванням і тричі промивалася дистильованою водою. Фракція сушилася в термостаті при 40 °С до постійної маси. Отримана фракція оброблялася 0,1 Н молочною кислотою при кімнатній температурі протягом 30 хвилин для видалення фосфатів зі стінок клітин. Розчин центрифугувався, тверда фаза відокремлювалася і тричі промивалася дистильованою водою. Отриманий матеріал висушувався в термостаті при температурі 40 °С до постійної ваги. Після видалення фосфатів, фракція змішувалася з 0,1 Н молочною кислотою при кімнатній температурі. Нерозчинна фракція відокремлювалася центрифугуванням. Хітозан осаджувався з рідкої фази при рН 8-10 за допомогою 2 Н NaOH, та багато-разового промивання дистильованою водою до нейтрального рН. Екстрагований хітозан висушувався в термостаті при температурі 40 °С до постійної маси.

Davoust, N [80], у своїй роботі описав цей процес так: Проводилося осадження міцелію у культуральній рідині методом вистоювання, потім він відділявся за

допомогою вакуумної фільтрації. Міцелій гомогенізувався у блендері, далі проводилася депротейнізація за допомогою 1,0 М NaOH (У пропорції 1 маса міцелію до 3.33 мас NaOH) при 121 °С. Отримана суспензія фільтрувалася, та промивалася три рази 95% етанолом, та три рази дистильованою водою, далі висушувалася ліофілізацією. До отриманої фракції додавалася 2,0% оцтова кислота (У розрахунку 1 маса міцелію до 1,6 мас оцтової кислоти), суміш струшувалася до повного розчинення луг-нерозчинних-матеріалів. Здійснювалося нагрівання зразка до 100 °С протягом 17 годин. Отриманий екстракт центрифугувався, проводився збір супернатанту та відкидався осад, який містив луг-нерозчинну-фракцію. У отриманому супернатанті рН вирівнювався до 8,5 за допомогою NaOH до випадання хітозану в білий, у вигляді пластівців осад. Отриманий хітозан промивався 4 рази дистильованою водою і ліофілізувався.

Відповідно до вищенаведеної інформації, виділення та очищення хітозану можливо поділити на такі стадії:

1. Підготовка міцелію.
2. Видалення побічних речовин.
3. Виділення хітозану.

В свою чергу, підготовка міцелію складається з двох частин. Відділення від культуральної рідини та руйнування клітинних стінок.

Відділення міцелію, можливо проводити декількома методами:

- Фільтрування.

Метод розділення фаз за допомогою пористих перегородок, які мають властивості пропускати дисперсійне середовище та затримувати частинки, розміри яких перевищують діаметр пор перегородки.

Проте даний метод має велику кількість недоліків, наприклад:

- Низька швидкість процесу.
 - Недовговічність фільтрувальних елементів.
 - В тому числі, можливість їх руйнування при варіативності параметрів процесу.
- Центрифугування.

Процес розділення неоднорідних рідких середовищ за допомогою відцентрових сил.

Його основними перевагами є:

- Висока швидкість та ефективність процесу,
 - Дешевизна,
 - Простота технології, що зумовлює легке його обслуговування
- Декантація.

Процес розділення фракцій, за допомогою «зливання» рідкої фракції. У цьому випадку вона буде собою уявляти процес відкачування рідкої фракції з поверхні суміші, після її відстоювання. Недоліками є, як і довга тривалість процесу, так і неможливість розділення більш густих фракцій.

Для стадії руйнування клітинних стінок можливе використання таких методів:

- Ультразвукове руйнування.

Ультразвукове руйнування створює чергування хвиль високого і низького тиску, завдяки чому, проходить процес кавітації та руйнування клітин через різниці тисків внутрішнього та зовнішнього середовища.

Із недоліків такого методу є висока вартість обладнання та проблеми в масштабуванні для досягнення індустріальних обсягів.

- Хімічне руйнування.

Нейтральні солі, органічні сполуки, хелатні агенти, детергенти та ін речовини здатні пошкоджувати і за деяких умов руйнувати оболонки мікробних клітин. В основі даного методу лежать різні механізми порушення міжмолекулярного та хімічного зв'язку між структурними елементами клітинної стінки.

Проте даний метод потребує використання розхідних матеріалів, що тягне за собою підвищення вартості процесу. Також певні реактиви можуть проявляти негативний вплив на якість готового продукту, а їх залишкові кількості – на параметри подальшого процесу.

- Температурне руйнування.

Метод поперемінного заморожування-відтаювання, який руйнує клітинні стінки за допомогою різкої зміни контрастних температур.

Є досить дешевим та простим методом, проте має низьку ефективність, і тому вимагає довготривалого використання.

- Гомогенізація високим тиском.

Методи порушення цілісності клітини, які покладаються на застосування високого тиску для руйнування цілісності клітин.

Найбільш універсальний метод, для застосування необхідне спеціалізоване обладнання – гомогенізатор високого тиску. Обладнання подібного типу дозволяє постановлювати процес в лінію та автоматизувати його. Є відносно дешевим та володіє високою швидкістю та ефективністю.

Для очищення речовини, найбільш дослідженим, ефективним та дешевим методом є депротейнізація, подальше видалення фракцій, які не розчинилися у лузі, промивання розчинником та відділення залишків центрифугацією.

У додаток, цей метод дозволяє легко виділити розчинений в кислоті хітозан, так як він є нерозчинним при нейтральному та лужному рН, для цього достатньо провести корекцію рН та висушити отриманий осад.

Для очищення та виділення хітозану достатнє використання необхідної кількості реакторів, достатньої для вищезазначених операцій, вкупі з цим, необхідне використання НУТЧ-фільтру для тривіалізації та автоматизації процедури його промивання.

Для стадії сушіння продукту можливе застосування наступного обладнання:

- Камерна сушарка

Недоліками цього типу обладнання є низька ефективність сушіння та можливий вплив на показники якості продукту.

- Сублімаційна сушарка

Доволі дорогий та тривалий метод сушіння, проте його значними перевагами є можливість збереження першочергових фізико-хімічних властивостей продукту, так як і висока інтенсивність сушіння і можливість автоматизації процесу.

Для подрібнення ліофілізованого зразку пропонується використання дискового млина, його основними перевагами є відсутність високого рівня перегріву матеріалів та однорідність отриманого продукту.

Таким чином, виділення та очищення хітозану буде проводитися такими операціями:

1. Розділення культуральної рідини та міцелію за допомогою відстоювання та декантації.
2. Руйнування клітинної стінки методом гомогенізації.
3. Очищення хітозану за допомогою депротейнізації, промиванні у розчинниках, розчинення у лузі та відділення розчиненого хітозану центрифугуванням.
4. Сушіння у ліофільній сушарці та подрібнення.

У етапах очищення та виділення хітозану будуть використовуватися натрій гідроксид та оцтова кислота, тому додатковою стадією буде їх приготування в кількостях, необхідних для процесу.

При культивуванні *A. Repens* за умов, наведених у попередній частині роботи, по закінченню культивування були отримані такі результати: суха вага міцелію – 12,6 г на 1 л поживного середовища, враховуючи об'єм середовища у виробничій ферментації, наведеній в курсовій роботі, який складає 6,9 м³, виходячи з цього, маса отриманого міцелію з виробничого біосинтезу:

$$m_{\text{міц}} = 6900 \text{ л} * 12,6 \frac{\text{Г}}{\text{Л}} = 86940 \text{ г} = 86,94 \text{ кг}$$

Кількість необхідного 1М NaOH складає 3,33 мас лугу до 1 маси міцелію, тому маса лугу, необхідного для депротейнізації:

$$V_{\text{NaOH}} = 3,33 \frac{\text{Л}}{\text{КГ}} * 86,94 \text{ кг} = 289,51 \text{ л}$$

Кількість 2% оцтової кислоти, необхідної для розчинення луг-нерозчинної фракції складає 1,58 до 1, тому об'єм необхідний для очищення:

$$V_{\text{Оц к-та}} = 1,58 \frac{\text{Л}}{\text{КГ}} * 86,94 \text{ кг} = 137,37 \text{ л}$$

Вміст хітозану на 1 л поживного середовища складає 2,8 г/л, тому очікувана кількість хітозану складає:

$$m_{\text{хіт}} = 6900 \text{ л} * 2,8 \frac{\text{Г}}{\text{Л}} = 19320 \text{ г} = 19,32 \text{ кг}$$

Кількості води та етилового спирту, які використовувалися для промивання суспензії встановили, як 1 об'єм промивної суміші до 1 маси міцелію [13], тобто їх кількість для одного циклу промивання становитиме 86,94 л. У випадку можливих

неточностей у чистоті/об'ємах/можливих втратах використовуваних речовин, розрахуємо необхідні кількості з приблизною поправкою в 5%, для отримання 90 л речовини для одного циклу промивання.

$$m_{\text{заг}} = 90 \text{ л} * 3 \text{ цикли} = 270 \text{ л}$$

Що приводить нас до необхідності підготовки 270 л етилового спирту для операцій промивання.

3.4. Обґрунтування вибору класів чистоти виробничих приміщень (підготовка персоналу, дезінфікуючих засобів, вентиляційного повітря).

Відповідно до ДФУ, очні лікарські препарати — стерильні рідкі, м'які або тверді ЛЗ, призначені для нанесення на очне яблуко і/або кон'юнктиву чи для введення до кон'юнктивального мішка. До таких препаратів належать краплі, примочки, порошки для приготування очних крапель і примочок, м'які ЛЗ та вставки [103].

Зони чистих приміщень, а також клас приміщення по GMP визначаються виходячи з технологічних циклів виробництва в цих приміщеннях.

У зв'язку з масою економічних і технічних факторів розрізняють зони чистих приміщень з різною класифікацією чистоти. Іншими словами, зону з високим класом чистоти оточують ті зони, в яких рівень чистоти нижчий. Це дає можливість найбільш ефективно організувати зону розташування технологічного ядра. Однак, не варто забувати про постійний потік матеріалів і персоналу, які суттєво збільшують ризики забруднення. У зв'язку з цим наполегливо рекомендуємо приділити увагу детальному плануванню і організації потоків персоналу.

Класифікація чистих приміщень і їх характеристика

Класифікація чистих приміщень визначається за рівнем максимально допустимих частинок і життєздатних організмів у повітрі на 1 м.куб. Розрізняють чотири основні класи:

Клас А. Кількість допустимих часток не більше 3 500, а життєздатних організмів - 1 на метр квадратний.

Клас В. Допустимі частки аналогічні класу А, а організмів - не більше 10.

Клас С. Рівень допустимих частинок - 350000, а життєздатних організмів - 100.

Клас D. Кількість частинок - 3500000, а організмів не більше 500.

Варто зазначити, що контакт з не стерильними матеріалами можливий лише в приміщеннях класів С і D.

З метою своєчасної очистки приміщень від забруднень, що вносяться з менш чистих зон рекомендується:

1. Регулярно підтримувати більш високий тиск в чистій зоні приміщення, ніж в поряд розташованих.
2. Повітряний потік по швидкості там де знаходяться межі зон повинен бути значно вище. А ось зворотний рух повітря істотно збільшує ризик забруднення.

Альтернативним варіантом можна використовувати спеціальний непроникний бар'єр [104].

За вимогами виробництва стерильних препаратів, виникає необхідність використання класу чистоти А в зонах безпосереднього наповнення ЛЗ.

Відповідно до вимог до проектування та специфічних вимог GMP до чистих приміщень, також необхідна наявність класів чистоти В, які відповідають вищим класам чистоти, у цьому випадку це буде приміщення наповнення флаконів з очними краплями.

Вхід в клас чистоти В буде відбуватися через 2 прохідних приміщення – приміщення переходу С/В та приміщення переходу D/С.

Приготування буде відбуватися у виробничому приміщенні класу С, вхід в який буде відбуватися через перехідне приміщення D/С. В приміщенні приготування також буде знаходитися приміщення зважування та фасування, де АФІ та допоміжні речовини під ламінаром класу В будуть підготовлюватися до приготування препарату.

Приміщення переходу найменших класів буде виходити в коридор зони чистоти класу D, в якому будуть знаходитися приміщення підготовки матеріалів(запакованих), приміщення підготовки та мийки обладнання, повітряні шлюзи та стерилізатори для передачі матеріалів та обладнання в приміщення класів В та С.

До приготування диз. розчинів, які будуть використовуватися у підготовці обладнання та приміщень класів чистоти С та В також висуваються суворі умови по класам чистоти приміщень. Для цього буде використовуватися окреме приміщення

класу С, вхід в яке буде відбуватися через перехідне приміщення D/C та перехідне приміщення D/K. В приміщенні приготування також буде знаходитися приміщення зважування, де буде відбуватися відважування порошків та концентрованих розчинів миючих засобів для приготування.

Належне виробництво лікарських засобів залежить від людей. Тому необхідний персонал, який має достатню кваліфікацію для виконання всіх завдань, що знаходяться у сфері відповідальності виробника. Кожен співробітник повинен чітко розуміти індивідуальну відповідальність, яка має бути документована. Весь персонал повинен знати принципи належної виробничої практики, що стосуються його діяльності, а також пройти первинне і подальше навчання відповідно до його обов'язків, включаючи інструктаж з виконання гігієнічних вимог.

До виробництва стерильної продукції, GMP висуває особливі умови по підготовці виробничого персоналу, у чистих зонах повинна бути присутня тільки мінімальна кількість персоналу, який повинен бути одягненим у відповідний для чистих приміщень одяг. Персонал чистих приміщень повинен проходити щорічний медичний огляд, а також знати та дотримуватися гігієнічних вимог.

Для входу в класи чистоти В та С, необхідна наявність спеціального боксового одягу, який повністю запобігає контакту персоналу з навколишнім середовищем. Для знаходження в перехідних приміщеннях класів С/В, D/C необхідне використання так званої «спідньої білизни».

Знаходження в класах чистоти D повинно відбуватися у відмінних від некласифікованих костюмах, основними вимогами до яких є мінімізація ризику контамінації великими механічними частками.

Як зазначено вище, відповідно до GMP, для асептичного виробництва, до класифікованих приміщень висуваються жорсткі вимоги по можливих кількостях часток діаметрів 5 мкм. та 0.5 мкм., які можуть знаходитися в приміщенні.

Для досягнення бажаного результату необхідне використання HEPA (High-efficiency particulate absorbing) та ULPA (Ultra-low particulate air) фільтрів, які забезпечують відфільтровування 99.95 – 99.975 % та 99.9995 – 99.9999 % часток відповідно, залежно від класу фільтру.

У більшості випадків, достатнє використання фільтрів класу H11, які забезпечують затримання 95 % часток до 0.5 мкм, проте для асептичних процесів рекомендується використання фільтрів H13 (99.95 – 99.75 % затримуваних часток), та U15 для використання в ламінарних зонах (99.9995 – 99.9975 % затримуваних часток).

Для грубої фільтрації, для подовження терміну життя основних фільтрів, рекомендується використання фільтрів H10 (85 % затримуваних часток).

3.5. Обґрунтування вибору підготовки первинної упаковки.

Важливим фактором у виробництві готового лікарського засобу є первинної упаковки, так, як вона входить в безпосередній контакт з продуктом. Таке пакування має декілька вимог до матеріалу та форми, в якій воно виконується, відповідно до вимог GMP для виробництва ЛЗ:

Пакування повинне забезпечувати належний захист від псування або забруднення проміжного продукту або готового лікарського засобу, які можуть виникнути під час транспортування та рекомендованого зберігання. Таке пакування не повинно бути реакційноздатними, адитивними або адсорбуючим по відношенню до продукту [104].

