

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

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

«До захисту в ЕК»
Директор інституту (декан
факультету)

(підпис) Наталія ГРЕГІРЧАК
(ім'я та прізвище)

«___» лютого 2022 р.

«До захисту допущено»
Завідувач кафедри

(підпис) Віктор СТАБНІКОВ
(ім'я та прізвище)

«___» лютого 2022 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ МАГІСТРА

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код та назва спеціальності)

освітньо-професійної програми «Фармацевтична біотехнологія»

на тему: Біотехнологічні аспекти одержання амілаз медичного призначення

Виконав: здобувач II курсу, групи 2м

КОЗАЧЕНКО Євгеній Русланович

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Керівник СЛОБОДЯН Ольга Петрівна

(прізвище, ім'я та по батькові повністю)

(підпис)

Консультанти

(ім'я та прізвище)

(підпис)

(ім'я та прізвище)

(підпис)

(ім'я та прізвище)

(підпис)

Рецензент Юлія ВАСИЛЬЄВА

(ім'я та прізвище)

(підпис)

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

Здобувач _____

(підпис)

Київ – 2022 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

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

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

біотехнології і мікробіології

Віктор СТАБНІКОВ
“03” листопада 2021 року

ЗАВДАННЯ

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

КОЗАЧЕНКА Євгенія Руслановича

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Біотехнологічні аспекти одержання амілаз медичного призначення

керівник роботи СЛОБОДЯН Ольга Петрівна, 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 об'єм ферментера 100 л. Коефіцієнт заповнення 0,6. Продуцент *Bacillus* sp. WangLB.

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) Робота складається зі вступу, семи розділів, графічної частини (технологічної та апаратурної схем) та списку використаної літератури.

5. Перелік графічного матеріалу

2 рисунок, 2 креслення формату 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

№ п/п	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Вступ. Літературний огляд	03.11.2021 – 17.11.2021	
2	Розділ 1. Властивості амілаз, що дозволяють використовувати ферменти в медицині.	18.11.2021 – 30.11.2021	
3	Розділ 2. Біотехнологія амілаз	01.12.2021 – 09.12.2021	
4	Розділ 3. Техніко-економічне обґрунтування	10.12.2021 – 22.12.2022	
5	Розділ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми біосинтезу субстанції	23.12.2021 – 31.12.2021	
6	Розділ 5. Специфікація обладнання	01.01.2022 – 07.01.2022	
7	Розділ 6. Опис технологічної схеми	08.01.2022 – 15.01.2022	
8	Розділ 7. Контроль виробництва	16.01.2022 – 22.01.2022	
9	Список використаних джерел. Реферат	23.01.2022 – 01.02.2022	

Здобувач _____
(підпис)

Євгеній КОЗАЧЕНКО _____
(ім'я та прізвище)

Керівник роботи _____
(підпис)

Ольга СЛОБОДЯН _____
(ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Робота присвячена виробництву інноваційного препарату – Sollpura (ліпротамаза), для лікування дизфункції шлунку та кишківника, до складу якого входить амілаза (продуцент *Bacillus sp. WangLB*). Робота складається зі вступу, семи розділів, графічної частини (технологічної та апаратурної схем) та списку використаної літератури з 90 найменувань. Загальний обсяг проекту – 89 сторінок, 8 таблиць, 2 рисунка, 2 креслення формату А1.

У кваліфікаційній роботі розраховано техніко-економічне обґрунтування річної потреби ліпротамази, наведено обґрунтування та викладено технологічний процес одержання амілази, який включає в себе допоміжні та основні операції для одержання готового препарату.

Технологічна та апаратурна схеми процесу представлена у графічній частині роботи на 2 аркушах формату А1.

Ключові слова: ферменти, *Bacillus sp*, амілаза, *Sollpura*, поживне середовище, біосинтез.

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	4
ВСТУП.....	7
ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД	
РОЗДІЛ 1. ВЛАСТИВОСТІ АМІЛАЗ, ЩО ДОЗВОЛЯЮТЬ ВИКОРИСТОВУВАТИ ФЕРМЕНТИ В МЕДИЦИНІ.....	9
РОЗДІЛ 2. БІОТЕХНОЛОГІЯ АМІЛАЗ.....	16
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ.....	22
3.1. Передумови виробництва ЛЗ Sollpura.....	22
3.1.1. Аналіз фармакологічних властивостей цільового ЛЗ, галузей використання.....	22
3.1.2. Обсяг ринку та очікувані темпи його розвитку.....	23
3.1.3. Розрахунок потреби у субстанції для випуску ЛЗ.....	24
3.1.4. Розрахунок річної потужності виробництва субстанції, об'єму ферментера та кількості виробничих циклів.....	24
РОЗДІЛ 4. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ СУБСТАНЦІЇ	29
4.1. Обґрунтування вибору біологічного агенту, поживного середовища для його культивування.....	29
4.2. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера.....	32
4.3. Обґрунтування вибору стадії підготовки повітря	34
4.4. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів.....	35
4.5. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища	37
4.6. Обґрунтування стадій виділення і очищення субстанції для виробництва лікарського засобу.....	39
4.7. Обґрунтування вибору товарної форми випуску продукту мікробного синтезу Sollpura (упаковки).....	47
РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДАННЯ.....	49
РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	53
РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	66

7.1. Мікробіологічний контроль	66
7.2. Показники росту і синтезу	66
7.3. Визначення концентрації джерел вуглецю і азоту	68
7.4. Контроль виробництва	70
7.4.1. Визначення молекулярної маси амілази	70
7.4.2. Визначення активності ферменту	70
7.4.3. Вологість кінцевого продукту	71
7.5. Карта постадійного контролю	72
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	78

ВСТУП

Фармацевтична та біомедична сфери на сьогодні є об'єктом для науковців – необхідно вирішувати наслідки тривалого неправильного та незбалансованого харчування, а також генетичні та набуті хвороби, кількість яких помітно зросла в останні десятиліття [1, 2]. Тож на сьогодні дослідження біологічної дії багатофункціональних ферментів є актуальним питанням. І одним з таких ферментів може бути α -амілази.

α -Амілази належать до глікозидгідролаз – ферментів, здатних метаболізувати різноманітні сахариди. З моменту відкриття амілаз, дані ферменти знайшли своє застосування у різноманітних сферах життя людини [3, 4]:

- Харчова промисловість (наприклад, оцукрення крохмалів, виробництво спиртів, хлібобулочних виробів).
- Виробництво паперу та дезінфекція текстилю.
- Розкладання сільськогосподарських відходів.
- Фармацевтична та біомедична сфера.

Але варто зазначити про прицільну увагу дослідників різних країн на дослідження стабільності мікробних амілаз за дії різноманітних чинників (наприклад, рН, температура, солоність) для подальшого розширення можливостей застосування даних ферментів.

Більш детальне дослідження властивостей амілаз дозволило розширити їх сфери застосування – до харчової та паперової індустрії долучилися і фармацевтична та біомедична сфера. Поки останні сфери ще не досконало вивчені. Але це ще більше мотивує дослідників до більш детального аналізу цього питання.

					НУХТ БТЕК 02.02.06 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Козаченко Є.Р.			ВСТУП	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Слободян О.П.					5	89
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Говорячи про медицину варто відмітити використання амілаз при лікуванні розладів роботи шлунково-кишкового тракту, наприклад, у замісній терапії панкреатичних ферментів (pancreatic enzyme replacement therapy). Амілаза входить до складу інноваційного препарату – Sollpura (ліпротамаза), який допомагає розщеплювати сахариди до простих цукрів [5].

Тож актуальною є робота присвячена синтезу ферменту – амілази – складового препарату для лікування дизфункції шлунку та кишківника [5].

Новизною даної роботи є розробка технології отримання мікробної амілази, шляхом використання продуцента *Bacillus sp. WangLB*, що синтезує 26670 ОД/мл амілази [6].

ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

РОЗДІЛ 1. ВЛАСТИВОСТІ АМІЛАЗ, ЩО ДОЗВОЛЯЮТЬ ВИКОРИСТОВУВАТИ ФЕРМЕНТИ В МЕДИЦИНІ

Фармацевтична та біомедична сфери на сьогодні є об'єктом для науковців – необхідно вирішувати наслідки тривалого неправильного та незбалансованого харчування, а також генетичні та набуті хвороби, кількість яких помітно зросла в останні десятиліття [1, 2]. Тож на сьогодні дослідження біологічної дії багатофункціональних ферментів є актуальним питанням. І одним з таких ферментів може бути α -амілази.

α -Амілази належать до глікозидгідролаз – ферментів, здатних метаболізувати різноманітні сахариди. З моменту відкриття амілаз, дані ферменти знайшли своє застосування у різноманітних сферах життя людини [3, 4]:

- Харчова промисловість (наприклад, оцукрення крохмалів, виробництво спиртів, хлібобулочних виробів).
- Виробництво паперу та дезінфекція текстилю.
- Розкладання сільськогосподарських відходів.
- Фармацевтична та біомедична сфера.

Історія амілаз датується ще з 1811 року після відкриття даних ферментів вченим Kirchoff. І уже в 1894 році розпочалися перші промислові синтези грибних амілаз [7].

Варто відмітити, що на даний момент, пройшло досить багато часу від першого промислового запуску виробництва мікробних амілаз. І тому не дивно, що на ринку наявний широкий вибір даних ферментів різного спектру призначення (табл. 1.1).

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	НУХТ БТЕК 02.02.06 КР ПЗ			
Розроб.		Козаченко С.Р.			ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД РОЗДІЛ 1. ВЛАСТИВОСТІ АМІЛАЗ, ЩО ДОЗВОЛЯЮТЬ ВИКОРИСТОВУВАТИ ФЕРМЕНТИ В МЕДИЦИНІ	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Слободян О.П.					8	89
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Наявні комерційні виробники α -амілази [8]

Комерційна назва α -амілази	Виробник	Продуцент	Застосування
AmzymeTX	Parchem	<i>Bacillus amyloliquifaciens</i>	Харчові продукти та корма
Aquazym1201	Novo Nordisk, Denmark	-	Знезараження текстильних виробів
AquazymUltra2501		-	
Thermamyl®, Takaterm		<i>Bacillus licheniformis</i>	Виробництво детергентів та паперу
Enzymex(Cocktail)	Exotic Biosolutions Pvt.Ltd	<i>Bacillus amyloliquifaciens</i>	Харчові продукти та корма
Fructamyl® FHT	ERBSLOEH	-	Оцукрення крохмалю
Liquozyme® SC DC	Novozymes	Genetically engineered from <i>Bacillus licheniformis</i>	
Natalase®		-	Виробництво детергентів
Stainzyme® plus		Genetically engineered	
BAN™		<i>Bacillus amyloliquifaciens</i>	Харчові продукти та корма, виробництво паперу
ValidaseBAA	DSM Valley Research	<i>Bacillus amyloliquifaciens</i>	Харчова промисловість
VERON® XTENDER	AB enzymes	-	Пекарство

Примітки. «-» – інформація відсутня.

Різноманітні фізико-хімічні та антимікробні властивості амілаз сприяють використанню останніх в медицині або суміжних областях. Розглянемо використання амілаз як ферментів, що розщеплюють полімерні молекули.

З 1864 року α -амілази використовувалися для лікування розладів травлення. Так як оболонки ліків складаються з полімерів, які розкладаються під впливом певного рівня рН в організмі людини, при розладах травлення не

завжди вивільнення ліків відбувається коректно. Тут в дію вступають α -амілази, які розчіплюють полімери і сприяють вивільненню ліків в організм пацієнта [7].

На сьогодні відоме застосування мікробних амілаз в якості рідкого стабільного реагенту для системи Ciba Corning Express, що використовується для клінічної хімії, також амілази застосовується при детекції олігосахаридів (що утворюються при взаємодії полімерів з ферментом) та різноманітних медичних біосенсорів [4]. Говорячи про медицину варто відмітити використання амілаз при лікуванні розладів роботи шлунково-кишкового тракту, наприклад, у замісній терапії панкреатичних ферментів (pancreatic enzyme replacement therapy). Амілаза входить до складу інноваційного препарату – Sollpura (ліпротамаза), який допомагає розщеплювати сахариди до простих цукрів [7].

Також доволі незвичним є застосування мікробних амілаз в складі кормових добавок [9]. Таке застосування є чудовою альтернативою кормовим антибіотиками, останні в свою чергу можуть спричинити антибіотикорезистентність. Застосування мікробних ферментів (в тому числі амілаз) для попередньої обробки кормів для годування птахів забезпечує краще засвоєння складових корму і тим самим швидший набір маси [9, 10]. Поширення подібної біодобавки для тваринництва дозволить виключити з ринку кормові антибіотики, що за швидкими результатами набору маси тварин «дарують» концентрат антибіотиків в м'ясі, споживання якого спричинює антибіотикорезистентність, щ в подальшому спричиняє складнощі у лікуванні хвороб мікробного походження [10]. Доволі нетипове, але перспективне застосування мікробних ферментів.

Тепер варто зазначити про біологічні властивості мікробних амілаз, які сприяють використанню останніх в медицині.

Так з кінця 20-го століття почалися дослідження можливості використання амілаз для руйнування мікробних біоплівки [11]. Адже, мікробні біоплівки складаються з полісахаридів у формі позаклітинної полімерної

речовини (EPS). А α -амілаза ефективно руйнує ці мікробні біоплівки, розщеплюючи глікозидні зв'язки [7, 11]. І з того часу все більше публікацій присвячено дослідженню саме цього аспекту дії ферментів.

Мікробним амілазам науковці присвятили безліч літературних оглядів, досліджуючи властивості та можливості застосування [7-9, 11-13]. Окремо варто виділити літогляди присвячені ферментам, виділених з морських продуцентів [14-16].

Зазначимо, що кількість публікацій, що стосуються дослідження здатності мікробних амілаз до руйнування мікробних біоплівок доволі обмежена [17-22]. Більше робіт присвячено саме оптимізації умов культивування для підвищення активності цільового продукту [23-37], методів очищення та мобілізації ферментів для збереження ефективності мікробних амілаз [38-42], а також застосування різноманітних методів генної інженерії [43-45].

Також варто відмітити, що більшість робіт присвячено саме представникам роду *Bacillus* [17-31].

Зупинимось детальніше на публікаціях, присвячених дослідженню здатності ферментів до руйнування мікробних біоплівок. Біоплівки – це організовані угруповання мікроорганізмів, що однією із основних стратегій їх виживання не тільки у навколишньому середовищі, але й у макроорганізмі. Дослідженням у цій галузі приділяється значна увага науковців, оскільки здатність патогенних бактерій до утворення біоплівок створює суттєві проблеми у клінічній практиці – істотно підвищується стійкість до дії антимікробних препаратів та факторів імунного захисту макроорганізму. А формування таких угруповань на відкритих ранах пацієнтів спричинює довготривалий процес загоєння [46]. Тож розширення можливих рішень такої проблеми як руйнування або попередження утворень мікробних біоплівок є досить нагальним питанням.

У роботі [11] ефективність дії амілаз *Bacillus amyloliquifaciens* та *Aspergillus niger* на біоплівку *Pseudomonas fluorescens* оцінювали за допомогою мікроскопіювання (рис 1.1).