Наразі, для асептичного виробництва очних крапель найбільш промініментним є використання методу BFS (Blow Fill Seal), який мінімізує взаємодію з первинним пакуванням препарату завдяки його формуванню безпосередньо перед наповненням з пластику фармацевтичної якості та в асептичній зоні наповнення, завдяки чому вдається мінімізувати можливі чинники контамінації стерильного препарату.

3.6. Обґрунтування вибору підготовки води.

Вода є одним з основних продуктів, що використовуються фармацевтичною промисловістю. Вона може бути присутньою як допоміжна речовина, або використовуватися для підготовки препаратів до застосування, в процесі синтезу, у ході виробництва готової продукції або як очищувальний засіб для промивання ємностей (резервуарів), обладнання, первинних пакувальних матеріалів тощо.

Залежно від цілей використання у фармації потрібна вода різних рівнів якості. Контроль якості води, зокрема її мікробіологічної чистоти, є важливим аспектом, і фармацевтична промисловість виділяє значні ресурси для розробки та технічного обслуговування систем очистки води [105].

У Європейській Фармакопеї та Державній Фармакопеї України містяться вимоги до таких категорій води:

- Вода для ін'єкцій (Water for Injections)
- Вода очищена (Purified Water)
- Вода високоочищена (Highly Purified Water)

Вода для ін'єкцій – це вода для виготовлення ліків для парентерального введення, якщо вода застосовується як носій (вода для ін'єкцій «in bulk») та для розчинення або розведення субстанцій чи препаратів для парентерального введення перед застосуванням (вода для ін'єкцій стерильна). Воду для ін'єкцій «in bulk» отримують з води очищеної шляхом дистиляції у апараті, деталі якого (ті, що контактують з водою) виготовлені з нейтрального скла, кварцу або підходячого металу, та який оснащений ефективним пристроєм для запобігання захвату крапель.

Вода для ін'єкцій має витримувати випробування для води очищеної, а також відповідати додатковим вимогам щодо бактеріальних ендотоксинів (не більше 0,25 МО у 1 мл), питомої електропровідності та вмісту загального органічного вуглецю.

Вода очищена – це вода для виготовлення лікарських препаратів, при виробництві яких до води не висувають вимоги щодо стерильності та/або апірогенності. Воду очищену отримують шляхом дистиляції, іонного обміну або іншим підходящим способом з води, що відповідає вимогам затверджених компетентним уповноваженим органом нормативних документів стосовно якості води, призначеної для споживання людиною.

Вода – допоміжна речовина, що найбільш часто використовується у складі лікарських препаратів; мінімальний рівень якості обраної води залежить від призначення препарату. У таблиці узагальнено основні категорії стерильних препаратів. Вода для ін'єкцій потрібна для виготовлення тих препаратів, що призначені для парентерального введення; до таких препаратів належать розчини для гемофільтрації та гемодіафільтрації, а також для перитонеального діалізу.

У фармацевтичній промисловості для зручності часто використовується вода для ін'єкцій для приготування офтальмологічних, стерильних назальних/вушних препаратів та препаратів для наскірного застосування. У таких випадках корисною

альтернативою є вода високоочищена при наявності додаткової переваги – задоволення потреб промисловості у великих обсягах.

Стерильні лікарські засоби	Мінімальна прийнятна якість води
Парентеральні	Вода для ін'єкцій
Очні	Вода очищена
Розчини для гемофільтрації та розчини для гемодіафільтрації	Вода для ін'єкцій
Розчини для перитонеального діалізу	Вода для ін'єкцій
Розчини для зрошення	Вода для ін'єкцій
Назальні/вушні препарати	Вода очищена
Нашкірні препарати	Вода очищена

Виходячи з цього, допустимим є використання води очищеної, проте для мінімізації можливих чинників контамінації та покращення показників якості препарату, рекомендується використання води для ін'єкцій

3.7. Вибір технологічних стадій та операцій обладнання.

Посилаючись на інформацію, наведену вище, можливо виділити чотири основні стадії приготування хітозано-вмісного готового лікарського засобу:

1. Підготовка виробництва (буде включати в себе всі операції, необхідні для приведення обладнання, персоналу та приміщень в стан «Готово до роботи».
2. Приготування проміжного продукту (буде включати в себе всі операції, які необхідні для отримання розчину готового до подальшого наповнення).
3. Стерилізуюча фільтрація, наповнення у флакони та запаювання.
4. Пакування готового лікарського засобу.

Підготовка виробництва у свою чергу буде складатися з таких операцій – підготовка виробничого повітря, підготовка виробничої води, підготовка миючих засобів, підготовка виробничого персоналу та підготовка виробничих приміщень та обладнання, при цьому підготовка води буде відбуватися в автоматичному режимі в некласифікованому приміщенні, миючі засоби будуть відважуватися та готуватися у приміщенні класу С. Для підготовки виробничого персоналу необхідно простерилізувати та запакувати один комплект одягу класу D,

Для приготування проміжного продукту лікарського засобу виділяється дві операції – відважування наважок, пакування в поліетиленові пакети та ідентифікація етикетками під ламінаром та безпосередньо операція приготування проміжного розчину у реакторі. Обидві операції будуть проводитися у виробничих приміщеннях класу С.

Стадія стерилізуючої фільтрації, наповнення у флакони та запаювання буде проводитися у дві операції, перша операція включає наповнення та запайку флаконів на машині наповнення технології BFS, ламінар машини наповнення буде забезпечувати асептичні умови класу чистоти А. По завершенню операції, проміжний продукт в флаконах передається на склад зберігання проміжної продукції, де він зберігається до отримання позитивних результатів контролю

Після отримання позитивних результатів контролю, проміжний продукт у флаконах пакується на дільниці пакування у вторинне пакування та маркується. По закінченню операції готовий лікарський засіб передається на карантинний склад і сертифікується.

РОЗДІЛ 4. Опис технологічного процесу виробничого біосинтезу та виділення та очищення продукту культивування

4.1. Специфікація обладнання ділянки

Специфікація обладнання, зображеного на апаратурній схемі (див. *графічна частина*), наведена у табл. 4.1

Таблиця 4.1

Специфікація ділянки допоміжних робіт, виробничого культивування та виділення та очищення продукту культивування *Absidia repens* CBS 102.32

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
1	2	3	4
ПЗ - 1	Повітрозабірник	1	Повітрозабірник з металевою сіткою для видалення механічних забруднень
Ф - 2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтр, з замінними частинами з поліефірної синтетичної тканини. Фільтруюча здатність – 80 %. https://air-klimat.prom.ua/p203201321-filtr-karmannyj-gruboj.html
К - 3	Компресор	1	Компресор. Продуктивність – 205 літрів за хвилину. Верхня межа тиску стиснутого повітря – 12 МПа. Виробник: ТОВ «ДАЛГАКИРАН УКРАЇНА» https://dalgakiran.ua/store/product/Odnostupenchatyj
Т - 4 Т - 6	Теплообмінник	2	Мідно-алюмінієвий теплообмінник з краплевловлювачем. Теплоносії – пара/вода. Мас встановлені три ряди алюмінієвих ламелей товщиною в 0,2 мм і кроком 2,5 мм. Виробник ТОВ «ОЛЛТАН ПЛЮС», Україна https://alltan.com.ua/p2090292-teploobmennik-vodyanoj.html
Р - 5	Ресивер	1	Ресивер стиснутого повітря вертикальний РВ 500.15, вмістимість - 0,5 м ³ , робочий тиск – 15 Мпа, робоче середовище – вологе повітря, діапазон витримуємих температур – від 0 до + 45°С. Виробник: « REMEZA», https://fiac-ua.com/ Білорусь
Ф - 7	Головний фільтр	1	Фільтр тонкої очистки повітря. Діапазон температури – від -20 до 120°С. Затримка часток – 5-50 мкм. Критерій очищення = 99,98% Виробник: Donaldson Company, Inc, США https://www.donaldson.com/en-be

					НУХТ БТЕК 02.02.09 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Магусевич Д.С.			РОЗДІЛ 4. Опис технологічного процесу виробничого біосинтезу та виділення та очищення продукту культивування	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Тетеріна С.М.					70	115
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

P-8	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації композиції солей для всіх технологічних стадій	1	Об'єм реактору – 1 м ³ . Реактор з нержавіючої сталі 12X18H10T. Апарат з еліптичним днищем та кришкою і приварною сорочкою. Умовний тиск 1,6 МПа. Виробник: ТОВ «ГК ЕВРОХІММАШ К.О.» (Україна) http://euromash.kiev.ua/ua/aparati_perem_ustroystvo_m_ua.php
Д-9, Д-12, Д-15, Д-18, Д-21, Д-37, Д-40, Д-43	Об'ємно-ваговий дозатор	8	Напівавтоматичний дозатор серії FlexW15S. Покриття в контакт з продуктом виконано з нержавіючої сталі AISI 304 / AISI 316. Набір змінних частин дозволяє виконувати зважування від 0,001 кг до 50 кг. Похибка дозування до ± 1,5 %. Виконаний на замовлення. https://flexmash.com/uk/dozatori/
Н-10, Н-13, Н-16, Н-19, Н-22, Н-25, Н-28, Н-31, Н-34, Н-39, Н-42, Н-47, Н-54	Відцентровий насос	13	Насос без сальників серії DB з магнітним приводом (неодимові магніти). Конструкція з PVDF. Здатність до роботи в режимі «сухого ходу» тривалий час без пошкодження. Герметична конструкція. Продуктивність насосу – до 43 м ³ /год. В'язкість перекачуваних розчинів – до 150 сПз. Максимальна температура перекачуваних розчинів: +104 °С. Тиск – до 6,2 МПа. Виробник: ASCO Pompe, Італія. https://ascopumps.com.ua/ua/
P-11	Реактор-змішувач для приготування композиції А для інокулятора	1	Об'єм реактору – 0,05 м ³ . Реактор з нержавіючої сталі 12X18H10T. Апарат з еліптичним днищем та кришкою і приварною сорочкою. Умовний тиск 1,6 МПа. Виробник: ТОВ «ГК ЕВРОХІММАШ К.О.» (Україна). http://euromash.kiev.ua/ua/aparati_perem_ustroystvo_m_ua.php
P-14	Реактор-змішувач для приготування композиції А для посівного апарату	1	Об'єм реактору – 0,25 м ³ . Реактор з нержавіючої сталі 12X18H10T. Апарат з еліптичним днищем та кришкою і приварною сорочкою. Умовний тиск 1,6 МПа. Виробник: ТОВ «ГК ЕВРОХІММАШ К.О.» (Україна). http://euromash.kiev.ua/ua/aparati_perem_ustroystvo_m_ua.php
P-17	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації композиції А для ферментеру	1	Об'єм реактору – 2 м ³ . Реактор з нержавіючої сталі 12X18H10T. Апарат з еліптичним днищем та кришкою і приварною сорочкою. Умовний тиск 1,6 МПа. Виробник: ТОВ «ГК ЕВРОХІММАШ К.О.» (Україна) http://euromash.kiev.ua/ua/aparati_perem_ustroystvo_m_ua.php
P-20	Реактор-змішувач для приготування композиції Б для ферментеру	1	Об'єм реактору – 8 м ³ . Реактор з нержавіючої сталі 12X18H10T. Апарат з еліптичним днищем та кришкою і приварною сорочкою. Умовний тиск 1,6 МПа. Виробник: ТОВ «ГК ЕВРОХІММАШ К.О.» (Україна) http://euromash.kiev.ua/ua/aparati_perem_ustroystvo_m_ua.php
Ф-23, Ф-26, Ф-29, Ф-33	Індивідуальний повітряний фільтр	4	Фільтр тонкої очистки повітря з боросилікатного скловолокна. Захисний корпус з нержавіючої сталі 1.4301 / 304. Критерій очищення = 99,99999%. Виробник: Donaldson Company, Inc, США. https://www.donaldson.com/en-be

ФР-24	Інокулятор	1	<p>Ферментер серії Pilot. Загальний об'єм ферментеру - 15 л. Виробництво під замовлення. Максимальна швидкість мішалки з магнітною муфтою – 320 об/хв. Кільцевий розріджувач для аерації з максимальною пропускною здатністю до 2 об'ємів повітря за хвилину. Має систему автоматичного регулювання тиску, температури, подачі повітря, значення рН, та інші підсистеми. Співвідношення Висота/Діаметр – 3,0. Матеріал поверхонь що контактують з продуктом - 316L SS ((шорсткість поверхні $Ra \leq 0,63$ мкм). Матеріал всіх інших поверхонь - 304 SS (шорсткість поверхні $Ra \leq 0,80$ мкм). Має прицільне скло на бічній стінці. Нижній клапан асептичного резервуара. Портове з'єднання: Tri-Clamp, Ingold. Шафа управління з нержавіючої сталі (Rittal, Німеччина) з вбудованим PLC Siemens та сенсорною панеллю Weintek. Корпус ферментера має ізольовану сорочку (утеплювач - мінеральна вата), товщина варіюється від 50 до 100 мм. Ізоляція покрита нержавіючою сталлю (AISI 304). Виробник: Biotehniskais, Латвія. https://www.bioreactors.net/pilot-scale-bioreactor</p>
ФР-27	Інокулятор	1	<p>Ферментер серії Pilot¹⁰. Загальний об'єм ферментеру – 150 л. Виробництво під замовлення. Максимальна швидкість мішалки з магнітною муфтою – 320 об/хв. Кільцевий розріджувач для аерації з максимальною пропускною здатністю до 2 об'ємів повітря за хвилину. Має систему автоматичного регулювання тиску, температури, подачі повітря, значення рН, та інші підсистеми. Співвідношення Висота/Діаметр – 3,0. Матеріал поверхонь що контактують з продуктом - 316L SS ((шорсткість поверхні $Ra \leq 0,63$ мкм). Матеріал всіх інших поверхонь - 304 SS (шорсткість поверхні $Ra \leq 0,80$ мкм). Має прицільне скло на бічній стінці. Нижній клапан асептичного резервуара. Портове з'єднання: Tri-Clamp, Ingold. Електричний механізм підйому люку. Шафа управління з нержавіючої сталі (Rittal, Німеччина) з вбудованим PLC Siemens та сенсорною панеллю Weintek. Підключення Profinet до локальної мережі або глобальної мережі. Корпус ферментера має ізольовану сорочку (утеплювач - мінеральна вата), товщина варіюється від 50 до 100 мм. Ізоляція покрита нержавіючою сталлю (AISI 304). Виробник: Biotehniskais, Латвія. https://www.bioreactors.net/pilot-scale-bioreactor</p>

ФР-30	Посівний апарат	1	<p>Ферментер серії Pilot¹⁰. Загальний об'єм ферментеру – 1,5 м³. Виробництво під замовлення. Максимальна швидкість мішалки з магнітною муфтою – 320 об/хв. Кільцевий розріджувач для аерації з максимальною пропускною здатністю до 2 об'ємів повітря за хвилину. Має систему автоматичного регулювання тиску, температури, подачі повітря, значення рН, та інші підсистеми. Співвідношення Висота/Діаметр – 3,0. Матеріал поверхонь що контактують з продуктом - 316L SS ((шорсткість поверхні Ra ≤ 0,63 мкм). Матеріал всіх інших поверхонь - 304 SS (шорсткість поверхні Ra ≤ 0,80 мкм). Має прицільне скло на бічній стінці. Нижній клапан асептичного резервуара. Портове з'єднання: Tri-Clamp, Ingold. Електричний механізм підйому люку. Шафа управління з нержавіючої сталі (Rittal, Німеччина) з вбудованим PLC Siemens та сенсорною панеллю Weintek. Підключення Profinet до локальної мережі або глобальної мережі. Корпус ферментера має ізольовану сорочку (утеплювач - мінеральна вата), товщина варіюється від 50 до 100 мм. Ізоляція покрита нержавіючою сталлю (AISI 304). Виробник: Biotehniskais, Латвія. https://www.bioreactors.net/pilot-scale-bioreactor</p>
ФР-32	Ферментер	1	<p>Ферментер серії Pilot¹⁰. Загальний об'єм ферментеру - 12 м³. Виробництво під замовлення. Максимальна швидкість мішалки з магнітною муфтою – 320 об/хв. Кільцевий розріджувач для аерації з максимальною пропускною здатністю до 2 об'ємів повітря за хвилину. Має систему автоматичного регулювання тиску, температури, подачі повітря, значення рН, та інші підсистеми. Співвідношення Висота/Діаметр – 3,0. Матеріал поверхонь що контактують з продуктом - 316L SS ((шорсткість поверхні Ra ≤ 0,63 мкм). Матеріал всіх інших поверхонь - 304 SS (шорсткість поверхні Ra ≤ 0,80 мкм). Має прицільне скло на бічній стінці. Нижній клапан асептичного резервуара. Портове з'єднання: Tri-Clamp, Ingold. Електричний механізм підйому люку. Корпус ферментера має ізольовану сорочку (утеплювач - мінеральна вата), товщина варіюється від 50 до 100 мм. Ізоляція покрита нержавіючою сталлю (AISI 304). Виробник: Biotehniskais, Латвія. https://www.bioreactors.net/pilot-scale-bioreactor</p>
Р-34	Реактор-змішувач для приготування титрувального агенту кислоти для ферментера	1	<p>Об'єм реактору – 0,012 м³. Реактор з нержавіючої сталі 12X18Н10Т. Апарат з еліптичним днищем та кришкою. Виробник: ТОВ «ГК ЕВРОХІММАШ К.О.» (Україна). http://euromash.kiev.ua/ua/aparati_perem_ustroystvo_m_ua.php</p>

P-35	Реактор-змішувач для приготування титрувального агенту луку для ферментера	1	Об'єм реактору – 0,012 м3. Реактор з нержавіючої сталі 12X18Н10Т. Апарат з еліптичним днищем та кришкою і приварною сорочкою. Умовний тиск 1,6 МПа. Виробник: ТОВ «ГК ЕВРОХІММАШ К.О.» (Україна). http://euromash.kiev.ua/ua/aparati_perem_ustroystvo_m_ua.php
Ф-36	НУТЧ-фільтр	1	Фільтр сталевий емальований під розрідженням. Модель НСЕ 0,4-1-12-01. Продуктивність - 0,8 м3/год Виробник ТОВ «ГК ЕВРОХІММАШ К.О.» (Україна). http://euromash.kiev.ua/ua/nutch_filtr_ua.php
P-38	Реактор-змішувач для приготування депротейнізуючого агенту	1	Об'єм реактору – 0,5 м3. Реактор з нержавіючої сталі 12X18Н10Т. Умовний тиск 1,6 МПа. Виробник: ТОВ «ГК ЕВРОХІММАШ К.О.» (Україна) http://euromash.kiev.ua/ua/aparati_perem_ustroystvo_m_ua.php
P-41	Реактор-змішувач для приготування оцтової кислоти	1	Об'єм реактору – 0,25 м3. Реактор з нержавіючої сталі 12X18Н10Т. Умовний тиск 1,6 МПа. Виробник: ТОВ «ГК ЕВРОХІММАШ К.О.» (Україна) http://euromash.kiev.ua/ua/aparati_perem_ustroystvo_m_ua.php
Є-44	Ємність для етилового спирту	1	Об'єм ємності – 0,5 м3. Ємність з нержавіючої сталі SS316L. Герметична ємність для зберігання легкозаймистих сумішей. Умовний тиск 1,6 МПа. Виробник: Wenzhou Leno Machinery Co.,ltd, Китай https://www.lenotank.com/stainless-steel-tank/
Н-45	Кулачковий насос	1	Кулачковий насос, моделі Valisi Конструкція з PVDF. Здатність до роботи в режимі «сухого ходу» тривалий час без пошкодження. Герметична конструкція. Продуктивність насосу – до 50 м3/год. В'язкість перекачуваних розчинів – до 250 сПз. Тиск – до 10 МПа. Виробник: ASCO Pompe, Італія. https://ascopumps.com.ua/ua/
P-46	Реактор для утримання культуральної рідини	1	Об'єм реактору – 9 м3. Реактор з нержавіючої сталі 12X18Н10Т. Реактор з декантером. Умовний тиск 1,6 МПа. Виконаний на замовлення. Виробник: ТОВ «ГК ЕВРОХІММАШ К.О.» (Україна) http://euromash.kiev.ua/ua/aparati_perem_ustroystvo_m_ua.php
Н-47, Н-50, Н-52, Н-56	Шламний насос для густих сумішей	4	Відцентровий шламовий насос, для перекачування сумішей з високою в'язкістю. Герметична конструкція. Продуктивність насосу – до 45 м3/год. Максимальна температура перекачуваних розчинів: +125 °С. Тиск – до 8 МПа. Виробник EDDY Pump Corporation, Америка. https://eddyump.com/products/2-inch-slurry-pump/
Ц-48	Центрифуга	1	Центрифуга інерційна. Індустріальна центрифуга Gea. Швидкість роботи – 50л/хв, максимальна робоча температура 130°С. https://www.gea.com/en/index.jsp

ГФ-49	Гомогенізатор високого тиску	1	Виробничий гомогенізатор моделі DeBEE 2000-25-120. Максимальний робочий тиск - 1,333 бар. Робочий об'єм – 100 л/хв Виробник BEE International, Америка. https://www.beei.com/high-pressure-homogenizer-products/pilot-plant-homogenizers/debee-2000
Р-51	Реактор-змішувач для депротейнізації та очищення продукту	1	Об'єм реактору – 0,5 м3. Реактор з нержавіючої сталі 12Х18Н10Т. Апарат з приварною сорочкою. Умовний тиск 1,6 МПа. Виробник: ТОВ «ГК ЕВРОХИММАШ К.О.» (Україна) http://euromash.kiev.ua/ua/aparati_perem_ustroystvo_m_ua.php
Ц-53	Центрифуга	1	Індустріальна центрифуга моделі Clarifying Decanter drymaster. Робочий об'єм – 100 л, максимальна робоча температура 130°C. https://www.gea.com/en/index.jsp
Р-55	Реактор-змішувач для висадження продукту	1	Об'єм реактору – 0,1 м3. Реактор з нержавіючої сталі 12Х18Н10Т. Апарат з еліптичним днищем та кришкою і приварною сорочкою, обладнаний рН-метром та ємністю для титранта. Умовний тиск 1,6 МПа. Виконаний на замовлення. Виробник: ТОВ «ГК ЕВРОХИММАШ К.О.» (Україна) http://euromash.kiev.ua/ua/aparati_perem_ustroystvo_m_ua.php
Ц-57	Центрифуга	1	Індустріальна центрифуга моделі Clarifying Decanter drymaster. Робочий об'єм – 100 л, максимальна робоча температура 130°C. https://www.gea.com/en/index.jsp
СС-58	Сублімаційна сушарка	1	Ліофільна сушарка моделі FD-50. Вхідний об'єм сировини – 50 кг. Температура конденсатора - -45°C, температура полок – -35°C до +60°C, максимальний вакуум – 10 Па. Виробник Kemolo, Китай. https://www.liofilizador.com/products/list-small-freeze-dryer-en.html
Д-59	Дисковий млин	1	Дисковий млин моделі 247-24. Об'єм завантаження – 30 кг. Розмір часток на виході – 100 мкм. Виробник: ANDRITZ, Австрія. https://www.andritz.com/products-en/group/feed-biofuel/disc-mill-feed-and-biofuel
Ф-60	Фасувальний автомат	1	Механічний фасувальний автомат з ваговим дозатором. Модель АФ-45-В1. Продуктивність – 600 уп/год. Обсяг бункера – 60 кг. Об'єм фасування – 0,5 - 10 кг. Виробник: ТОВ «Пакувальні технології», Україна. https://packtech.com.ua/uk/obladnannya/fasuvalne/avtomaty-seriyi-podushka/avtomaty-mekhanichni/af-45-v
П-61	Палети пластикові	1	Пластиковий піддон Р4 полегшений. Розмірності - 600x400 мм. Допустиме динамічне навантаження – 300 кг. Постачальник: СкладПлюс, Україна. https://sklad-plus.com.ua/ua/plastikovye-palenty/plastikovyi-poddon-r4-oblegchennyj-600h400-mm/

4.2. Опис технологічної схеми виробничого біосинтезу.

Технологічна схема біосинтезу хітозану штамом *A. repens* CBS 102.32 представлено в графічній частині курсового проекту на 1 аркуші формату А1.

Технологічна схема включає в себе допоміжні роботи (підготовка аераційного повітря, підготовка титрувальних агентів, приготування та стерилізація поживного середовища для різних стадій культивування), а також технологічний процес (культивування в колбах на качалці, інокуляторах на 15, 150 л та 1,5 м³, а також виробниче культивування в ферментері об'ємом 12 м³).

ДР 1. Підготовка аераційного повітря

ДР 1.1 Забір атмосферного повітря

Забір атмосферного повітря через повітрозабірник (ПЗ-1) на висоті 15 м, з мінімальним вмістом пилових часток і мікроорганізмів та передача на наступну стадію фільтрування.

ДР 1.2 Груба очистка повітря

Подача повітря на фільтр (Ф-2), з затримуючою здатністю 80 %, для очистки від пилу та механічних часток.

ДР 1.3 Компресування повітря

Стиснення повітря в системі до тиску - 0,4 МПа компресором (К-3).

ДР 1.4 Охолодження повітря та зменшення надлишкової вологості.

Охолодження повітря до 20 °С у теплообміннику (Т-4), з подальшим зріджуванням крапель вологи і її затримки в ресивері (Р-5). Вологість після ресивера має бути не більше 60 %.

ДР 1.5 Нагрівання повітря

Нагрів охолодженого повітря до температури 30 °С в теплообміннику (Т-6).

ДР 1.6 Очищення повітря в головному фільтрі

Тонке фільтрування повітря (Ф-8) до ступеню очистки $E = 95$ %.

ДР 1.7 Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

Очищення повітря від 99,99998 % часток в повітрі перед входом в інокулятори (ФР-24, ФР-27), посівний апарат (ФР-30) та ферментер (ФР-32) на індивідуальних фільтрах (Ф-23, Ф-26, Ф-29 та Ф-32).

ДР 2. Підготовка розчинів титрувальних агентів

ДР 2.1. Приготування 6%-го розчину HCl

У першу колбу об'ємом 2 літрів вносять 0,98 л води та розчиняють в них 0,19 л концентрованого розчину HCl (36%). Одержаний розчин передають на стадію ДР 3.2.

У ректор-змішувач (Р-34) вносять 9,4 л води та розчиняють в них 1,88 л концентрованого розчину HCl (36%). Одержаний розчин за допомогою надлишкового тиску передають на стадію ДР 3.7.

ДР 2.2. Підготовка 2 М розчину NaOH

У першу колбу об'ємом 2 літрів вносять 1,1 л води та розчиняють в них 93,6 г порошку NaOH. Розчин перемішують магнітною мішалкою до повного розчинення лугу. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°C упродовж 40-60 хв, під тиском 0,15-0,2 МПа. Після стерилізації розчин передають на стадії ТП 4.4, ТП 4.5, ТП 4.6.

У реактор-змішувач (Р-35) вносять 11,28 л води, зважують та додають 225,6 г NaOH. Вмикають перемішування на швидкості – 100 об/хв для повного розчинення компонентів. Для стерилізації вмикають подачу пару в сорочку та всередину реактора до встановлення температури 131°C та тиску 0,15-0,2 МПа. По досягненню необхідних параметрів стерилізації підтримують їх на заданому рівні упродовж 40-60 хв. Стерильний розчин за допомогою надлишкового тиску передають на стадію ТП 5.

ДР 3. Приготування та стерилізація поживного середовища

ДР 3.1. Приготування та стерилізація запасного розчину солей

Для приготування запасного розчину солей для стадії підготовки посівного матеріалу на технічних вагах у колбу 250 мл зважують 1,419 г семиводного сульфату цинку, 0,236 г одноводного сульфату марганцю та 0,315 г п'ятиводного сульфату міді та відміряють мірним циліндром 121 мл дистильованої води.

Для приготування запасного розчину солей для стадії виробничого біосинтезу у колбу 2л зважують 12,42 г семиводного сульфату цинку, 2,07 г одноводного сульфату марганцю та 2,76 г п'ятиводного сульфату міді та відміряють мірним циліндром 1084 мл дистильованої води. Перемішують розчини магнітними мішалками до повного розчинення солей. Закупорюють підготовлені розчини ватно-

марлевими пробками та передають на стерилізацію до автоклаву при 131°C впродовж 40-60 хв. Колби з одержаними розчинами зберігають в сухому місці без доступу світла. Перед технологічними стадіями відбирають відповідну розраховану в п. 2.3 кількість запасного розчину з першої або другої колби на стадію підготовки посівного матеріалу і виробничого біосинтезу відповідно.

ДР 3.2. Приготування та стерилізація композиції солей для стадій культивування в інокуляторах та посівному апараті

В реактор-змішувач (Р-8) об'ємом 1 м³, об'ємно-ваговим дозатором (Д-9) відвантажують 8,67 кг двозаміщеного сульфату амонію, 2,36 кг дигідроортофосфату калію, 0,95 кг семиводного сульфату магнію, 1,02 кг хелату залізо-етилендіамінтетраоцтової кислоти. Компоненти розчиняються в 571 л води. Включають перемішувач до повного розчинення солей. Мірним циліндром відміряють 1,16 л 6%-го розчину HCl з стадії ДР-2.1. Розчин у відповідних кількостях (5,35 л, 53,5 л, 525,1 л) подають через насос (Н-10) у біореактори (ФР-24, ФР-27 та ФР-30 відповідно) для проведення стерилізації. Для стерилізації вмикають подачу пару в сорочку та всередину інокулятора (ФР-24, ФР-27 та ФР-30 відповідно) до встановлення температури 131°C та тиску 0,15-0,2 МПа. По досягненню необхідних параметрів стерилізації підтримують їх на заданому рівні упродовж 40-60 хв. Простерилізований розчин використовують на стадіях ТП 4.4, ТП 4.5, ТП 4.6 відповідно.

ДР 3.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалці

Для вирощування інокуляту в колбах на качалці необхідно приготувати 750 мл поживного середовища. Вміст компонентів для приготування середовища наведено в табл. 4.1.

Вміст компонентів для приготування 750 мл середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 750 мл середовища, г	Необхідна кількість доданої води мл	Загальний об'єм композиції, мл	Композиції
Глюкоза	20	14	100	114,7	Композиція А
Дріжджовий екстракт	1	0,7			
(NH ₄) ₂ SO ₄	11	7,7	373,2	383,1	Композиція Б-1
MgSO ₄ ×7H ₂ O	1,2	0,84			
FeEDTA	1,3	0,91			
KH ₂ PO ₄	3	2,1	200	202,1	Композиція Б-2
ZnSO ₄ ×7H ₂ O	0,0018	0,00126	0,09825	0,1	Композиція В (запасний розчин з ДП 3.1)
MnSO ₄ ×H ₂ O	0,0003	0,00021			
CuSO ₄ ×5H ₂ O	0,0004	0,00028			

Д.Р.3.3.1 Приготування та стерилізація композиції А. На технічних вагах зважують 14 г глюкози, 0,7 г дріжджового екстракту. Мірним циліндром відміряють 100 мл дистильованої води. Відвантажують в колбу об'ємом 250 мл та перемішують до повного розчинення компонентів магнітною мішалкою. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112°C упродовж 30 хв, під тиском 0,05 МПа.