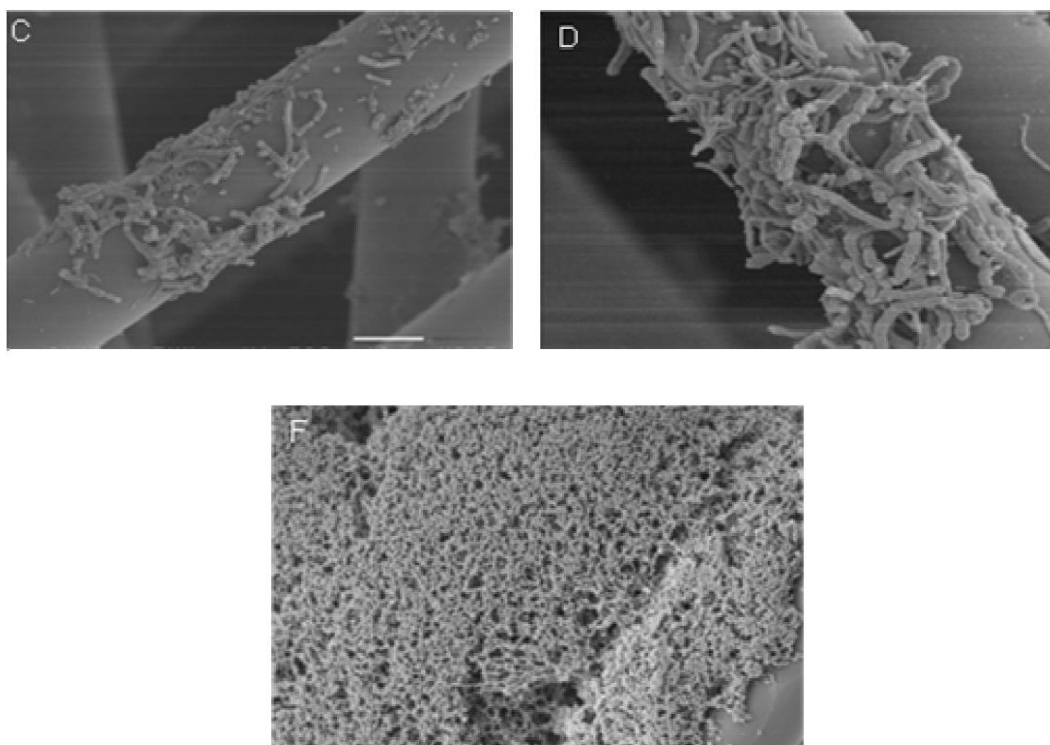


Рис. 1.1. Мікроскопічний аналіз дії ензимів на EPS *Pseudomonas fluorescens*. Біоплівки формувалися на скловолонках протягом 24 год при температурі 26°C. С. Глюкоамілаза *Aspergillus niger* D. Амілаза *Bacillus amyloliquifaciens* F. Контроль, без обробки [11].

Оцінюючи результати візуально, можемо впевнено сказати, що ферменти вказаних продуцентів ефективні при боротьбі з біоплівками *P. fluorescens*. Варто зазначити, що цільове призначення амілаз *B. amyloliquifaciens* та *A. niger* – це харчова промисловість, що ще раз вказує на можливість поліфункціональних властивостей мікробних ферментів.

У роботі [17] дослідники порівнювали ефективність дії комерційних амілаз різної природи (від *Aspergillus oryzae*, *Bacillus subtilis*, виділеної з людської слини та солодкої картоплі) на здатність руйнувати та інгібувати ріст

біоплівки *Staphylococcus aureus*. У результаті вчені встановили, що ефективнішими виявилися амілази мікробної природи (рис 1.2).

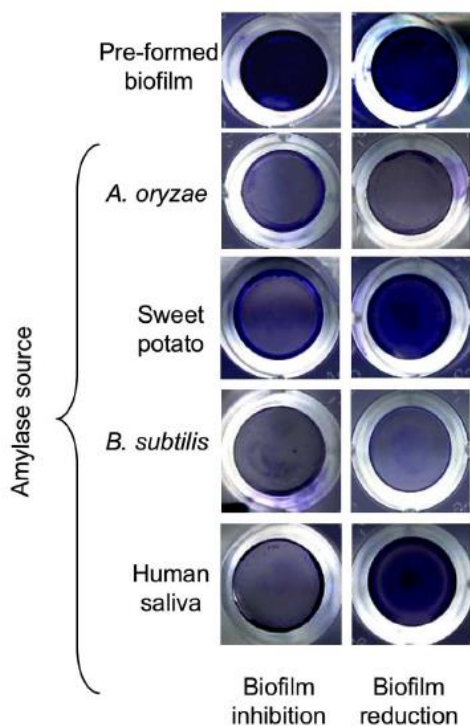


Рис 1.2. Ензиматичний ефект амілаз різної природи на біоплівки *S. aureus*. *S. aureus* SH1000 вирощували 24 год в спеціальних планшетах. Термін інкубації з амілазами – 3 год, концентрація ферментів – 10 мг/мл [17].

У роботі [18] вчені оцінювали ефективність комерційної амілази *B. subtilis* з ферментом виділеним з морського штаму *B. subtilis* S8-18. Цікаво те, що амілаза, синтезована штамом S8-18 виявилась ефективним препаратом для боротьби з біоплівками клінічних патогенів *Vibrio cholera* та *Pseudomonas aureginosa* (ступінь руйнування біоплівок становив 59-74%) і показала себе не гірше комерційної.

Пізніше вчені Kalra та Pandian продовжили досліджувати амілазу морського штаму *B. subtilis* S8-18 [27-28] та встановили, що даний фермент не лише є чудовим агентом у руйнуванні та затримки росту мікробних біоплівок, але і є активним та ефективним за екстремальних умов – амілаза виявилась галотолерантною, стійкою до високих рівнів рН та дії додаткових реагентів (хелаторів) [28]. Що дозволяє розширити можливості використання мікробної

амілази, так як стійкість у не типових (лабораторних) умовах робить такий препарат потенційно можливим у використанні в медицині.

У 2020 році вийшла публікація, що стосувалися оптимізації методів очищення мікробних амілаз представників роду *Bacillus* для збереження високої ефективності до руйнування мікробних біоплівки [21], а також робота, що стосувалась застосування ферментів для пришвидшення процесу заживлення ран шляхом попередження утворення мікробних біоплівки патогенних мікроорганізмів [20].

Питання оптимізації умов культивування та складу поживного середовища для підвищення активності цільового продукту доволі популярна тема для наукових робіт. Враховуючи, що стабільні амілази мають більш широкий спектр призначення, сподіваємось, що в подальшому вчені будуть досліджувати високоактивні ферменти на здатність до руйнування мікробних біоплівки. На сьогодні, як зазначалось раніше, такі стабільні за різних температур, рН, концентрації солей чи важких металів амілази застосовуються як реагенти при клінічних та медичних дослідженнях.

Отже, мікробні амілази є доволі широко функціональними сполуками, і є перспективними для подальших досліджень і потенційного використання у медицині та суміжних галузях.

РОЗДІЛ 2. БІОТЕХНОЛОГІЯ АМІЛАЗ

Варто повернутися до питання стійкості мікробних амілаз. Адже, фермент, що поза пробіркою (ідеальних лабораторних умов) не зможе ефективно проявляти свої властивості і подальша комерційна і промислова реалізація неможлива, незважаючи на приголомшливі результати біологічної дії. Тому так важливо приділити увагу оптимізації культивування амілаз для підвищення стійкості останніх та питанню очищення зі збереженням високої активності ферментів.

Процес очищення досить суттєво впливає на активність, а в подальшому і на ефективність дії мікробних амілаз [38-42]. Також іммобілізація ферменту сприяє контрольованому вивільненню білку, що дозволяє пролонгувати терапевтичний ефект і сприяє підвищенню стійкості препаратів до денатуруючих факторів. Створення та вивчення властивостей препаратів іммобілізованих ферментів є завданням, що представляє підвищений інтерес [38].

Прицільна увага дослідників різних країн зосереджена на дослідженні стабільності мікробних амілаз за дії різноманітних чинників (наприклад, рН, температура, солоність) для подальшого розширення можливостей застосування даних ферментів.

На сьогодні найактивніше серед вітчизняних дослідників мікробні амілази вивчає група вчених з Інституту мікробіології і вірусології НАН України на чолі з Варбанець Л. Д., Авдіюк К. В [47-49, 52-60]. Більша частина публікацій науковців присвячена ферментам виділених з різних видів бактерій роду *Bacillus*, *Achromobacter* та грибів роду *Aspergillus* [47-49, 52-60].

За роки роботи Варбанець та Авдіюк в групі з різними вченими опублікували декілька літоглядів:

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	НУХТ БТЕК 02.02.06 КР ПЗ			
Розроб.		Козаченко Є.Р.			РОЗДІЛ 2. БІОТЕХНОЛОГІЯ АМІЛАЗ	Літ.	Арк.	Акрущів
Перевір.		Слободян О.П.					15	89
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

- У 2008 – що стосувався виділення, дослідження властивостей та практичного застосування мікробних α -амілаз [47].
- У 2009 – Варбанець з групою вчених випускає огляд, що стосується аналізу біосинтезу, властивостей, механізму дії та практичного застосування глюкоамілаз мікроорганізмів [48].
- У 2013 – аналіз фізико-хімічні властивостей, субстратної специфічності та доменної організації [49].