Після стерилізації композицію перевіряють на відсутність мікробіоти.

Д.Р.3.3.2 Приготування та стерилізація композицій Б-1 та Б-2. Для приготування розчину Б-1, на технічних вагах зважують 7,7 г двоаміщеного сульфату амонію, 0,84 г семиводного сульфату магнію, 0,91 г хелату залізо-етилендіамінтетраоцтової кислоти та відміряють 373,2 мл дистильованої води мірним циліндром. Компоненти відважують в 500 мл колбу, додають відібраний об'єм води та перемішують до повного розчинення магнітною мішалкою. Колбу

закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°C упродовж 40-60 хв, під тиском 0,15-0,2 МПа.

Для приготування розчину Б-2, на технічних вагах зважують 2,1 г дигідроортофосфату калію та відміряють 200 мл дистильованої води мірним циліндром. Компоненти відважують в 500 мл колбу, додають відібраний об'єм води та перемішують до повного розчинення магнітною мішалкою. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°C упродовж 40-60 хв, під тиском 0,15-0,2 МПа.

Після стерилізації композиції перевіряють на відсутність мікробіоти.

ДР 3.4. Приготування та стерилізація поживного 7,1 середовища для інокулятора

Для вирощування інокуляту необхідно приготувати 7,1 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування середовища наведено в табл. 4.2.

Таблиця 4.2.

Вміст компонентів для приготування 7,1 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 7,1 л середовища, г	Необхідна кількість доданої води мл	Загальний об'єм композиції, мл	Композиції
Глюкоза	20	142	1000	1149,1	Композиція А
Дріжджовий екстракт	1	7,1			
(NH ₄) ₂ SO ₄	11	78,1	5238 + 595 (конденсат)	5950,1	Композиція Б (розчин солей від ДР 3.2)
KH ₂ PO ₄	3	21,3			
MgSO ₄ ×7H ₂ O	1,2	8,52			
FeEDTA	1,3	9,23			
ZnSO ₄ ×7H ₂ O	0,0018	0,01278	0,98	1	Композиція В (запасний розчин з ДР 3.1)
MnSO ₄ ×H ₂ O	0,0003	0,00213			
CuSO ₄ ×5H ₂ O	0,0004	0,00284			

ДР 3.4.1 Приготування та стерилізація композиції А. На технічних вагах зважують 142 г глюкози, 7,1 г дріжджового екстракту. Відважені компоненти відвантажують в колбу об'ємом 2 л, відміряють мірним циліндром 1000 мл дистильованої води та перемішують до повного розчинення магнітною мішалкою. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112°C упродовж 30 хв, під тиском 0,05 МПа.

Після стерилізації композицію перевіряють на відсутність мікробіоти.

ДР 3.5. Приготування та стерилізація поживного 71 середовища для інокулятора

Для вирощування інокуляту необхідно приготувати 71 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування середовища наведено в табл. 4.3.

Таблиця 4.3.

Вміст компонентів для приготування 71 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 71 л середовища, г	Необхідна кількість доданої води л	Загальний об'єм композиції, л	Композиції
Глюкоза	20	1420	8,85	11,491	Композиція А
Дріжджовий екстракт	1	71	+ 1,15 (конденсат)		
(NH ₄) ₂ SO ₄	11	781	52,378 + 5,95 (конденсат)	59,499	Композиція Б (розчин солей від ДР 3.2)
KH ₂ PO ₄	3	213			
MgSO ₄ ×7H ₂ O	1,2	85,2			
FeEDTA	1,3	92,3			
ZnSO ₄ ×7H ₂ O	0,0018	0,1278	0,0098	0,01	Композиція В (запасний розчин з ДР 3.1)
MnSO ₄ ×H ₂ O	0,0003	0,0213			
CuSO ₄ ×5H ₂ O	0,0004	0,0284			

Д.Р.3.5.1 Приготування та стерилізація композиції А. Об'ємно-ваговим дозатором (Д-12) в збірник (Р-11) об'ємом 50 л подають глюкозу – 1,42 кг та 71 г

дріжджового екстракту. Компоненти розчиняють в 8,85 л питної води. Вмикають перемішування на швидкості – 100 об/хв для повного розчинення компонентів. Вмикають подачу пару в сорочку та всередину збірника до встановлення температури 112°C та тиску 0,05 МПа. По досягненню необхідних параметрів стерилізації підтримують на заданому рівні упродовж 30 хв.

Після стерилізації середовище перевіряють на відсутність мікробіоти.

ДР 3.6. Приготування та стерилізація поживного 710 л середовища для посівного апарату

Для вирощування інокуляту необхідно приготувати 710 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування середовища наведено в табл. 4.4.

Таблиця 4.4.

Вміст компонентів для приготування 710 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 710 л середовища, кг	Необхідна кількість доданої води л	Загальний об'єм композиції, л	Композиції
Глюкоза	20	14,2	100 +	126,41	Композиція А
Дріжджовий екстракт	1	0,71	11,5 (конденсат)		
(NH ₄) ₂ SO ₄	11	7,81	513,4 + 58,4 (конденсат)	583,5	Композиція Б (розчин солей від ДР 3.2)
KH ₂ PO ₄	3	2,13			
MgSO ₄ ×7H ₂ O	1,2	0,85			
FeEDTA	1,3	0,92			
ZnSO ₄ ×7H ₂ O	0,0018	0,0013	0,0982	0,1	Композиція В (запасний розчин з ДР 3.1)
MnSO ₄ ×H ₂ O	0,0003	0,0002			
CuSO ₄ ×5H ₂ O	0,0004	0,0003			

Д.Р.3.6.1 Приготування та стерилізація композиції А. Об'ємно-ваговим дозатором (Д-15) в збірник (Р-14) об'ємом 250 л подають глюкозу – 14,2 кг та 0,71 кг дріжджового екстракту. Компоненти розчиняють в 100 л питної води. Вмикають перемішування на швидкості – 100 об/хв для повного розчинення компонентів.

Вмикають подачу пару в сорочку та всередину збірника до встановлення температури 112°C та тиску 0,05 МПа. По досягненню необхідних параметрів стерилізації підтримують на заданому рівні упродовж 30 хв.

Після стерилізації середовище перевіряють на відсутність мікробіоти.

ДР 3.7. Приготування та стерилізація поживного 6,9 м³ середовища для посівного апарату

Для вирощування посівного матеріалу необхідно приготувати 7100 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування середовища наведено в табл. 4.5.

Д.Р.3.7.1 Приготування та стерилізація композиції А. Об'ємно-ваговим дозатором (Д-18) в збірник (Р-17) об'ємом 2 м³ подають глюкозу – 138 кг та 6,9 кг дріжджового екстракту. Компоненти розчиняють в 1000 л питної води. Вмикають перемішування на швидкості – 150 об/хв для повного розчинення компонентів. Вмикають подачу пару в сорочку та всередину збірника до встановлення температури 112°C та тиску 0,05 МПа. По досягненню необхідних параметрів стерилізації підтримують на заданому рівні упродовж 30 хв.

Таблиця 4.5.

Вміст компонентів для приготування 6,9 м³ середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 6,9 м ³ середовища, кг	Необхідна кількість доданої води л	Загальний об'єм композиції, л	Композиції
Глюкоза	20	138	1000 +	1259,4	Композиція А
Дріжджовий екстракт	1	6,9	114,5 (конденсат)		
(NH ₄) ₂ SO ₄	11	75,9	4961,8	5639,6	Композиція Б
KH ₂ PO ₄	3	20,7	+		
MgSO ₄ ×7H ₂ O	1,2	8,28	563,96		
FeEDTA	1,3	8,97	(конденсат)		

ZnSO ₄ ×7H ₂ O	0,0018	0,0124	0,0982	1	Композиція В (запасний розчин з ДР 3.1)
MnSO ₄ ×H ₂ O	0,0003	0,0021			
CuSO ₄ ×5H ₂ O	0,0004	0,0028			

Після стерилізації композицію перевіряють на відсутність мікробіоти.

Д.Р.3.7.2 Приготування та стерилізація композиції Б.

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д-21) в реактор-змішувач Р-20 передають 75,9 кг двозаміщеного сульфату амонію, 20,7 кг дигідроортофосфату калію, 8,28 кг семиводного сульфату магнію, 8,97 кг хелату залізо-етилендіамінтетраоцтової кислоти. Далі подають 4961,8 л питної води. Вмикають перемішування на швидкості – 150 об/хв для повного розчинення компонентів. Композицію подають через насос (Н-22) в ферментер (ФР-32) для стерилізації. Перед стерилізацією в ферментер з реактора (Р-34) самотоком подають 6-% розчин НСІ зі стадії ДР 2.1. Для стерилізації вмикають подачу пару в сорочку та всередину ферментера (ФР-32) до встановлення температури 131°C та тиску 0,15-0,2 МПа. По досягненню необхідних параметрів стерилізації підтримують на заданому рівні упродовж 40-60 хв.

Після стерилізації середовище перевіряють на відсутність мікробіоти.

ТП 4. Підготовка посівного матеріалу

В технології виробництва – на стадії підтримання колекційної культури, на стадії вирощування робочої культури і на всіх стадіях вирощування посівного матеріалу роботи з культурою виконуються в асептичних умовах.

ТП 4.1. Підтримання колекційної культури

Культуру *A. repens* (CBS 102.32) зберігають в пробірках з агаром Чапека при 4°C. Пересів роблять кожні 30 днів. Контролюють на наявність сторонньої мікробіоти та проводять ідентифікацію для забезпечення відповідності культури.

ТП 4.2. Вирощування робочої культури

Колекційну культуру, розсіюють в пробірки з агаром Чапека і вирощують при температурі 25 °С протягом 44 год.

Під час процесу перевіряють відсутність сторонньої мікробіоти.

ТП 4.3. Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках

Вміст колб з композиціями А і Б-1 та Б-2 (від ДР 3.3.1 та ДР 3.3.2), а також порцію 0.1 мл запасного розчину солей (від ДР 3.1) змішують в колбі об'ємом 1 л. Далі середовище засівають спорами робочої грибової культури (від ТП 4.2) з розрахунку $2,5 \times 10^7$ спор на літр. Вміст колби розливають на 4 качалочні колби об'ємом 250 мл. Після чого колби ставлять на качалку за наступних умов культивування: температура – 25 °С, частота обертання – 180 об/хв, час вирощування – 44 год.

По закінченню вирощування, культуральну рідину з колб переносять у стерильну засівну колбу об'ємом 1 л.

Під час процесу перевіряють відсутність сторонньої мікробіоти.

ТП 4.4. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі на 15 л

У інокуляторі ФР-24 об'ємом 15 л знаходиться простерилізована та охолоджена композиція Б (від ДР 3.2). Вносять композиції простерилізованого та охолодженого середовища (від ДР 3.1, ДР 3.4.1). В секції сорочки апарату подаючи гарячу і холодну воду підтримують значення температури поживного середовища на рівні 25°С. Вмикають мішалку з швидкістю перемішування – 350 об/хв та починають автоматичну титрацію з 10,7 мл розчину NaOH (від ДР-2.2). Після досягнення температури 25°С та рН – 6,0, через засівний бачок вносять інокулят (від ТП 4.3). Час вирощування – 44 год. В ході процесу постійно підтримують продування киснем – 1 об. стерильного повітря /об. культуральної рідини за хвилину через барботер. Під час вирощування у інокуляторі створюється надлишковий тиск подачею повітря – 0,02 МПа.

Під час процесу перевіряють відсутність сторонньої мікробіоти.

ТП 4.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі на 150 л

У інокуляторі ФР-27 об'ємом 150 л знаходяться простерилізована та охолоджена композиція Б (від ДР 3.2). Вносять композиції простерилізованого та охолодженого середовища (від ДР 3.1 та ДР 3.5.1). В секції сорочки апарату подаючи гарячу і холодну воду підтримують значення температури поживного середовища на рівні 25°С. Вмикають мішалку з швидкістю перемішування – 350 об/хв та починають автоматичну титрацію з 107 мл розчину NaOH (від ДР-2.2). Після досягнення

температури 25°C та рН – 6.0, вносять інокулят (від *ТП 4.4*). Час вирощування – 44 год. В ході процесу постійно підтримують продування киснем – 1 об. стерильного повітря /об. культуральної рідини за хвилину через барботер. Під час вирощування у інокуляторі створюється надлишковий тиск подачею повітря – 0,02 МПа.

Під час процесу перевіряють відсутність сторонньої мікробіоти.

ТП 4.6. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі на 1,5 м³

У посівному апараті ФР-30 об'ємом 1,5 м³ знаходиться простерилізована та охолоджена композиція Б (від *ДР 3.2*). Вносять композиції простерилізованого та охолодженого середовища (від *ДР 3.1* та *ДР 3.6.1*). В секції сорочки апарату подаючи гарячу і холодну воду підтримують значення температури поживного середовища на рівні 25°C. Вмикають мішалку з швидкістю перемішування – 350 об/хв та починають автоматичну титрацію з 1,05 л розчину NaOH (від *ДР-2.2*). Після досягнення температури 25°C та рН – 6.0, вносять інокулят (від *ТП 4.5*). Час вирощування – 44 год. В ході процесу постійно підтримують продування киснем – 1 об. стерильного повітря /об. культуральної рідини за хвилину через барботер. Під час вирощування у апараті створюється надлишковий тиск подачею повітря – 0,02 МПа.

Під час процесу перевіряють відсутність сторонньої мікробіоти.

ТП 5. Виробничий біосинтез

У ферментер ФР-32 об'ємом 12 м³ з стерильною композицією Б (від *ДР 3.7.2*) вносять композиції простерилізованого та охолодженого середовища (від *ДР 3.1*, *ДР 3.7.1*). В секції сорочки апарату подаючи гарячу і холодну воду підтримують значення температури поживного середовища на рівні 25°C. Вмикають мішалку з швидкістю перемішування – 350 об/хв. та починають автоматичну титрацію з 9,92 л розчину NaOH (від *ДР-2.2*). Після досягнення температури 25°C та рН – 6.0, вносять інокулят (від *ТП 4.6*). Час вирощування – 44 год. В ході процесу постійно підтримується продування киснем – 1 об. стерильного повітря /об. культуральної рідини за хвилину через барботер. Під час вирощування у апараті створюється надлишковий тиск подачею повітря – 0,02 МПа.

Під час процесу перевіряють відсутність сторонньої мікробіоти, перевіряють ріст штаму *A. repens* (*CBS 102.32*). Визначають концентрацію глюкози в середовищі та концентрацію амінного азоту.

На 40-ву годину ферментації відбирають пробу для контролю рівня біомаси, ферментація припиняється, якщо по результатам контролю досягається фінальна концентрація (12,6 г сухої маси на 1л), у іншому випадку, відбір повторюється на 42-гу годину ферментації. У випадку, якщо бажана концентрація не досягнута процес припиняється на 44-ту годину ферментації і відбирається проба на рівень біомаси. Після досягнення кінцевої фази біосинтезу культуральну рідину передають на постферментаційний етап у реактор-декантер Р-46 для наступного виділення та очищення.