Тепер розглянемо детальніше експериментальні статті вітчизняних вчених. Ще у 2009 році вченими Кубрак та Луцак з Прикарпатського національного університету ім. В. Стефаника було виділено штам *Bacillus* sp. BKL40, здатного синтезувати екзогенну α -амілазу, стабільну за високих температур і лужних значень рН [50]. Дослідниками було оптимізовано склад поживного середовища, шляхом додавання додаткових джерел нітрогену (пептон та дріжджовий екстракт) для інтенсифікації синтезу кінцевого продукту. Ензим повністю зберігав амілолітичну активність після 30 хв інкубації при 60 і 70 °С. α -Амілаза виявляла високу активність у широкому діапазоні значень рН — від 6,0 до 11,0 і зберігала активність навіть після 24 год інкубації за цих значень рН [50]. Виявлені властивості можуть в подальшому позитивно сприяти у впровадженню виявленого ферменту в медичній або клінічній сфері.

У цьому ж році групою науковців з Національного університету «Києво-Могилянська академія», Центру мембранних досліджень було розроблено метод одержання афінних мембран, що базується на ковалентному зв'язуванні хітозану з поверхнею целюлозних мембран та закріпленні барвника Cibacron Blue F3G-A як афінного ліганду [51]. Мембрани з іммобілізованим ензимом характеризуються високим ступенем розщеплення крохмалю, що становить 84% для нерегенераованої мембрани [51].

Також варто відмітити цікавість вчених і щодо грибних ферментів. Так, групою дослідників з Інституту мікробіології і вірусології НАН у результаті проведеного скринінгу виявили активні штами з глюкоамілазною активністю

серед представників мікроміцетів родів *Acremonium*, *Alternaria*, *Eupenicillium*, *Gliocladium*, *Myrothecium*, *Penicillium*, *Rhizopus* [52]. Було встановлено, що найактивніші біосинтетики належали до родів *Aspergillus*, *Fusarium* та *Phoma*. Також вчені встановили оптимальний склад поживного середовища (шляхом дослідження впливу різних джерел вуглецю та їх сумішей) та умови культивування (вік інокуляту) для 4 штамів *Aspergillus* sp. для синтезу найбільш активного цільового продукту. Також дослідниками було проведено порівняння препаратів глюкоамілаз та амілаз у процесах оцукрення нерозчинних крохмалевмісних субстратів [52].

У 2012 році група вчених на чолі з Авдіюк та Варбанець вивчали методи очищення α -амілаз *Aspergillus flavus* var. *oryzae* 80428 і *Bacillus subtilis* 147 та аналізували властивості отриманих ферментів [53]. Науковцями було підібрано такі методи виділення та очищення, що забезпечували максимальне збереження властивостей та активності ензимів. Встановлено, що α -амілаза *A. flavus* var. *oryzae* виявляла максимальну активність при рН 6,0 і за температури 60 °С, зберігала 100% активності через 24 год при рН 5,0–7,0 і протягом 3 год за температури 37 °С. Також виявлено, що рН-оптимум ферменту *B. subtilis* 147 становив 8,0 з термооптимумом при 90 °С; ензим повністю зберігав вихідну активність упродовж доби при рН 7,0–9,0 та протягом 3 год за температури 37 °С, 60 °С, 70 °С [53].

Вказані вище продуценти в подальшому були ключовими у експериментальних роботах вчених з Інституту мікробіології і вірусології НАН України. Так, пізніше Авдіюк та Варбанець опублікували самостійну статтю, в якій описано про дослідження здатності α -амілаз двох продуцентів розщеплювати різні вуглеводмісні субстрати [54]. Показано, що α -амілаза штаму 80428 найефективніше гідролізує розчинний картопляний і пшеничний крохмалі, тоді як α -амілаза *B. subtilis* 147 – тільки пшеничний. Вивчення впливу хімічно активних речовин на активність досліджених ензимів показало, що α -амілази *A. flavus* var. *oryzae* 80428 і *B. subtilis* 147 є стійкими до сечовини, дезоксихолевої кислоти, Твіну-80, Тритону X-100 та пероксиду

водню. Це дозволяє у майбутньому використання цих ензимів у різних галузях промисловості [54].

У подальшому вчені на чолі з Авдіюк та Варбанець досліджували можливість регуляції активності α -амілаз *A. flavus* var. *oryzae* 80428 і *B. subtilis* 147. Так, вивчали можливість модифікації активності за дії координаційних сполук кобальту (II, III) з похідними дитіокарбамової кислоти [55], вплив синтетичних похідних порфіринів і флуорену та поверхнево-активних речовин на активність і біосинтез α -амілази штаму 147 [56] та вплив іонів металів та специфічних хімічних реагентів на активність α -амілаз [57]. Встановлено, що активність досліджуючи механізм дії певних сполук можна підвищити активність бактеріальних та грибних амілаз, що в подальшому можна використовувати в різноманітних сферах промисловості та медицини.

Варто зазначити, що вчені з Інституту мікробіології і вірусології НАН України досліджували також культуру *Achromobacter* sp. 7a з колекції морських культур Одеського національного університету ім. І.І. Мечникова, яка виділена з Чорного моря поблизу острова Зміїний [58-60]. Спочатку було досліджено оптимальні умови культивування [58]. Встановлено, що найвищий рівень синтезу ферменту спостерігали на 3 добу глибинного культивування. Показано, що суміш солоду з крохмалем у співвідношенні 1:9 і натрій нітрат є оптимальними джерелами карбону і нітрогену, відповідно, для максимального біосинтезу фермента. Визначено оптимальні параметри біосинтезу α -амілази: температура 28 °C, вихідне значення рН середовища 6,0, об'єм поживного середовища 100 мл, кількість посівного матеріалу 15% та інтенсивність перемішування 210 об/хв [58].

Подальші публікації стосувалися дослідження фізико-хімічних властивостей α -амілази *Achromobacter* sp. 7a [59] та вплив іонів металів та хімічних реагентів на активність ферменту [60].

Отже, можна зробити висновок, що хоч вітчизняні вчені не досліджували детально можливість використання мікробних амілаз в медицині, наявні публікації показують перспективне і можливе застосування

даних ферментів в якості термо- та рН-стабільних реагентів в методах медичної та клінічної хімії.

Також, як вже зазначалося раніше є достатня кількість робіт закордонних вчених, які присвячено саме оптимізації умов культивування для підвищення активності цільового продукту [23-37], методів очищення та мобілізації ферментів для збереження ефективності мікробних амілаз [38-42].

У роботі [23] група вчених з Нігерії досліджували вплив рН та температури на виділену амілазу штаму *Bacillus subtilis* СВ-18. І встановили, що фермент показав свою найкращу активність при рН 8,0 та 50°C, найкращу стабільність при рН 8,0–9,0 та при температурній стабільності в діапазоні 40–50 ° С. Фермент проявляв активність широкого спектру при гідролізі сирих і розчинних крохмалів і може бути корисним для різноманітних біотехнологічних застосувань [23]. Також раніше [24], ці вчені досліджували питання впливу складу поживного середовища на вихід та активність цільового продукту.

Відомо, що на активність та стабільність ферментів впливають мікроелементи, тому не дивно що є роботи присвячені дослідженню цього питання. Так, у роботі [36] вчені з Китаю досліджували вплив різної концентрації іонів Кальцію на активність амілази морського штаму бактерії *Pontibacillus* sp. ZY, а також і вплив інших фізичних чинників (рН, температура). Було встановлено, що за додавання 0,1 мМ Ca²⁺ активність амілази підвищувалась у 2.4 рази. Що ще раз показує можливість регуляції активності мікробних ферментів для певних цілей.

Питання збереження високої активності ферментів після етапів виділення та очищення, а також використання іммобілізованих ферментів для багаторазового використання також доволі популярні теми для дослідження серед вчених. Так, в роботі [40] описано можливість використання амідразонової акрилової тканини для іммобілізації α-амілази промислового штаму *B. subtilis*. Встановлено, що іммобілізація ферменту відбувається шляхом зшивання та ковалентного зв'язування на носії. Іммобілізація

ферменту на амідразоновій акриловій тканині покращила термостабільність цільового продукту. Крім того, стабільність зберігання та повторне використання ферменту також були покращені за рахунок іммобілізації. Іммобілізований фермент можна з великою легкістю відокремити від реакційної суміші, після чого він може бути використаний знову у свіжій ферментативній реакції. Амідразонова акрилова тканина була продемонстрована як чудовий носій промислових ферментів, і автори рекомендують використовувати її для іммобілізації ферментів. Це потенційне використання для промислових застосувань, що включають біофармацевтичні препарати та біокаталізатори [40].

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

3.1. Передумови виробництва ЛЗ Sollpura

3.1.1. Аналіз фармакологічних властивостей цільового ЛЗ, галузей використання

Мікробні амілази знайшли своє призначення саме у харчовій промисловості, але не зважаючи на це дані ферменти розглядають як альтернативу тваринним ферментам для людей, які мають алергію на останні. Але чи є приклади позитивної імплементації?

На сьогодні наше суспільство кожний період зустрічається з новими викликами. І одним із таких викликів є орфанні захворювання – це вроджені або набуті захворювання, які трапляються вкрай рідко – рідше ніж один випадок на 2000 населення країни. 80% цих захворювань генетично обумовлені. Вони не лише мають тяжкий і хронічний перебіг, але й супроводжуються зниженням якості та скороченням тривалості життя пацієнтів. Такі люди зазвичай потребують дороговартісного, безперервного та позиттивного лікування [61]. Одна з проблем таких захворювань є дороговартісне лікування. Тому що ринок та пропозиція для орфанних захворювань є досить обмеженим і тому необхідно розширювати лінійку препаратів, що дозволить пацієнтам підібрати препарат зважаючи на їх особливості організму.

Ферменти свиного походження використовуються для замісної терапії ферментами підшлункової залози у хворих на муковісцидоз. Але що робити людям з алергією на свинні білки або у яких некоректно працює кишківник і такі «ліки» викличуть лише більший дискомфорт при лікуванні. Як варіант – це використувати у схемі лікування ферменти не тваринного походження, а чи спацюють вони? Так, одним із таких проривів і пропозицій є препарат з 3

					НУХТ БТЕК 02.02.06 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Козаченко Є.Р.			РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО- ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ	Літ.	Арк.	Акрюшів
Перевір.		Слободян О.П.					21	89
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

фрементів Sollpura, що є заміником травних ферментів у пацієнтів хворих на муковісцидоз. Sollpura або Liprotamase – це ферменти отримані біотехнологічним шляхом [62].

3.1.2 Обсяг ринку та очікувані темпи його розвитку

Муковісцидоз (кістозний фіброз) – системне, генетично обумовлене, аутосомно-рецесивне захворювання, яке спричиняється мутацією гена трансмембранного регулятора муковісцидозу (ТРБМ, CFTR – cystic fibrosis transmembrane regulator) і характеризується ураженням залоз зовнішньої секреції (переважно дихальної та травної систем), що призводить до фатальних наслідків. Муковісцидоз – найбільш поширене летальне спадкове захворювання у світі серед населення білої раси. Захворюваність по всьому світу коливається у межах від 1 на 377 живонароджених у деяких районах Великої Британії до 1 на 90 тис. живонароджених в Азії. За статистикою, середня тривалість життя хворих на муковісцидоз (без систематичного лікування) – це 17–18 років. Це пов'язано з несвоєчасною діагностикою та недосконалістю скринінгової системи. Розробка новітніх методів лікування в останні десятиліття дала змогу значно поліпшити прогноз для життя в даних пацієнтів [63].

Як вже зазначалось вище при неправильній роботі ферментів та даному захворюванні необхідне лікування замісними ферментами протягом всього життя і чим раніше діагностувати хворобу, то більша вірогідність подовшити життя хворого.

На сьогодні на ринку представлені наступні препарати для заміної ферментної терапії:

- Pancreaze [64]
- Creon [65]
- Triferment [66]
- Та інші в склад яких входить трифермент панкреатин.

Але, варто зазначити, що в склад подібних ліків входять ферменти саме тваринного походження, що ускладнює лікування для людей, що мають алергію на подібні білки.

3.1.3. Розрахунок потреби у субстанції для випуску ЛЗ

За офіційними даними, в Україні налічується близько 900 осіб з муковісцидозом [67]. Але на сьогодні немає статистичних даних щодо людей які не можуть засвоювати панкреатичні білки тваринного походження. Зазвичай у таких людей ліки «не працюють» і єдине, що може зробити лікар це збільшити дозування, тому що всі ферментні препарати тваринного походження.

Препарат Sollpura складається з 3х ферментів – ліпаза, протеаза та амілаза, у співвідношенні 1:1:0,15. Це пероральний препарат без кишковорозчинного покриття [62].

Будемо синтезувати одну з трьох складових – амілазу. В подальшому можна розширити спектр застосування препарату на інші кишкові розлади

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

Розрахунок будемо проводити на основі знайдених статистичних даних (див. підпункти 1.1.2-1.1.3) для визначення потреби у амілазі для виробництва препарату Sollpura. Поки відомо, що хворих на муковісцидоз – 900 осіб, переважно діти. Варто врахувати, що лише частина хворих має алергію на білок тваринного походження, нехай це буде 25% від зареєстрованих.

Використання даного препарату передбачає вживання протягом всього життя, але будемо розраховувати потребу на 2 роки вживання для всіх хворих (враховуючи, що нашим препаратом захочуть скористатися хворі з розладами роботи кишківника і у кого буде алергія на тваринний білок). Також враховуємо, що на сьогодні розвивається методи діагностування і хворих на муковісцидоз буде ставати все більше, необхідно врахувати можливий приріст потенційних споживачів аби задовольнити попит. Зазначимо, що два роки, це 730,5 днів – для розрахунків округлимо до 731 дня.

При проведенні досліджень [62, 68] враховували дозування 10000 ОД ліпази/кг/день. Зважаючи на співвідношення компонентів у препараті маємо 1500 ОД амілази/кг/день.

Так як основні пацієнти це діти до 18 років, то візьмемо середню вагу підлітків для приблизного прорахунку потреби у препараті.

Межі середньої ваги для дітей від 1го до 10 років – це від 11 до 32 кг, а в період з 11 до 17 років – від 35 до 75 кг [69, 70].

Зважаючи, на те що на сьогодні немає точних статистичних даних щодо хворих на муковісцидоз, тому варто взяти з розрахунку більшої ваги, аби забезпечити препаратом всіх кому він необхідний, – візьмемо середню вагу 60 кг.

Маємо:

$$1500 \text{ ОД амілази} \times (900 \text{ хворих} \times 0,25) \times 60 \text{ кг} \times 731 \text{ днів} = 14\,802\,750\,000 \text{ ОД амілази в рік.}$$

Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера

Для забезпечення хворих муковісцидозом препаратом Sollpura необхідно 14 802 750 000 ОД амілази в рік.

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

Зі статті [6] відомо, що після культивування *Bacillus sp.* WangLB концентрація ферменту становить 26670 ОД/мл за 48 год культивування. Вміст сухих речовин в готовому продукті СР_{ГП} складає частку 0,95.

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

$$T_{\text{цф}} = T_{\text{ф}} + T_{\text{по}} = 48 + 10 = 58 \text{ год,}$$

де $T_{\text{ф}}$ – час культивування; $T_{\text{по}}$ – час проведення підготовчих операцій (миття та огляд ферментера (2 год), перевірка на герметичність (2 год),

стерилізація (2 год), охолодження (1,5 год), завантаження середовища (1 год), засів (0,5 год), вивантаження культуральної рідини (1 год));

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

Мінімально можлива кількість робочих днів, які можуть бути використані для виробництва продукції, становить 30 днів, максимальна – 330 днів. Приймаємо кількість робочих трудоднів 30 ($T_{рд}$). Інші дні у році використовуємо для технічної діагностики обладнання, а також для продовження синтезу амілази, лише для використання у харчовій промисловості.