4.3. Опис технологічної схеми ділянки виділення та очищення

Технологічна схема виділення та очищення продукту культивування представлено в графічній частині роботи на 1 аркуші формату А1.

Технологічна схема включає в себе допоміжні роботи (підготовка допоміжних розчинів), процес виділення та очищення хітозану (відділення міцелію від КР, його гомогенізацію, депротейнізацію, відділення Луг-нерозчинної фракції та безпосереднє виділення хітозану), а також процеси контролю та пакування продукту.

ТП 6. Підготовка допоміжних розчинів

ТП 6.1 Підготовка 1М розчину NaOH

12 кг пелет NaOH та 288 л води питної завантажуються через об'ємно ваговий дозатор Д-37 в реактор Р-38. Вмикається мішалка та проводиться перемішування до повного розчинення пелет. Після закінчення перемішування, розчин подається через відцентровий насос Н-39 на ТП 8.1 для депротейнізації та на ТП 9.1 для осадження.

ТП 6.2 Підготовка 2% розчину оцтової кислоти

2,8 л 99.9 % оцтової кислоти та 137,2 л води питної завантажуються через об'ємно ваговий дозатор Д-40 в реактор Р-41. Вмикається мішалка та проводиться перемішування протягом 10 хв. Після закінчення перемішування, розчин подається через відцентровий насос Н-42 на ТП 8.3 для розчинення луг-нерозчинних фракцій.

ТП 6.3 Підготовка етилового спирту

270 л 95% етилового спирту завантажуються через об'ємно ваговий дозатор Д-43 в ємність для спирту Є-44. Розчин подається через кулачковий насос Н-45 на ТП 8.2 для промивання суспензії.

ТП 7. Підготовка міцелярної маси

ТП 7.1 Відділення міцелію від культуральної рідини

Культуральна рідина з міцелієм передається з виробничого біосинтезу в збірник Р-46. Суміш подається через відцентровий насос Н-47 на центрифугу Ц-48. Суміш центрифугується при відносному відцентровому прискоренні – 20 тис G, до повного розділення фракцій, культуральна рідина утилізується, вологий міцелій за допомогою інерційних сил центрифуги подається до гомогенізатору ГФ-49.

ТП 7.2 Гомогенізація міцелію

Проводиться гомогенізація міцелію в гомогенізаторі ГФ-49, до отримання однорідної суміші. По закінченню процесу, гомогенізована суміш подається через шламовий насос Н-50 до реактору Р-51.

ТП 8. Очищення хітозану

ТП 8.1 Депротейнізація суміші 1М NaOH та фільтрація

В реактор Р-51 до гомогенізованого міцелію додається 289,51 л 1М NaOH. Проводиться депротейнізація суміші, при постійному перемішуванні та температурі 121 °С, протягом 15 хв та при атмосферному тиску. По закінченню депротейнізації суспензія подається на НУТЧ-фільтр Ф-36.

ТП 8.2 Промивання суміші

До НУТЧ-фільтра з депротейнізованою субстанцією подається 90 л етилового спирту через розприскувач, процедура повторюється 3 рази, по закінченню, спирт передається на регенерацію. Потім подається 90 л води дистильованої через розприскувач, процедуру повторюють 3 рази. Субстанція вивантажується до Р-51.

ТП 8.3 Розчинення Луг-нерозчинної фракції в 2% оцтовій кислоті

До реактору Р-51 з депротейнізованою та промитою сумішшю додається 137,37 л оцтової кислоти. Суміш перемішується 17 год при температурі 100 °С до повного розчинення луг-нерозчинної фракції. По закінченню процедури, отримана суміш передається через шламовий насос Н-52 до центрифуги Ц-53.

ТП 8.4 Центрифугування та відділення супернатанту

Суміш центрифугується при відносному відцентровому прискоренні – 20 тис G, до повного розділення фракцій. Супернатант надходить з центрифуги Ц-53 через насос Н-54 в реактор Р-55. По закінченню операції, осад з центрифуги утилізується.

ТП 9. Виділення, ліофілізація та подрібнення хітозану

ТП 9.1 Осадження хітозану розчином NaOH

У реакторі Р-55 перевіряється рН розчину. Вмикається система автоматичного титрування, рН вирівнюється до 8,5 до випадення білого осаду. Суміш, при постійному перемішуванні вивантажується за допомогою насоса Н-56 до центрифуги Ц-57, де при відносному відцентровому прискоренні – 20 тис G, розділяється на фракції. Рідка фракція утилізується, тверда фракція рівними порціями розділяється по ємностям і передається на ліофілізацію ТП 9.2

ТП 9.2 Ліофілізація хітозану

Сублимаційна сушарка СС-58 вмикається, встановлюється температура 25 °С. Після досягнення температури, технологічні ємності з сумішшю завантажуються на полки сушарки, двері сушарки закупорюються. Встановлюється температура охолодження – -50 °С, тиск – 10 Па. По досягненню заданих параметрів, відбувається ліофілізація протягом 2 год. Після завершення ліофілізації, температура встановлюється на 30 °С, по досягненню якої відбувається сушка продукту протягом 6 год. По закінченні сушки, температурні контролери вимикаються, тиск вирівнюється до 1 атм. Двері сушарки відчиняються, ємності з ліофілізатор передаються подрібнення на стадію ТП 9.3.

ТП 9.3 Подрібнення осаду

Субстанція з ємностей переноситься в дисковий млин Д-59. Проводиться подрібнення субстанції до проходження через сито 150 мкм. Відбирається проба продукту 20 г та передається на контроль. Після завершення контролю, подрібнена субстанція передається на пакування на ПМВ 10.1.

ПМВ 10. Первинне та вторинне пакування

ПМВ 10.1 Первинне пакування

У приміщенні з відотною вологістю < 20 %, отримані 19.32 кг з попередньої стадії ліофільного продукту, завантажуються у дозатор фасувального апарату Ф-60. Вмикається режим автоматичного пакування. Пакування відбувається у поліетиленові мішки, рівними порціями не менше 4.83 кг. На мішки у автоматичному режимі наноситься маркування з номером серії, вагою пакування, датою та часом

упаковки Після завершення пакування мішки передаються на стадію вторинного пакування.

ПМВ 10.2 Вторинне пакування

Поліетиленові мішки поміщаються на палети та обмотуються плівкою ПВХ. Зберігання палетів відбувається у складському приміщенні з температурним режимом < 25 °С.

4.4. Контроль ділянки біосинтезу.

4.4.1. Мікробіологічний контроль

З метою контролю чистоти культивування грибів *A. repens* (CBS 102.32) необхідно проводити мікробіологічний контроль на усіх етапах, для того щоб впевнитись у відсутності контамінації.

Кожні 12 год з інокулятора і ферментера відбираються зразки культуральної рідини для аналізу.

Проба простерилізованого поживного середовища відбирається в об'ємі, як правило, 50 мл і здійснюють прямим висівом на агаризовані середовища. Контроль здійснюють шляхом розсівання проби простерилізованого поживного середовища (або стерильної композиції поживного середовища перед змішуванням) на чашки Петрі з відповідним агаризованим поживним середовищем і подальшим інкубуванням [97].

Виконання посівів. Посіви здійснюються шляхом відбору 0,1 мл з об'єму проби стерильною піпеткою і нанесення її на поверхню СА – для виявлення грибів і дріжджів і МПА – для виявлення бактерій. Суспензія рівномірно розподіляється по поверхні середовища штрихом за допомогою стерильної бактеріологічної петлі. Чашки з посівами поміщаються у термостат за температури 30 °С. Аналіз посівів здійснюється, починаючи з 6 години. На поверхні поживних середовищ візуально визначається відсутність ознак росту мікроорганізмів [97].

Мікробіологічний контроль чистоти культури здійснюється двома шляхами: прямим висівом на агаризовані поживні середовища і мікроскопіюванням [98].

Прямий висів здійснюється посівом культуральної рідини до ізольованих колоній на чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром для виявленням сторонніх бактерій, сусло-агаром або глюкозо-картопляним агаром – грибів та дріжджів [98].

Для ідентифікації грибів *A. repens* (CBS 102.32) використовується висів на агар Чапека та мікроскопіювання.

Мікроскопіювання проводиться світловим мікроскопом з імерсійною системою. Методика мікроскопіювання [98]:

Для приготування препарату на чисте знежирене предметне скло, в асептичних умовах, за допомогою стерильної петлі наноситься невелика краплина культуральної рідини і розподіляється рівномірно на площі 1-4 см², роблячи якомога тонший мазок. Мазок висушується без нагрівання, при кімнатній температурі, до повного випаровування вологи. Препарат фіксується, тричі провівши скло з препаратом через верхню частину пальника. Фіксований препарат заливається кількома краплями барвника – метиленового синього. Барвник розподіляється по всій поверхні мазка. Препарат фарбується протягом 5 хв. Потім фарба зливається та препарат добре промивається дистильованою водою. Скло з країв протирається фільтрувальним папером, препарат висушується при кімнатній температурі. Потім на абсолютно сухий препарат наноситься краплина імерсійного масла. Мікроскопіювання відбувається під великим збільшенням мікроскопа (×90). Після роботи ваткою, змоченою етиловим спиртом, знімаються залишки масла з імерсійного об'єктива.

4.4.2. Визначення рівня біомаси

З метою контролю продуктивності процесу виробничого біосинтезу необхідно проводити контроль рівня біомаси на кінцевих етапах стадії.

Методика визначення рівня біомаси в дослідному зразку

З мікробіологічної суміші відбирається зразок 100 мл та нагрівали на киплячій водяній бані протягом 2 хв, потім центрифугували при 10000 об/хв протягом 20 хв при 4 С. Після злиття супернатанту, відокремлену біомасу висушують до постійної маси в термостаті при 60 С та зважують на технологічних вагах.

4.4.3. Визначення концентрації джерела вуглецю

Джерелом вуглецевого живлення є глюкоза. Цей компонент визначається глюкозооксидазним методом.

Глюкозооксидазний (фотометричний) метод аналізу базується на реакції окислення глюкози в присутності ферменту глюкозооксидази з утворенням перекиси

водню, яка в свою чергу в присутності пероксидази окислює ортотолідін з утворенням забарвленого розчину [99].

Методика визначення глюкози в дослідному зразку. Культуральна рідина центрифугується при 10000 об/хв на 20 хв. Після чого, до 1 мл одержаного супернатанту додається 3 мл ензимо-хромогенного реактиву. Реактив готується наступним чином: у мірну колбу на 100 мл поміщається 80-90 мл ацетатного буфера (0,25 моль/л, рН=4,8), в якому розчиняється 2 мг глюкозооксидази, а потім 1 мг пероксидази; додається 1 мл 1% розчину о-толїдину в абсолютному спирті і об'єм розчину доводиться ацетатним буфером до мітки. Після додавання реактиву до дослідного зразку, отримана суміш перемішується і через 20 хвилин вимірюється оптична густина при довжині хвилі 625 нм. Порівняння проводиться за стандартним розчином глюкози. Далі, концентрацію глюкози вираховують за формулою [100]:

$$C_{\text{досл.}} = \frac{D_{\text{досл.}} \cdot C}{D_{\text{ст}}}$$

де $D_{\text{досл.}}$ – оптична густина дослідної проби; $D_{\text{ст}}$, – оптична густина розчину стандартного зразка глюкози; C – концентрація глюкози в розчині стандартного зразка.

4.4.4. Визначення концентрації амінного азоту

Джерелом амінного азоту в середовища є двозаміщений сульфату амонію. Така речовина аналізується за допомогою реактиву Несслера.

Метод заснований на властивості реактиву Несслера давати кольорову реакцію з іонами амонію, яка утворюється після мінералізації білкових продуктів [101].

Методика визначення амінного азоту в дослідному зразку. Культуральна рідина центрифугується при 10000 об/хв на 20 хв. У пробірку вноситься 1 мл одержаного супернатанту та об'єм доводиться розчину водою до 9,5 мл, далі проводиться перемішування. Потім, до розчину додається 0,5 мл реактиву Несслера і знову перемішують. Проводиться вимір оптичної щільності досліджуваного розчину при 400 нм. Порівняння проводиться з калібрувальним графіком побудованим по результатам контролю 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 мл стандартного розчину амінокислот (0,05 мг/мл амонію сульфату) [101].

4.4.5. Визначення концентрації хітозану в клітинній стінці *A. repens* (CBS 102.32)

Попередньо проводиться осадження міцелію у культуральній рідині методом вистоювання, та відділення за допомогою вакуумної фільтрації. Відбирається зразок міцелію (25 г) для подальшого аналізу. Міцелій гомогенізується у лабораторному блендері, далі проводиться депротейнізація за допомогою 1,0 М NaOH (У пропорції 1 маса міцелію до 40 мас NaOH) при 121 °С. Отримана суспензія фільтрується, та промивається три рази 95% етанолом, та три рази дистильованою водою, далі висушується ліофілізацією. Отримана фракція піддається подальшій обробці, до неї додається 40 мл 2,0% оцтової кислоти, та енергійно струшується до повного розчинення луг-нерозчинних-матеріалів. Далі, проводиться екстракція хітозану, здійснивши нагрівання зразка до 100 °С протягом 17 годин. Отриманий екстракт центрифугується, збирається супернатант та відкидається осад, який містить луг-нерозчинні-матеріали, надалі вирівнюється рН до 8,5 за допомогою NaOH для випадання хітозану (хітозан нерозчинний при нейтральному рН) в білий, у вигляді пластівців осад. Отриманий хітозан промивається 4 рази дистильованою водою, ліофілізується і зважується. Для якісного визначення хітозану, на висушений осад додають 2-3 краплі розчину йоду/калію йодиду і перемішують, далі суміш підкислюють 2-3 краплями 1% H₂SO₄. Після додавання розчину йоду/калію йодиду осад змінює колір на темно-коричневий, а розчин стає безбарвним, а при додаванні сірчаної кислоти темно-коричневий колір осаду повинен змінитися на темно-фіолетовий [58, 80].

4.5. Контроль ділянки виділення та очищення

4.5.1. Карта постадійного контролю

Карта постадійного контролю наведена в табл. 4.6.

Таблиця 4.6.