При кількості трудоднів рівному 30, кількість продукту на добу ($G_{нтд}$) становитиме:

$$G_{нтд} = \frac{G_{нт}}{T_{рд}} = \frac{14\,802\,750\,000}{30} = 493\,425\,000 \text{ ОД/добу}$$

Кількість продукту на добу з урахуванням втрат за виробничий цикл ($E_B = 15\%$):

$$G_{пд} = \frac{G_{нтд}}{1 - E_{CB}} = \frac{493\,425\,000}{1 - 0,15} = 580\,500\,000 \text{ ОД/добу}$$

Кількість біомаси за цикл:

$$G_{цк} = \frac{G_{пд} \times T_{цф}}{24} = \frac{580\,500\,000 \times 58}{24} = 1\,402\,875\,000 \text{ ОД/цикл}$$

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

$$V_{кр} = \frac{K_1 \times G_{цк} \times CP_{ГП}}{P_{кр}} = \frac{1,1 \times 1\,402\,875\,000 \times 0,95}{26670} = 55 \text{ л/цикл}$$

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

Визначаємо кількість ферментацій (циклів) на рік:

$$K_{ц} = \frac{G_{нт}}{G_{цк}} = \frac{14\,802\,750\,000}{1\,402\,875\,000} = 10,6 \text{ циклів}$$

Приймаємо 11 циклів.

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

$$V_{\phi} = \frac{V_{\text{кр}}}{1 - E_{\phi}} = \frac{55}{1 - 0,01} = 55,5 \text{ л}$$

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

$$V_{\text{гф}} = \frac{V_{\phi}}{K_{\text{зф}}} = \frac{55,5}{0,6} = 92,5 \text{ л}$$

Знаходимо найближчий за номінальним об'ємом ферментер $V_{\text{нф}} = 100$ л.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення ферментера:

$$K_{\text{зф}} = \frac{V_{\phi}}{V_{\text{нф}}} = \frac{55,5}{100} = 0,56$$

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

Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері з робочим об'ємом $V_{\phi} = 55,5$ л. Найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{нф}} = 100$ л.

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить 5% від об'єму поживного середовища [6].

Тоді кількість поживного середовища в ферментері буде становити:

$$V_{\text{пс}} = \frac{V_{\phi}}{1 + X_{\phi}} = \frac{55,5}{1 + 0,05} = 52,9 \text{ л}$$

де X_{ϕ} – доза посівного матеріалу для ферментера (0,05).

Кількість посівного матеріалу становить

$$V_{\text{пмф}} = V_{\phi} - V_{\text{пс}} = 55,5 - 52,9 = 2,6 \text{ л.}$$

Таку кількість інокуляту можна одержати культивуванням у колбах. Для цього використовують колби об'ємом $V_{\text{колб}} = 750$ мл та коефіцієнтом заповнення $K_{\text{зк}} = 0,25$.

Тоді кількість колб для отримання посівного матеріалу становитиме

$$N_{\text{колб}} = \frac{V_{\text{пм2}}}{V_{\text{колб}} \times K_{\text{зк}}} = \frac{2600}{750 \times 0,25} = 13,8$$

Таким чином, для одержання посівного матеріалу необхідно 14 колб.

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу амілази у ферментері об'ємом 100 л з коефіцієнтом заповнення 0,6 буде проходити у 2 етапи.

РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ СУБСТАНЦІЇ

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

Продуцентів амілаз доволі багато, але варто опиратися на економічну доцільність цільового продукту, а також зважати на активність амілази.

Варто зазначити що більшість науковців в своїх роботах зазначають порівняльні, а не кількісні величини – Relative activity, % (відносна активність), не вказуючи проміжні величини. Тому при виборі продуцента обирали серед тих, у кого були наведені дані концентрації або специфічної активності амілаз. Зазначимо, що обирали продуцента серед нерекомбінантних штамів.

У таблиці 4.1 наведено порівняння умов культивування, концентрації та активність цільового продукту різних продуцентів.

Оцінюючи активність ферментів різноманітних продуцентів в таблиці 4.1, а також враховуючи час культивування та компонентність поживного середовища, можна зробити висновок, що найбільш ефективними є штами роду *Bacillus*.

Також, враховуючи тему роботи варто було б приділити увагу здатності амілаз до руйнування мікробних біоплівки. Але, на жаль, дослідники у своїх працях вказували лише ступінь руйнування біоплівки, опускаючи точні концентрації амілаз, що були задіяні, або використовували комерційні ферменти точні умови отримання яких є комерційною таємницею.

Тому, проаналізувавши таблицю 4.1 зупинимось на найпродуктивнішому штамі серед наявних – *Bacillus* sp. WangLB.

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	НУХТ БТЕК 02.02.06 КР ПЗ			
Розроб.		Козаченко Є.Р.			РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ СУБСТАНЦІЇ	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Слободян О.П.					28	89
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Порівняння різних продуцентів щодо синтезу амілаз

Біологічний агент	Склад поживного середовища, г/л	Тривалість культивування, год	Концентрація цільового продукту, ОД/мл	Специфічна активність амілази, ОД/мг	Джерело
<i>Bacillus sp.</i> WangLB	Крохмаль – 20, Пептон – 1, KNO ₃ – 1, K ₂ HPO ₄ – 0.5, MgSO ₄ ·7H ₂ O – 0.5, NaCl – 0,5, FeSO ₄ ·7H ₂ O- 0.01, Аланін – 20 ммоль/л (рН 10.0)	48	26670	233	[6]
<i>Bacillus subtilis</i> RM16	Крохмаль – 10, Триптон – 10, Дріжджовий екстракт – 15, NaCl – 10, MgSO ₄ – 1 рН 8.0	24	370	-	[29]
<i>Geobacillus sp. nov.</i>	Крохмаль – 20, Триптон – 40, KH ₂ PO ₄ – 5, MgSO ₄ ·7H ₂ O – 3, CaCl ₂ – 2, FeSO ₄ ·7H ₂ O – 1	24	-	25.1	[34]
<i>Bacillus subtilis</i> CB-18	Крохмаль – 20, Пептон – 5, Na ₂ HPO ₄ – 2, KH ₂ PO ₄ – 1 (рН 8,5)	48	680	-	[24]
<i>Anoxybacillus sp.</i> AH1	М'ясний екстракт – 10, Пептон – 10, NaCl – 5 (рН 7.0)	24	1874.8		[41]

На наступному етапі порівнювали вартість поживних середовищ (табл. 4.2) з метою визначення їх рентабельності для культивування того чи іншого продуцента цільового продукту.

Таблиця 4.2

Порівняння вартості компонентів поживних середовищ

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації
<i>Bacillus sp.</i> WangLB	Крохмаль – 20	396.00	7,92	1
	Пептон – 1	200	0,2	2
	KNO ₃ – 1	39.00	0,039	1
	K ₂ HPO ₄ – 0,5	57.00	0,028	1
	MgSO ₄ ·7H ₂ O – 0,5	10.80	0,005	1
	NaCl – 0,5	15	0,007	3
	FeSO ₄ ·7H ₂ O – 0,01	6.60	0,00007	1
	Аланін – 20 ммоль/л = 1 780 мг/л	534.00	0,95	1
Вартість 1 л середовища – 9,15 грн				
<i>Anoxybacillus sp.</i> АН1	М'ясний екстракт – 10	7 296	72,96	4
	Пептон – 10	200	2	2
	NaCl – 5	15	0,015	3
	Вартість 1 л середовища – 12,4 грн			

Примітки. 1 – <https://www.systopt.com.ua/>; 2 – <https://flagma.ua/>; 3 – <https://maxichemistry.com/>; 4 – <http://lab-mir.com/>

З табл. 4.2 бачимо, що вартість середовища для культивування штаму *Bacillus sp.* WangLB у 1,4 рази нижча у порівнянні з штамом *Anoxybacillus sp.* АН1, але не враховано продуктивність штамів. Щоб остаточно обрати

найефективніший біологічний агент, розраховували умовну вартість 1 ОД цільового продукту (табл. 4.3).