Карта постадійного контролю ділянки виділення та очищення

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник	Методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору	Нормативна характеристика показника
1	2	3	4	5
К _т 6.1 Підготовка 1М розчину NaOH	Маса пелет NaOH Об'єм води	Ваги об'ємно вагового дозатора	До завантаження в реактор.	$m_{\text{NaOH}} = 12 \text{ кг}$ $V_{\text{H}_2\text{O}} = 228 \text{ л}$
К _т 6.2 Підготовка 2% розчину оцтової кислоти	Об'єм 99% оцтової кислоти Об'єм води	Ваги об'ємно вагового дозатора	До завантаження в реактор.	$V_{\text{CH}_3\text{COOH}} = 2,8 \text{ л}$ $V_{\text{H}_2\text{O}} = 137,2 \text{ л}$
К _т 6.3 Підготовка етилового спирту	Об'єм етилового спирту	Ваги об'ємно вагового дозатора	До завантаження в реактор.	$V_{\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}} = 270 \text{ л}$
К _т 7.1 Відділення міцелію від культуральної рідини	Відносне відцентрове прискорення	Тахометр	Під час процесу.	$a = 20\,000 \text{ G}$
К _т 7.2 Гомогенізація міцелію	Однорідність суміші	Візуальний контроль	Однорідність суміші контролюється після закінчення процесу.	Суміш однорідна
К _т 8.1 Депротейнізація суспензії 1М NaOH та фільтрація	Об'єм 1М NaOH Температура депротейнізації Тривалість депротейнізації Тиск депротейнізації	Ваги реактора Термометр Годинник Манометр	Об'єм контролюється на початку процесу, температура, тривалість та тиск контролюються під час.	$V_{\text{NaOH}} = 289,51 \text{ л}$ $T = 121 \text{ °C}$ $t = 15 \text{ хв}$ $P = 1 \text{ атм}$
К _т 8.2 Промивання суспензії	Об'єм етилового спирту Об'єм води Тривалість перемішування	Ваги реактора Годинник	Під час процесу.	$V_{\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}} = 3 \times 90 \text{ л}$ $V_{\text{H}_2\text{O}} = 3 \times 90 \text{ л}$ $t_x = 5 \text{ хв}$

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник	Методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору	Нормативна характеристика показника
1	2	3	4	5
К _т 8.3 Розчинення Луг- нерозчинної фракції в 2% оцтовій кислоті	Об'єм оцтової кислоти Температура Тривалість	Ваги реактора Термометр Годинник	Об'єм контролюється на початку процесу, температура та тривалість під час.	$VCH_3COOH =$ 137,37 л $T = 100\text{ }^{\circ}C$ $t = 17\text{ год}$
К _т 8.4 Центрифугуванн я та відділення супернатанту	Відносне відцентрове прискорення	Тахометр	Під час процесу.	$a = 20\ 000\ G$
К _т 9.1 Осадження хітозану розчином NaOH	pH Наявність осаду Відносне відцентрове прискорення	Потенціомет ричний метод Візуальний контроль Тахометр	pH, відцентрове прискорення контролюється під час процесу, осад контролюється після закінчення.	pH = 8,5 Осад наявний $a = 20\ 000\ G$
К _т 9.2 Ліофілізація хітозану	Вага ємностей Температура завантаження Температура ліофілізації Вакуум Тривалість ліофілізації Температура сушіння Тривалість сушіння Тиск вивантаження	Ваги Термометр Годинник Манометр	Вага ємностей контролюється до початку процесу. Параметри ліофілізації контролюються під час процесу.	$T_з = 25\text{ }^{\circ}C$ $T_л = -50\text{ }^{\circ}C$ $P_л = 10\text{ Па}$ $t_л = 2\text{ год}$ $T_с = 30\text{ }^{\circ}C$ $t_с = 6\text{ год}$ $P_в = 1\text{ атм}$

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник	Методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору	Нормативна характеристика показника
1	2	3	4	5
К _т 9.3 Подрібнення осаду	Опис Втрата в масі при висушуванні Якісне визначення Кількісне визначення	Хімічні методи контролю	Показники якості контролюються після закінчення процесу.	Білий, у вигляді пластівців осад $\Delta m < 5\%$ Виявляє відповідну якісну реакцію $m = 19.32$ кг
К _т 10.1 Первинне пакування	Вологість повітря Маса продукту в пакуванні Відповідність маркування	Гігрометр Ваги Візуальний контроль	Під час процесу	$ВВ < 20\%$ $m > 4.83$ кг Маркування відповідає номеру серії, даті та часу пакування
К _т 10.2 Вторинне пакування	Температура повітря	Термометр	Під час процесу	$T < 25$ °С

4.5.2. Підготовка проб для контролю

20 г відібраного після стадії подрібнення осаду центрифугується при 5000 об / хв протягом 15 хвилин. Далі двічі промивається дистильованою водою у скляній пробірці та відділяється за допомогою вакуумної фільтрації. Відділений осад ресуспендується в 0,5 мл дистильованої води, та наноситься на предметне скло. Скло висушується при 55 ° С протягом 2-4 годин. Отриману субстанцію передають на контроль опису, якісне визначення, та контроль втрати маси при висушуванні.

4.5.3. Опис

Відбирається 1 грам підготованої субстанції, та рівномірно шпателем розповсюджується по площі предметного скла. Особою, що проводить контроль, проводиться візуальна оцінка кольору та загального вигляду часток. Відповідно до контролю, повинно бути зроблено спостереження, що речовина представляє собою білу, у вигляді пластівців субстанцію.

4.5.4. Втрата в масі при висушуванні

Зважують пустий бюкс для зважування, попередньо висушений протягом принаймні 30 хв. 5 г випробовуваної субстанції поміщають у бюкс і зважують бюкс з випробовуваною речовиною. Сушать у сушильній шафі протягом 5 годин. Після висушування в сушильній шафі, бюкс із випробовуваним зразком охолоджують до кімнатної температури в ексікаторі, після чого бюкс із випробовуваним зразком зважують. Маса зразка розраховується, як різниця між масою бюкса з випробовуваним зразком і масою порожнього висушеного бюкса. Втрата в масі під час висушування розраховується, як різниця в масі зразка до і після висушування, виражена у відсотках [102].

4.5.5. Якісне визначення хітозану

До 5 г випробовуваної субстанції додають 2-3 краплі розчину йодиду/калію йодиду і перемішують, після чого, осад повинен змінити колір на темно-коричневий, а розчин стати безбарвним. Далі суміш підкислюється 2-3 краплями 1% H_2SO_4 , при додаванні сірчаної кислоти темно-коричневий колір повинен стати темно-фіолетовим.

4.5.6. Кількісне визначення готового продукту

Зважують вагу отриманих після ліофільного сушіння ємностей з речовиною на технологічних вагах. Підраховують загальну масу ємностей з речовиною, та віднімають від результату вагу ємностей, отриману на початку стадії ліофілізації. Отриману масу коригують відповідно до отриманого за результатами контролю втрати маси при висушуванні, відсотку вологи в речовині.

РОЗДІЛ 5. Опис технологічного процесу виробництва ЛЗ.

5.1. Специфікація обладнання ділянки виробництва ЛЗ.

Специфікація обладнання, зображеного на апаратурній схемі (див. *графічна частина*), наведена у табл. 5.1

Таблиця 5.1

Специфікація ділянки виробництва готового лікарського засобу

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
1	2	3	4
ПЗ - 1	Повітрозабірник	1	Повітрозабірник з металевою сіткою для видалення механічних забруднень
Ф - 2	Фільтр грубої очистки повітря	1	HEPA фільтр класу H10. Рейтинг затримання – 85 %. Виробник: «Промышленные фильтры», Україна https://newfilter.com.ua/ua/ventilacia/hepa-filtri-dlya-sistem-ventilyatsiyi.html
Т - 3 Т - 5	Теплообмінник	2	Мідно-алюмінієвий теплообмінник з краплевловлювачем. Теплоносії – пара/вода. Має встановлені три ряди алюмінієвих ламелей товщиною в 0,2 мм і кроком 2,5 мм. Виробник: ТОВ «ОЛІТАН ПЛЮС», Україна https://alltan.com.ua/p2090292-teploobmennik-vodyanoj.html
Р - 4	Ресивер	1	Ресивер стиснутого повітря вертикальний РВ 500.15, вмістимість - 0,5 м ³ , робочий тиск – 15 Мпа, робоче середовище – вологе повітря, діапазон витримуваних температур – від 0 до + 45°С. Виробник: « REMEZA», https://fiac-ua.com/ Білорусь
Ф - 6	Головний фільтр	1	HEPA фільтр класу H13. Рейтинг затримання – 99.95 %. Виробник: «Промышленные фильтры», Україна https://newfilter.com.ua/ua/ventilacia/hepa-filtri-dlya-sistem-ventilyatsiyi.html
К - 7	Компресор	1	Компресор. Продуктивність – 205 літрів за хвилину. Верхня межа тиску стиснутого повітря– 12 МПа. Виробник: ТОВ «ДАЛГАКИРАН УКРАЇНА» https://dalgakiran.ua/store/product/Odnostupenchatyi
Н-8, Н-12	Вакуумний насос	2	Вакуумний одноступеневий насос. Матеріал виконання – нерж. сталь AISI 304. Продуктивність – 60 л/хв. Виробник: «Мир насосов», Україна https://mir-nasosov.com.ua/production/odnostupenchatye-vodokolcevyje-vakuumnye-nasosy-analogi-nasosov-yvn-i-sigma

					НУХТ БТЕК 02.02.09 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Матусевич Д.С.			РОЗДІЛ 5. Опис технологічного процесу виробництва ЛЗ.	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Тетеріна С.М.					98	115
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

О-9	Установка зворотного осмосу	1	Установка подвійного зворотного осмосу. Продуктивність – 1000 літрів на годину. Електропровідність води очищеної – 0.5 - 1.1 $\mu\text{S}/\text{cm}^3$, загальний органічний вуглець – 100 ppb, мікробіологічна чистота – < 5 КУО/мл, вміст бактеріальних ендотоксинів – < 0.25 МО/мл. Виробник: STILMAS S.P.A., Італія https://www.stilmas.com/product/pharma-ro/
Д-10	Комбінований дистильатор	1	Комбінований дистильатор. Установка виробництва води для ін'єкцій та стерильної пари. Електропровідність води для ін'єкцій – 0.5 - 1.1 $\mu\text{S}/\text{cm}^3$, загальний органічний вуглець – 100 ppb, мікробіологічна чистота – < 5 КУО/мл, вміст бактеріальних ендотоксинів – < 0.25 МО/мл. Виробник: STILMAS S.P.A., Італія https://www.stilmas.com/product/ms-combi/
Р-11	Реактор-змішувач для приготування м'якого засобу	1	Об'єм реактору – 0,20 м3. Реактор з нержавіючої сталі 12Х18Н10Т. Апарат з приварною сорочкою. Умовний тиск 1,6 МПа. Виробник: ТОВ «ГК ЕВРОХІММАШ К.О.» (Україна) http://euromash.kiev.ua/ua/aparati_perem_ustroystvo_m_ua.php
Р-13	Реактор-змішувач для приготування проміжного продукту	1	Об'єм реактору – 0,20 м3. Реактор з нержавіючої сталі 12Х18Н10Т. Апарат з приварною сорочкою. Умовний тиск 1,6 МПа. Виробник: ТОВ «ГК ЕВРОХІММАШ К.О.» (Україна) http://euromash.kiev.ua/ua/aparati_perem_ustroystvo_m_ua.php
МН-14	Машина наповнення флаконів	1	Асептична система Blow-Fill-Seal для пластикових флаконів. Модель – АРР4D. Об'єм наповнення – 0.4-2mL, кількість голок наповнення – 4, максимальна швидкість наповнення – 16000 флак/год. Виробник: SPM, Китай https://www.spm.so/product/afp-aseptic-blow-fill-seal-system-for-plastic-container-parenterals-double-stationsvp/#pro-sec-3
АП-15	Автомат пакування	1	Автоматична машина пакування у картонні коробки. Модель – МА50. Швидкість пакування – 50 пачок/хв. Виробник: Marchesini group, Італія https://www.marchesini.com/en/machines-lines/ma50-80-100
П-16	Палети пластикові	1	Пластиковий піддон Р4 полегшений. Розмірності - 600х400 мм. Допустиме динамічне навантаження – 300 кг. Постачальник: СкладПлюс, Україна. https://sklad-plus.com.ua/ua/plastikovye-palety/plastikovyi-poddon-r4-oblegchennyi-600h400-mm/

5.2. Опис технологічного процесу виробництва ЛЗ.

Технологічна схема отримання готового лікарського засобу представлена в графічній частині роботи на 1 аркуші формату А1.

Технологічна схема включає в себе допоміжні роботи (підготовку виробничого повітря, підготовку миючих засобів, підготовку виробничого персоналу, підготовку чистих приміщень та виробничого обладнання), приготування проміжного продукту лз (зважування субстанцій, приготування продукту), стерилізуючу фільтрацію, наповнення у флакони та запаювання та пакування продукту.

ДР 1. Підготовка виробництва

ДР 1.1 Підготовка виробничого повітря

Забір атмосферного повітря відбувається через повітрозабірник ПЗ-1 на висоті 15 м, з мінімальним вмістом пилових часток і мікроорганізмів.

Спершу повітря подається на фільтр Ф-2 класу Н10, з рейтингом затримання 85% далі проводиться охолодження повітря до 15 °С у теплообміннику Т-3, з подальшим зріджуванням крапель вологи і її затримки в ресивері Р-4. Вологість після ресивера має бути не більше 60 %, потім відбувається нагрів охолодженого повітря до температури 25 °С в теплообміннику Т-5.

Після зменшення вологості, повітря подається на фільтр Ф-6 класу Н13, з рейтингом затримання 99.75 %, після чого повітря подається в приміщеннях з класами чистоти D, C, B, A та на компресор для створення стерильного стисненого повітря.

Стиснення повітря до тиску – 0,5 МПа відбувається компресором К-7.

Очищення повітря від 99.9975% часток відбувається в кожному індивідуальному ламінарі у зонах зважування та у ламінарі машини наповнення МН-14.

ДР 1.2 Підготовка виробничої води

Вода питна подається через насос Н-8 до установки зворотного осмосу О-9 для очищення води до стану «Вода очищена».

«Вода очищена» подається на комбінований дистилятор Д-10 для утворення «Води для ін'єкцій» та «Пари стерильної».

ДР 1.3 Підготовка миючих засобів

В реактор Р-11 Для приготування 100 л 0.5% розчину ТЕА-сіль АБСК до 1,4 л 35 % концентрату ТЕА-сіль АБСК додають 98.6 л води для ін'єкцій. Проводиться перемішування мішалкою протягом 10 хвилин.

ДР 1.4 Підготовка виробничого персоналу

У стерилізаторі, провести стерилізацію двох комплектів боксового одягу класу В, одного комплекту боксового одягу класу С та трьох комплектів спіднього одягу для перехідних класів, режим стерилізації – 121 °С. 15 хвилин.

ДР 1.5 Підготовка чистих приміщень та виробничого обладнання

Виробничим персоналом відбувається прибирання виробничих приміщень, та виробничого обладнання в одноразових стерильних костюмах, за допомогою диз. розчину 1% перекису водню.

Проводиться стерилізація необхідних форматних та змінних частин режим стерилізації – 121 °С. 15 хвилин.

ТП 2. Приготування проміжного продукту ЛЗ

ТП 2.1 Зважування субстанцій

На технічних вагах під ламінарним укриттям відважується 30.0 кг сировини хітозану. Відважений хітозан поміщається у поліетиленовий пакет з зіп-локом та передається на стадію приготування.

У градуйовану ємність об'ємом під ламінарним укриттям відмірюється 62.068 г 0.1 М оцтової кислоти та доводиться водою для ін'єкцій до 1 л та закупорюється пробкою. Буферний розчин передається на стадію приготування.

ТП 2.2 Приготування продукту

У реактор Р-13, за допомогою реакторних вагів завантажується 70,0 кг 25 °С води для ін'єкцій. В реактор в автоматичний титратор завантажується буферний розчин оцтової кислоти, переданої з попередньої стадії, проводиться автоматична титрація до досягнення рН – 6.5 з постійним перемішуванням розчину.

В отриманий розчин додається 30,0 кг субстанції хітозану та проводиться перемішування розчину протягом 50 хв.

Після завершення приготування, проміжний розчин з реактору, за допомогою збільшення тиску в системі стерильним повітрям, передається в бачок машини наповнення МН-14

ТП 3. Стерилізуюча фільтрація, наповнення у флакони та запаювання

ТП 3.1 Стерилізуюча фільтрація, наповнення у флакони та запаювання

Перед початком роботи, на контрольній панелі машини наповнення МН-14 обирається режим наповнення «Хітозан», зі швидкістю наповнення 10 тис. флаконів/годину, об'єм флаконів – 1.2 мл, доза наповнення – 1 мл, розмір пластинки – 5 флаконів та завантажують пелети для екструзії в бачок.