Таблиця 4.3

Умовна вартість продукту

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища, грн	Концентрація цільового продукту, ОД/мл	Умовна вартість 1000 ОД цільового продукту, грн/ОД	Тривалість культивування, год	Кількість утвореної амілази за годину, ОД/год
<i>Bacillus</i> sp. WangLB	9,15	26670	0,34	48	555,6
<i>Apoxybacillus</i> sp. AH1	12,4	1874,8	6,6	24	78

Економічна складова у виробництві кінцевого продукту відіграє важливу роль, і враховуючи продуктивність штамів з табл 4.3 бачимо, що ефективнішим і економічно доцільнішим є виробництво амілази під час культивування *Bacillus* sp. WangLB.

4.2. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Існує два способи проведення процесу культивування – поверхневий та глибинний. У сучасних умовах на виробництві застосовують, як основний, глибинний спосіб культивування, так як в порівнянні з поверхневим культивуванням глибинний спосіб має ряд переваг:

- Більша питома площа контакту;
- Є більш простіший;
- Більш ефективний та продуктивний.

Розрізняють два основні способи глибинного культивування мікроорганізмів – періодичне і безперервне.

Безперервне культивування дозволяє зафіксувати культуру в певній фазі (експоненційній) за рахунок постійної подачі свіжого поживного середовища та відведення готової культуральної рідини.

Проте, періодичний спосіб культивування на практиці застосовується значно частіше. Це зумовлено меншою вірогідністю контамінації і простотою проведення процесу [71].

Оптимальними умовами для біосинтезу амілази *Bacillus* sp. WangLB є температура 35°C, та рівень рН 10,0 [6]. Це зумовлює ризик контамінації культуральної рідними мезофільними і ацидофільними мікроорганізмами. Тому, необхідно забезпечити асептичні умов при біосинтезі, чого неможливо досягти при поверхневому культивуванні. Такі умови забезпечуються попередньою стерилізацією обладнання і комунікацій, компонентів поживного середовища, та усіх компонентів і речовин які потрапляють в середину ферментера. Також для запобігання контамінації в ферментері створюється надлишковий тиск. Варто відмітити, що продуцент є аеробом, тому необхідно забезпечити необхідний рівень аерації.

Підсумовуючи вище сказане можна зробити висновок, що культивування даних мікроорганізмів проводимо періодичним глибинним способом.

Обґрунтування вибору ферментера

Вибір ферментера базується на особливостях способу культивування, вони були зазначені раніше.

Основними вимогами до ферментаторів є асептичність умов та достатній для культивування продуцента рівень аерації.

Для забезпечення аерації у нижній частині ферментера встановлюють барботер, а для вищого коефіцієнту масообміну ферментатор повинен бути обладнаний також механічним перемішуючим пристроєм. Існує декілька типів перемішуючих пристроїв, проте одним з найефективніших варіантів є мішалки турбінного типу. Турбінна мішалка підвищить диспергацію кисню в культуральній рідині, таким чином інтенсифікуючи аерацію [72].

При використанні турбінної мішалки ймовірно виникнення кругового руху рідини в апараті, в результаті чого утворюється воронка. У такому

випадку в апараті на невеликій відстані від стінок встановлюються відбивні перегородки, щоб уникнути утворення застійних зони при перемішуванні.

Отже, вибір конкретного ферментаційного обладнання залежить від вимог поставлених до проведення процесу культивування.

Згідно техніко-економічного обґрунтування для культивування нам необхідний ферментер об'ємом 100 л. Обираємо ферментер марки MODEL F3 MB від компанії Bionet [73]. Адже ферментер від цієї фірми можна обладнати різноманітним типом мішалки, та встановити необхідні датчики та певну кількість патрубків.

4.3. Обґрунтування вибору стадії підготовки повітря

Bacillus sp. WangLB – аероб, тому є необхідність підготовки стерильного аераційного повітря для культивування бактерій.

Для стерилізації повітря в боксах в лабораторіях, де працюють з посівною культурою та інокулятом, використовують ультрафіолетові лампи.

Процес підготовки та стерилізації аераційного повітря проводять у декілька етапів, задля ефективною очистки та запобіганню швидкого псування дороговартісних фільтраційних матеріалів.

Повітря для вирощування посівного матеріалу та виробничого культивування стерилізують за допомогою фільтрів грубої очистки (головні фільтри), щоб відокремити з повітря часточки великих розмірів, та індивідуальних фільтрів (фільтрів високої ефективності), для остаточного відділення часточок малих розмірів, які не затрималися на попередніх фільтрах. Основними вимогами до фільтрувальних волокон є висока пилоємність і здатність до ефективного функціонування за малих перепадів тиску до і після фільтра.

Забір повітря для фільтрів грубої очистки здійснюємо на висоті 5 м, тому що будівля являє собою одноповерхову споруду висотою 2 м з товщиною даху, укосів 1 м та враховують 3 м на забір повітря. Потім повітря очищають від пилу на плоских тканинних фільтрах грубого очищення та стискають його в компресорах для подолання повітрям опорів під час очищення та надходження

в апарати (фільтруючі матеріали, трубопроводи, культуральна рідина у ферментерах), за рахунок чого воно нагрівається до температури 220 – 250 °С. Далі повітря охолоджують до температури «точки роси» у теплообміннику, щоб відділити вологу у вигляді конденсату з повітря для попередження руйнування фільтруючих матеріалів фільтрів тонкого та індивідуального очищення, які є чутливими до неї. Після цього сконденсовану вологу видаляють у ресивері, де одночасно проводиться зменшення пульсації руху повітря, яке може негативно впливати на роботу подальших фільтрів очистки. Перед подачею на головні фільтри очистки повітря стабілізують підігріванням до температури 45 – 50 °С паром у теплообмінниках.

Індивідуальні фільтри встановлюють безпосередньо перед ферментером, посівним апаратом або інокулятором. Головні фільтри заповнюють набивним волокном і встановлюють в цеху ферментації на головному повітряному колекторі стиснутого аераційного повітря. На цих фільтрах видаляється приблизно 98% мікроорганізмів, а на індивідуальних, які заповнюються надтонкими мембранами чи волокнами, затримується до 99,999% мікроорганізмів [74].

4.4. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

Підготовка мийних засобів проводиться з метою очищення обладнання від залишків попереднього культивування та бруду, які здатні контамінувати культуральну рідину при виробничому культивуванні. Тому, для попередження таких забруднень використовують мийні засоби.

Для миття частин обладнання, які забруднені сторонніми речовинами передбачено використовувати різні мийні засоби, а саме, розчин кальцинованої соди. Гарячі (1-2) % розчини кальцинованої соди добре обмилюють жири, гідролізують білки, розщеплюють вуглеводи. При зменшенні температури розчину мийні властивості засобу не падають. Рекомендується використовувати 0,5% розчини кальцинованої соди температурою (45±5) °С для ручного миття технологічного обладнання та

інвентарю, а також (1-2)% розчини температурою (55 ± 5) °C для циркуляційного миття технологічного обладнання та комунікацій [74].

Щоб обрати мийні та дезінфікувальні засоби, необхідно врахувати їх вартість та витрати на обробку потрібної площі виробничого приміщення. На 1 м² підлоги та стін затрачається приблизно 100 мл робочого розчину мийного чи дезінфікувального засобу. Засоби варто застосовувати з інтервалом в 3 місяці для запобігання розвитку стійких штамів мікроорганізмів. Виробництво триває 300 трудоднів, отже необхідно підібрати 2 різних миючих засобів для оброблення поверхонь.

Для миття обладнання. Миття ферментера (100 л) та реакторів-збірників для приготування всіх етапів культивування відбуватиметься за допомогою СІР-мийки. Об'єм мийного засобу складатиме близько 10 % кожного з відповідних об'ємів обладнання.

Для миття обладнання і комунікацій і тари доцільно використовувати миючий засіб кальциновану соду, тому що вона має меншу вартість 1 л робочого розчину та є екологічно безпечною, у порівнянні із миючим засобом Лойран про12. Лойран про 12, незважаючи на ефективність, є їдким миючим засобом і потребує засобів індивідуальної безпеки.