Отриманий з попередньої стадії розчин, через стерилізуючий фільтр з рейтингом затримання 0.2 мкм, автоматично наповнюється у «на вимогу» сформовані флакони, які у автоматичному режимі запаюються, інспектуються та перевіряються на герметичність, потім поділяються по пластинкам по 5 штук та пакуються в брикети. Брикети з продуктом передають на збереження на склад проміжної продукції. Із визначених в регламенті точок відбирається по 5 флаконів для проведення контролю проміжного продукту.

По отриманню позитивного результату на серію продукту, продукт передається на пакування в цех пакування.

ТП 4. Пакування готового лікарського засобу

ТП 4.1 Пакування готового лікарського засобу

Лікарський засіб у пластинках по 5 штук запаковується у картонні коробки з інструкцією на автоматі пакування АП-15.

Отримані пачки з продуктом пакуються в коробки, укладаються на палети АП-15 та передаються на зберігання до карантинного складу з режимом зберігання 2÷8 °С та відносною вологістю повітря <40%.

ТП 5. Підготовка обладнання до наступного процесу

ТП 5.1 Мийка реактора

Після закінчення процесів, у реактор Р-13 додається 100 л 0.5% розчину ТЕА-сіль АБСК та вмикається автоматична СІР мийка реактора та лінії наповнення, по закінченню якої розчин зливається в каналізацію.

Після проведення мийки з миючим засобом, процес повторюється зі 100 л води очищеної.

Після проведення мийки з водою очищеною, процес повторюється зі 100 л води для ін'єкцій.

Після закінчення процесу СІР мийки, проводиться стерилізація реактора та лінії наповнення (SIP) в режимі 121 °С, 20 хвилин.

5.3. Контроль ділянки виробництва ЛЗ

Карта постадійного контролю наведена в табл. 5.2.

Таблиця 5.2.

Карта постадійного контролю ділянки виробництва ЛЗ

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник	Методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору	Нормативна характеристика показника
1	2	3	4	5
КТ _{1.1} Підготовка виробничого повітря	Рейтинги затримання фільтрів Температура повітря Вологість повітря Тиск повітря	Сертифікати якості Термометр Гігрометр Манометр	Сертифікати якості під час отримання, Всі інші показники постійний моніторинг	W ₁ = 85%, W ₂ = 99.75 %, W ₃ = 99.9975%, T ₁ = 15 °С, T ₂ = 25 °С, RH < 60 %, P = 0.5 МПа.
КТ _{1.3} Підготовка миючих засобів	Кількість концентрату ТЕА-солі Кількість води для ін'єкцій Тривалість перемішування	Мірна колба Витратомір Таймер	Всі показники контролюються по ходу процесу	V ₁ = 1.4 л, V ₂ = 98.6 л, t = 10 хв.
КТ _{1.4} Підготовка виробничого персоналу	Температура стерилізації Тривалість стерилізації	Термометр Таймер	Всі показники контролюються по ходу процесу	t = 121 °С, T = 15 хв.
КТ _{1.5} Підготовка чистих приміщень та виробничого обладнання	Температура стерилізації Тривалість стерилізації	Термометр Таймер	Всі показники контролюються по ходу процесу	t = 121 °С, T = 15 хв.
КТ _{2.1} Зважування субстанцій	Маса хітозану Маса оцтової кислоти	Ваги	Всі показники контролюються по ходу процесу	m ₁ = 30 кг, m ₂ = 62.068 г.

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник	Методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору	Нормативна характеристика показника
1	2	3	4	5
КТ2.2 Приготування продукту	Маса води для ін'єкцій Температура води для ін'єкцій рН розчину Маса хітозану Тривалість перемішування	Ваги Термометр Потенціометр Таймер	Всі показники контролюються по ходу процесу	m1 = 70 кг, t = 25 °С, рН = 6.5, m2 = 30 кг, T = 50 хв.
КТ3.1 Стерилізуюча фільтрація, наповнення у флакони та запаювання	Об'єм флаконів Об'єм наповнення Розмір пластинки Рейтинг фільтра Контроль відповідно до АНД	Контролер автомату наповнення Сертифікат фільтра Відповідно до АНД	Сертифікати якості під час отримання, об'єми, розмір пластинки під час процесу, контроль відповідно до АНД після закінчення процесу	V ₁ = 1.2 мл, V ₂ = 1.0 мл, S = 0.2 мкм.
КТ4.1 Пакування готового лікарського засобу	Температура зберігання ГЛЗ Вологість зберігання ГЛЗ	Термометр Гігрометр	Всі показники контролюються по ходу процесу	t = 2÷8 °С, RH < 40 %.
КТ5.1 Мийка реактора	Об'єм миючого засобу Об'єм води очищеної Об'єм води для ін'єкцій Температура стерилізації Тривалість стерилізації	Витратомір Термометр Таймер	Всі показники контролюються по ходу процесу	V ₁ = 100 л, V ₂ = 100 л, V ₃ = 100 л, t = 121 °С, T = 15 хв.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Indu Pal Kaur & R. Smitha (2002) Penetration Enhancers and Ocular Bioadhesives: Two New Avenues for Ophthalmic Drug Delivery, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 28:4, 353-369, DOI: 10.1081/DDC-120002997
2. Sánchez-López E, Espina M, Doktorovova S, Souto EB, García ML. Lipid nanoparticles (SLN, NLC): Overcoming the anatomical and physiological barriers of the eye - Part I - Barriers and determining factors in ocular delivery. *Eur J Pharm Biopharm.* 2017 Jan;110:70-75. doi: 10.1016/j.ejpb.2016.10.009. Epub 2016 Oct 24. PMID: 27789358.
3. M. Ways, T.M.; Lau, W.M.; Khutoryanskiy, V.V. Chitosan and Its Derivatives for Application in Mucoadhesive Drug Delivery Systems. *Polymers* 2018, 10, 267. <https://doi.org/10.3390/polym10030267>
4. Shaikh R, Raj Singh TR, Garland MJ, Woolfson AD, Donnelly RF. Mucoadhesive drug delivery systems. *J Pharm Bioallied Sci.* 2011 Jan;3(1):89-100. doi: 10.4103/0975-7406.76478. PMID: 21430958; PMCID: PMC3053525.
5. Agnihotri SA, Aminabhavi TM. Chitosan nanoparticles for prolonged delivery of timolol maleate. *Drug Dev Ind Pharm.* 2007 Nov;33(11):1254-62. doi: 10.1080/03639040701384942. PMID: 18058322.
6. Петрович Ю. А., Григорьянц Л. А., Гурин А. Н., Гурин Н. А. Хитозан: структура и свойства. Использование в медицине. *Стоматология.* 2008, 87(4): 72-78.
7. Хитозан в медицине. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://sonat-chitin.ru/chitozan-v-meditsine/>
8. Наноконпозиты на основе хитозана. [Электронный ресурс]. Режим доступа: http://perst.issp.ras.ru/Control/Inform/perst/2015/15_8/n.php?file=perst.htm&label=D_15_8_4
9. Горшенин Д. С., Жернов Ю. В., Кривцов Г. Г., Хайтов М. Р. Применение хитозана и его производных в иммунотерапии злокачественных новообразований. *Иммунология.* 2020, 41(5): 470-478. doi: 10.33029/0206-4952-2020-41-5-470-478
10. Лозбина Н. В., Большаков И. Н., Лазаренко В. И. Свойства хитозана и его применение в офтальмологии. *Сибирское медицинское обозрение.* 2015, 5 (95): 5-13.
11. Zhang Y., Chan H.F., Leong K.W. Advanced materials and processing for drug delivery: The past and the future. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2013, 65(1):104–120.

12. Khutoryanskiy V. V. Advances in mucoadhesion and mucoadhesive polymers. *Macromol. Biosci.* 2011, 11(6): 748–764.
13. Mansuri S., Kesharwani P., Jain K., Tekade R. K., Jain N. K. Mucoadhesion: A promising approach in drug delivery system. *React. Funct. Polym.* 2016, 100: 151–172.
14. Mackie A. R., Goycoolea F. M., Menchicchi B. Innovative methods and applications in mucoadhesion research. *Macromol. Biosci.* 2017, 17, (8):1-32.
15. Khutoryanskaya O. V., Morrison P. W. J., Seilkhanov S. K., Mussin M. N., Ozhmukhametova E. K., Rakhypbekov T. K., Khutoryanskiy V. V. Hydrogen-bonded complexes and blends of poly(acrylic acid) and methylcellulose: Nanoparticles and mucoadhesive films for ocular delivery of riboflavin. *Macromol. Biosci.* 2014, 14(2): 225-234.
16. Абилова Г.К. Разработка технологии получения гидрогелевых лекарственных форм и повязок. Дис. на соиск. степени доктора философии (PhD): 6D072100 – Химическая технология органических веществ. — Казахский национальный университет имени аль-Фараби. — Алматы: 2019. — 135 с.
17. Tandel H. T., Parmar H. K., Pandya K. K., Pardasani L. J., Panchal V. S. A systematic review on mucoadhesive drug delivery system. *World J. Pharm.* 2017, 6: 337-366.
18. Boddupalli B. M., Mohammed Z. N., Nath R. A., Banji D. Mucoadhesive drug delivery system: An overview. *Journal of advanced pharmaceutical technology & research.* 2010, 1 (4): 381.
19. Karki S., Kim H., Na S. J., Shin D., Jo K., Lee J. Thin films as an emerging platform for drug delivery. *Asian J. Pharm. Sci.* 2016, 11: 559–574.
20. Morales J. O., McConville J. T. Manufacture and characterization of mucoadhesive buccal films. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2011, 77: 187–199.
21. Shah D., Gaud R. S., Misra A. N., Parikh R. Formulation of a water soluble mucoadhesive film of lycopene for treatment of leukoplakia. *Int J Pharm Sci Rev Res.* 2010, 2(1): 6-10.
22. Punitha S., Girish Y. Polymers in mucoadhesive buccal drug delivery system: A review. *Int J Res Pharm Sci.* 2010, 1(2): 170-186.

23. Laffleur F., Shahnaz G., Islambulchilar Z., Bernkop-Schnürch A. Design and in vitro evaluation of a novel polymeric excipient for buccal applications. *Future Medicinal Chemistry*. 2013, 5(5): 511–522. doi:10.4155/fmc.13.33.
24. Lokhande S. D., Lahoti S. S. Buccoadhesive Drug Delivery System: Need 1. *Asian J. Biomed. Pharm. Sci.* 2012, 2: 29–36.
25. Rajput G. C., Majmudar F. D., Patel J. K., Patel K. N., Thakor R. S., Patel B. P., Rajgor N. B. Stomach specific mucoadhesive tablets as controlled drug delivery system—A review work. *Int J Pharm Biol Res*, 2010, 1: 30-41.
26. Tripathi J., Thapa P., Maharjan R., Jeong S. Current State and Future Perspectives on Gastroretentive Drug Delivery Systems. *Pharmaceutics*. 2019, 11: 1-22. Doi: 10.3390/pharmaceutics11040193.
27. Komati S., Swain S., Rao M. E. B., Jena B. R., Dasi V. Mucoadhesive multiparticulate drug delivery systems: An extensive review of patents. *Advanced pharmaceutical bulletin*. 2019, 9(4): 521. doi: 10.15171/apb.2019.062
28. Patil, H., Tiwari, R. V., Repka M. A. Recent advancements in mucoadhesive floating drug delivery systems: A mini-review. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2016, 31: 65-71.
29. Madan J. Mucosal Drug Delivery System. *Int J Pharm Biosci*. 2010, 1: 63-70.
30. Phanindra B. Recent advances in mucoadhesive/bioadhesive drug delivery system: A review. *Int J Pharm Med and Bio Sci*. 2013, 2(1): 68-84.
31. Chechare D. D., Siddaiah M. Mucoadhesive Drug Delivery System: A Review. *Am. J. PharmTech Res*. 2018, 8(6): 16-22.
32. Casettari L., Vllasaliu D., Castagnino E., Stolnik S., Howdle S., Illum L. PEGylated chitosan derivatives: Synthesis, characterisations and pharmaceutical applications. *Prog. Polym. Sci.* 2012, 37: 659–685.
33. Sogias I. A.; Williams A. C.; Khutoryanskiy V. V. Why is chitosan mucoadhesive. *Biomacromolecules*. 2008, 9: 1837–1842.
34. Kulkarni A. D., Patel H. M., Surana S. J., Vanjari Y. H., Belgamwar V. S.; Pardeshi C. V. *N,N,N*-Trimethyl chitosan: An advanced polymer with myriad of opportunities in nanomedicine. *Carbohydr. Polym.* 2017, 157: 875–902.

35. Upadhyaya L., Singh J., Agarwal V., Tewari R.P. The implications of recent advances in carboxymethyl chitosan based targeted drug delivery and tissue engineering applications. *J. Control. Release.* 2014, 186: 54–87.
36. Barthelmes J., Perera G., Hombach J., Dünnhaupt S., Bernkop-Schnürch A. Development of a mucoadhesive nanoparticulate drug delivery system for a targeted drug release in the bladder. *Int. J. Pharm.* 2011, 416: 339–345.
37. Dünnhaupt S., Barthelmes J., Thurner C.C., Waldner C., Sakloetsakun D.; Bernkop-Schnürch A. S-protected thiolated chitosan: Synthesis and in vitro characterization. *Carbohydr. Polym.* 2012, 90: 765–772.
38. Watts P., Smith A., Hinchcliffe M. ChiSys® as a chitosan-based delivery platform for nasal vaccination. *In Mucosal Delivery of Biopharmaceuticals.* 2014, 499-516. doi: 10.1007/978-1-4614-9524-6_23
39. Bonengel S., Bernkop-Schnürch A. Thiomers—from bench to market. *Journal of controlled release.* 2014, 195, 120-129. doi: 10.1016/j.jconrel.2014.06.047
40. Azuma K., Izumi R., Osaki T., Ifuku S., Morimoto M., Saimoto H., et al. Chitin, chitosan, and its derivatives for wound healing: old and new materials. *Journal of functional biomaterials.* 2015, 6(1), 104-142.
41. Dhillon G. S., Kaur S., Brar S. K., Verma M. Green synthesis approach: extraction of chitosan from fungus mycelia. *Critical reviews in biotechnology.* 2013, 33(4): 379-403. doi: 10.3109/07388551.2012.717217
42. Elieh-Ali-Komi D., Hamblin M. R. Chitin and chitosan: production and application of versatile biomedical nanomaterials. *International journal of advanced research.* 2016, 4(3): 411.
43. Sebastian J., Rouissi T., Brar S. K. Fungal chitosan: prospects and challenges. *Handbook of Chitin and Chitosan.* 2020, 1: 419-452. doi:10.1016/b978-0-12-817970-3.00014-6.
44. Ghormade V., Pathan E. K., Deshpande M. V. Can fungi compete with marine sources for chitosan production? *International journal of biological macromolecules.* 2017, 104, 1415-1421. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.01.112

45. Hamed I., Özogul F., Regenstein J. M. Industrial applications of crustacean by-products (chitin, chitosan, and chitooligosaccharides): A review. *Trends in food science & technology*. 2016, 48: 40-50. doi: 10.1016/j.tifs.2015.11.007
46. Tsigos I., Martinou A., Kafetzopoulos D., Bouriotis V. Chitin deacetylases: new, versatile tools in biotechnology. *Trends in biotechnology*. 2000, 18(7): 305-312.
47. Aranda-Martinez A., Grifoll-Romero L., Aragunde H., Sancho-Vaello E., Biarnés X., Lopez-Llorca L. V., Planas A. Expression and specificity of a chitin deacetylase from the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* potentially involved in pathogenicity. *Scientific reports*. 2018, 8(1): 1-12. doi: 10.1038/s41598-018-19902-0
48. Aktuganov G. E., Melent'ev A. I. Specific features of chitosan depolymerization by chitinases, chitosanases, and nonspecific enzymes in the production of bioactive chitooligosaccharides (Review). *Appl. Biochem. Microbiol*. 2017, 53: 611–627.
49. Pacheco N., Garnica-Gonzalez M., Gimeno M., Bárzana E., Trombotto S., David L., Shirai K. Structural characterization of chitin and chitosan obtained by biological and chemical methods. *Biomacromolecules*. 2011, 12(9): 3285-3290. doi: 10.1021/bm200750t
50. Schmitz C., González Auza L., Koberidze D., Rasche S., Fischer R., Bortesi L. Conversion of chitin to defined chitosan oligomers: current status and future prospects. *Marine drugs*. 2019, 17(8): 452. doi: 10.3390/md17080452
51. Grifoll-Romero L., Pascual S., Aragunde H., Biarnés X., Planas A. Chitin deacetylases: Structures, specificities, and biotech applications. *Polymers*. 2014, 10(4), 352. doi: 10.3390/polym10040352
52. Tuveng T. R., Rothweiler U., Udatha G., Vaaje-Kolstad G., Smalås A., Eijsink V. G. Structure and function of a CE4 deacetylase isolated from a marine environment. *PLoS One*. 2017, 12(11): e0187544. doi: 10.1371/journal.pone.0187544
53. Suresh P. V., Sakhare P. Z., Sachindra N. M., Halami P. M. Extracellular chitin deacetylase production in solid state fermentation by native soil isolates of *Penicillium monoverticillium* and *Fusarium oxysporum*. *J. Food Sci. Technol*. 2014, 51: 1594–1599. doi: 10.1007/s13197-012-0676-1
54. Younes I., Rinaudo M. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. *Marine drugs*. 2015, 13(3): 1133-1174. doi:10.3390/md13031133

55. Smith A., Perelman M., Hinchcliffe M. Chitosan: a promising safe and immune-enhancing adjuvant for intranasal vaccines. *Human vaccines & immunotherapeutics*. 2014, 10(3): 797-807. doi: 10.4161/hv.27449
56. Amidi M., Mastrobattista E., Jiskoot W., Hennink W. E. Chitosan-based delivery systems for protein therapeutics and antigens. *Advanced drug delivery reviews*. 2010, 62(1): 59-82.
57. Xu Q., Wang C. H., Wayne Pack D. Polymeric carriers for gene delivery: chitosan and poly (amidoamine) dendrimers. *Current pharmaceutical design*. 2010, 16(21): 2350-2368
58. Kaur K., Dattajirao V., Shrivastava V., Bhardwaj U. Isolation and characterization of chitosan-producing bacteria from beaches of Chennai, India. *Enzyme research*. 2012. doi: 10.1155/2012/421683
59. Pacheco N., Trombotto S., David L., Shirai K. Activity of chitin deacetylase from *Colletotrichum gloeosporioides* on chitinous substrates. *Carbohydrate polymers*. 2013, 96(1): 227-232. doi: 10.1016/j.carbpol.2013.03.051
60. Aye K. N., Karuppuswamy R., Ahamed T., Stevens W. F. Peripheral enzymatic deacetylation of chitin and reprecipitated chitin particles. *Bioresource Technology*. 2006, 97(4): 577-582. doi: 10.1016/j.biortech.2005.03.030
61. Pareek N., Vivekanand V., Dwivedi P., Singh R. P. *Penicillium oxalicum* SAEM-51: a mutagenised strain for enhanced production of chitin deacetylase for bioconversion to chitosan. *New biotechnology*. 2011, 28(2): 118-124. doi: 10.1016/j.nbt.2010.09.009
62. Sun Y., Zhang J., Wu S., Wang S. Statistical optimization for production of chitin deacetylase from *Rhodococcus erythropolis* HG05. *Carbohydrate Polymers*. 2014, 102, 649–652. doi: 10.1016/j.carbpol.2013.11.010
63. Ramos-Puebla A., De Santiago C., Trombotto S., David L., Larralde-Corona C. P., Shirai K. Addition of abscisic acid increases the production of chitin deacetylase by *Colletotrichum gloeosporioides* in submerged culture. *Process Biochem*. 2016, 51: 959–966. doi: 10.1016/j.procbio.2016.05.003
64. Ma Q., Gao X., Bi X., Tu L., Xia M., Shen Y., Wang M. Isolation, characterisation, and genome sequencing of *Rhodococcus equi*: a novel strain producing chitin deacetylase. *Scientific reports*. 2020, 10(1), 1-9. doi: 10.1038/s41598-020-61349-9

65. Dhillon G. S., Kaur S., Brar S. K., Verma M. Green synthesis approach: extraction of chitosan from fungus mycelia. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2012, 33(4): 379–403. doi:10.3109/07388551.2012.717217
66. Zhang H., Yun S., Song L., Zhang Y., Zhao Y. The preparation and characterization of chitin and chitosan under large-scale submerged fermentation level using shrimp by-products as substrate. *International journal of biological macromolecules*. 2017, 96: 334-339. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.12.017
67. Chatterjee S., Adhya M., Guha A. K., Chatterjee B. P. Chitosan from *Mucor rouxii*: production and physico-chemical characterization. *Process Biochemistry*. 2005, 40(1): 395-400. doi: 10.1016/j.procbio.2004.01.025
68. Chatterjee S., Chatterjee S., Chatterjee B. P., Guha A. K. Influence of plant growth hormones on the growth of *Mucor rouxii* and chitosan production. *Microbiological research*. 2009, 164(3): 347-351. doi: 10.1016/j.micres.2007.05.003
69. Fai A. E. C., Stamford T., Stamford-Arnaud T. M., Santa-Cruz P. D., Silva M. C. Campos-Takaki G. M., Stamford T. L. Physico-chemical characteristics and functional properties of chitin and chitosan produced by *Mucor circinelloides* using yam bean as substrate. *Molecules*. 2011, 16(8), 7143-7154. doi: 10.3390/molecules16087143.
70. Gharieb M. M., El-Sabbagh S. M., Shalaby M. A., Darwesh O. M. Production of chitosan from different species of zygomycetes and its antimicrobial activity. *Int. J. Sci. Eng. Res*. 2015, 6: 123-130.
71. Zhang H., Yang S., Fang J., Deng Y., Wang D., Zhao Y. Optimization of the fermentation conditions of *Rhizopus japonicus* M193 for the production of chitin deacetylase and chitosan. *Carbohydrate polymers*. 2014, 101, 57-67. doi: 10.1016/j.carbpol.2013.09.015
72. Chatterjee S., Guha A. K., Chatterjee B. P. Evaluation of quantity and quality of chitosan produce from *Rhizopus oryzae* by utilizing food product processing waste whey and molasses. *Journal of environmental management*. 2019, 251: 109565. doi: 10.1016/j.jenvman.2019.109565
73. Tasar O. C., Erdal S., Taskin M. Chitosan production by psychrotolerant *Rhizopus oryzae* in non-sterile open fermentation conditions. *International journal of biological macromolecules*. 2016, 89, 428-433. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.05.007

74. Tai C., Li S., Xu Q., Ying H., Huang H., Ouyang P. Chitosan production from hemicellulose hydrolysate of corn straw: impact of degradation products on *Rhizopus oryzae* growth and chitosan fermentation. *Letters in applied microbiology*. 2010, 51(3): 278-284. doi: 10.1111/j.1472-765X.2010.02893.x
75. Chatterjee S., Chatterjee S., Chatterjee B. P., Guha A. K. Enhancement of growth and chitosan production by *Rhizopus oryzae* in whey medium by plant growth hormones. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2008, 42(2): 120-126. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2007.10.006.
76. Cardoso A., Lins C. I. M., Dos Santos E. R., Silva M. C. F., Campos-Takaki G. M. Microbial enhance of chitosan production by *Rhizopus arrhizus* using agroindustrial substrates. *Molecules*. 2012, 17(5): 4904-4914. doi: 10.3390/molecules17054904
77. Namboodiri M. T., Pakshirajan K. Sustainable and green approach of chitosan production from *Penicillium citrinum* biomass using industrial wastewater as a cheap substrate. *Journal of environmental management*. 2019, 240: 431-440. doi: 10.1016/j.jenvman.2019.03.085.
78. Dos Santos E. R., Da Silva M. C. F., De Souza P. M., Da Silva A. C., De Paiva S. C., Albuquerque C. D. et al. Enhancement of *Cunninghamella elegans* UCP/WFCC 0542 biomass and chitosan with amino acid supply. *Molecules*. 2013, 18(9): 10095-10107.. doi: 10.3390/molecules180910095.
79. Vaingankar P. N., Juvekar A. R. Fermentative production of mycelial chitosan from zygomycetes: media optimization and physico-chemical characterization. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 2014, 5(12): 940. doi: 10.4236/abb.2014.512108
80. Davoust N., Persson A. Effects of growth morphology and time of harvesting on the chitosan yield of *Absidia repens*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1992, 37(5): 572-575. doi: 10.1007/BF00240727
81. Maghsoudi V., Razavi J., Yaghmaei S. Production of chitosan by submerged fermentation from *Aspergillus niger*. *Scientia Iranica*. 2009, 16(2):145-148
82. Logesh A., Thillaimaharani K., Sharmila K., Kalaiselvam M., Raffi S. Production of chitosan from endolichenic fungi isolated from mangrove environment and its antagonistic activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2012, 2(2): 140–143. doi: 10.1016/s2221-1691(11)60208-6

83. Synowiecki J., Al-Khateeb N. A. A. Q. Mycelia of *Mucor rouxii* as a source of chitin and chitosan. *Food chemistry*. 1997, 60(4): 605-610. doi: 10.1016/S0308-8146(97)00039-3.
84. Nwe N., Furuike T., Tamura H. Production of fungal chitosan by enzymatic method and applications in plant tissue culture and tissue engineering: 11 years of our progress, present situation and future prospects. *Biopolymers*. 2010, 7(135): e162.
85. Синдром сухого ока. Клінічна настанова, заснована на доказах. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://dec.gov.ua/wp-content/uploads/2019/11/2019_10_02_kn_syndrom_soka.pdf
86. Бай У. А. Синдром сухого ока. *Медсестринство*. 2019, (2): 74-75. doi: 10.11603/2411-1597.2019.2.10220
87. Nepp J., Knoetzi W., Prinz A., Hoeller S., Prinz M. Management of moderate-to-severe dry eye disease using chitosan-N-acetylcysteine (Lacrimera®) eye drops: a retrospective case series. *International ophthalmology*. 2020, 40(6): 1547-1552. doi: 10.1007/s10792-020-01324-5
88. Li J., Liu D., Tan G., Zhao Z., Yang X., Pan W. A comparative study on the efficiency of chitosan-N-acetylcysteine, chitosan oligosaccharides or carboxymethyl chitosan surface modified nanostructured lipid carrier for ophthalmic delivery of curcumin. *Carbohydrate polymers*. 2016, 146: 435-444. doi: 10.1016/j.carbpol.2016.03.079
89. Schuerer N., Stein E., Inic-Kanada A., Ghasemian E., Stojanovic M., Montanaro J., et al. Effects of chitosan and chitosan N-acetylcysteine solutions on conjunctival epithelial cells. *Journal of EuCornea*. 2018, 1(1): 12-18. doi: 10.1016/j.xjec.2018.04.002
90. Lacrimera Croma Gtt Opht Monodosen. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://surl.li/ymzx>
91. НАСЕЛЕННЯ УКРАЇНИ за 2019 рік Демографічний щорічник. [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://database.ukrcensus.gov.ua/PXWEB2007/ukr/publ_new1/2020/zb_nas_2019.pdf
92. Хвороба “сухого ока”: причини та профілактика. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://moz.gov.ua/article/health/hvoroba-suhogo-oka-prichini-ta-profilaktika>

93. Індекс здоров'я. Україна. Тимошенська В., Захожа В., Степурко Т., Шевченко М., Юрочко Т. Київський міжнародний інститут соціології, Школа охорони здоров'я Національного університету «Київо-Могилянська академія» НаУКМА, 2016, УДК 614.2(477)(083.94)(062.551), http://health-index.com.ua/zvit_index_2016_ukr.pdf

94. Philibert T, Lee BH, Fabien N. Current Status and New Perspectives on Chitin and Chitosan as Functional Biopolymers. *Appl Biochem Biotechnol.* 2017 Apr;181(4):1314-1337. doi: 10.1007/s12010-016-2286-2.

95. Kaur S, Dhillon GS. Recent trends in biological extraction of chitin from marine shell wastes: a review. *Crit Rev Biotechnol.* 2015 Mar;35(1):44-61. doi: 10.3109/07388551.2013.798256.

96. Инжиниринг и комплексные поставки биотехнологического оборудования. [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://biotechno.ru/about_company/articles/kak-vybrat-pravilnyy-impeller-dlya-svoey-kultury/

97. Красінько В. О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв: конспект лекцій для здобув. освіт. ступ. «бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія». – К.: НУХТ, 2019. – с. 144-157.

98. Пирог Т. П., Антонюк М.М. Загальна мікробіологія і вірусологія: лабораторний практикум для студ. освітнього ступеня «Бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія». – К.: НУХТ, 2016. – с. 21-35.

99. Бондаренко О. С., Івченко Д. А. Технології аналізу рівня глюкози в організмі людини. *Міжнародний науковий журнал.* 2016, 6 (2): 60-65.

100. Методичні вказівки для підготовки до практичних занять з біологічної хімії (для студентів медичних факультетів). Частина 2. Біохімія гормонів. Обмін вуглеводів і ліпідів / О. А. Наконечна, С. О. Стеценко. – Харків: ХНМУ, 2017. – 98 с.

101. ОФС.1.7.2.0027.15 Определение общего азота с реактивом Несслера в иммунобиологических лекарственных препаратах. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-7-2-0027-15-opredelenie-obshhego-azota-s-reaktivom-nesslera-v-immunobiologicheskikh-lekarstvennyh-preparatah/>

102. Державна Фармакопея України, друге видання, Втрата в масі під час висушування

103. ДФУ. — 1-ше вид. — Х., 2001; Фармацевтичні та медико-біологічні аспекти ліків / І.М. Перцев, О.Х. Пімінов, М.М. Слободянюк та ін.; за ред. І.М. Перцева. — Вінниця, 2007.

104. ЛІКАРСЬКІ ЗАСОБИ, Належна виробнича практика, Державна наукова установа «Науково-технологічний комплекс «Інститут монокристалів» Національної академії наук України», 2020р, М. Ляпунов, д-р фарм. наук, О. Безугла, канд. фарм. наук, Н. Тахтаулова, канд. фарм. наук, Ю. Підпружников, д-р фарм. наук, В. Загорій, д-р фарм. наук.

105. ЛІКАРСЬКІ ЗАСОБИ, Якість води для застосування у фармації, Державне підприємство «Державний науковий центр лікарських засобів і медичної продукції» (ДП «ДНЦЛЗ») та Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2013р, М. Ляпунов, д-р фарм. наук; О. Безугла, канд. фарм. наук; О. Гризодуб, д-р хім. наук; Т. Тихоненко; К. Жемерова, канд. фарм. наук; О. Соловйов, канд. мед. наук