Для дезінфекції стін, підлоги, вікон та дверей. Як дезінфікуючий засіб обираємо Хлорантоїн та Біодез-Р. Обираємо два дезінфікуючі засоби з різною активної речовиною, через необхідність чергувати миючі засоби і застосовувати при зміні засіб, що має інший механізм дії (для уникнення виникнення резистентності у бактерій). Хлорантоїн має бактерицидні, туберкулоцидні, віруліцидні (включаючи збудника поліомієліту, всіх типів грипу, парагрипу, коронарної респіраторно-синцитіальних, ротавірусної, аденовірусної інфекцій, SARS, гепатитів, ВІЛ, вірусних гастроентеритів і інших), спороцидні і фунгіцидні (включаючи збудників кандидозів, дерматомікозів, цвілевих грибів). Біодез-Р препарат має бактерицидну (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri*, *Salmonella thyphimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*,

Pseudomonas vulgaris, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis* і т.п.), туберкулоцидну, фунгіцидну (*Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Candida albicans*, *Trichophyton gypseum*, і т.п.), а також віруцидну (*Mухоматозис вирус*, *Newcastle disease virus*, *Coronaviridae*, *Parvoviridae*, *Herpes virus*, і т.п.) дії. На оброблених поверхнях препарат забезпечує пролонгований знезаражуючий ефект внаслідок утворення непомітною біоцидною полімерної плівки, яка при необхідності змивається водою. Обидва засоби ефективні за низьких концентрацій, мають IV рівень небезпеки, тривалий термін зберігання робочих розчинів та мають нижчу вартість робочого розчину ніж засіб Гембар.

4.5. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Культивування штаму проводять у середовищі наступного складу (г/л) [6]: Крохмаль – 20, Пептон – 1, KNO_3 – 1, K_2HPO_4 – 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.5, NaCl – 0,5, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.01, Аланін – 20 ммоль/л.

Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування культури в колбах на качалках

Об'єм середовища, необхідний для вирощування посівного матеріалу в колбах, становить 0,5 л. Стерилізація проходить в автоклаві. Розділяємо поживне середовище на такі композиції (залежно від режиму стерилізації компонентів):

Композиція I: крохмаль, пептон, аланін (умови стерилізації – 112 °С впродовж 30 хв).

Композиція II: K_2HPO_4 (умови стерилізації – 131 °С впродовж 40 хв).

Композиція III: солі – KNO_3 , NaCl , $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (умови стерилізації – 131 °С впродовж 40 хв).

Композицію I складають термолабільні сполуки, тому стерилізуються окремо за інших умов.

Фосфорна сіль (композиція II) стерилізують окремо від основних солей (композиція III), щоб запобігти випадінню в осад фосфорних солей магнію при нагріванні.

Приготування і стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 100 л

На етапі біосинтезу, для одержання 55,5 л культуральної рідини використовують ферментер об'ємом 100 л. Стерилізацію такого об'єму поживного середовища для цієї стадії будемо проводити будемо проводити у реакторах-збірниках та безпосередньо у ферментері, тому компоненти поживного середовища необхідно розділити на композиції:

Композиція I: крохмаль, пептон, аланін (умови стерилізації – 112 °С впродовж 30 хв).

Композиція II: K_2HPO_4 (умови стерилізації – 131 °С впродовж 40 хв).

Композиція III: солі – KNO_3 , $NaCl$, $MgSO_4 \times 7H_2O$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (умови стерилізації – 131 °С впродовж 40 хв).

Композицію I складають термолабільні сполуки, тому стерилізуються окремо за інших умов.

Фосфорна сіль (композиція II) стерилізують окремо від основних солей (композиція III), щоб запобігти випадінню в осад фосфорних солей магнію при нагріванні.

Отже, технологічна схема біосинтезу аланіну передбачає наявність таких допоміжних робіт:

- Приготування та стерилізація поживних середовищ.
- Приготування та стерилізація $NaOH$ для забезпечення оптимального рН під час культивування.

Додаткове обладнання:

- Збірники з сорочкою для приготування поживного середовища.

4.6. Обґрунтування стадій виділення і очищення субстанції для виробництва лікарського засобу.

Отримання високоактивних ензимних препаратів є доволі складним і трудомістким процесом, який включає цілу низку етапів очищення. Це, перш за все, пов'язане зі здатністю більшості продуцентів синтезувати у комплексі з необхідним продуктом інші ензими. Так, більшість амілолітичних продуцентів паралельно з α -амілазою виділяють у культуральну рідину протеолітичні та (або) інші гліколітичні ензими, що значною мірою ускладнює їх очистку [75]. Тому необхідно ретельно підбирати методи виділення та очищення для того щоб отримати цільовий продукт з високою активністю.

Зважаючи на те, що амілаза – це позаклітинний метаболіт, то перш за все необхідно відділити культуральну рідину від біомаси продуцента. Це можна здійснити декількома методами [76]:

- Сепарування;
- центрифугування;
- фільтрація;
- осадження за допомогою флокулянтів;
- дистиляція;
- сублімація;
- зневоднення (випарювання, сушіння);
- ліофілізація;
- заморожування;
- осадження шляхом змін розчинності речовини;
- кристалізація;
- сорбція;
- екстракція;
- ультрафільтрація на мембранних фільтрах.

Варто відмітити, що цільовий продукт знаходиться власне у культуральній рідині (рідка фаза), тому відділення біомаси варто здійснити

фізичними методами. Адже осадження та кристалізація може вплинути на активність антибіотику та ускладнити подальше його виділення. Також не варто використовувати методи, що задіюють зміну температур (випарювання, ліофілізація та заморожування), адже цільовий продукт знаходиться в рідкій фазі. Тому зупинимось на наступних фізичних методах та оберемо найоптимальніший для нашої технології: фільтрація, сепарування та центрифугування, ультрафільтрація на мембранних фільтрах. Так як це початковий етап, дорого вартісні методи відділення біомаси – ультрафільтрація на мембранних фільтрах – також не варто розглядати. Отже, залишилось обрати між фільтрацією та центрифугуванням. Розглянемо ці два методи детальніше.

Фільтрація – це розділення суспензії при її пропусканні через пористу перегородку. Кінцева мета фільтрування – отримання твердої або рідкої фази (коли одна з них є відходом), а також одночасне отримання твердої і рідкої фаз. Іноді для кращого перебігу процесу до суспензії додають коагулянти для кращої ефективності процесу. Також налипання твердої фази на фільтр (фільтруючу перегородку) спричинює зниження ефективності процесу. У такому разі необхідно або фізично звільнювати тверду фазу з фільтру або здійснювати заміну фільтруючого матеріалу [76, 77].

Центрифугування – це процес розділення неоднорідних систем (емульсій і суспензій) під дією відцентрових сил з використанням суцільних або проникних для рідини перегородок. Залежно від величини критерію розділення (Fr) центрифуги поділяють на звичайні ($Fr < 3500$) та надцентрифуги ($Fr = 3500-12000$). Останні називають ще сепараторами, якщо фактор розділення > 12000 , то такі центрифуги називають бактофугами. Перевагою центрифугування є висока інтенсивність та швидкість процесу, здатність до автоматизації, здатність до оброблення великих об'ємів суспензій та відсутність попередньої обробки культуральної рідини [76, 77].

Отже, проаналізувавши дані, варто обрати метод відділення біомаси, який забезпечить ефективність процесу, збереження рідкої фази для

подальшої обробки, відсутність необхідності попередньої обробки культуральної рідини для збереження активності антибіотику та метод, що дозволить автоматизувати процес за великих об'ємів культуральної рідини. Обираємо метод центрифугування. Умови проведення 12000 g при 4°C протягом 10 хв.

Далі, отримавши супернатант необхідно вирішити які далі дії будемо проводити для виділення цільового білку.

Амілаза – це специфічний білок, тому варто утриматись від суто хімічних методів відділена від супернатанту, а також дії високих температур – адже такі дії можуть знизити ефективність ферменту, що в подальшому призведе до створення неефективного лікарського засобу. Тому варто поєднувати декілька методів. Оцінивши літературні [6,75,78-80] дані зупинимось на наступних методах виділення та очищення амілаз, що дозволять зберегти ефективність та специфічність ферменту: концентрування, осадження, очищення за допомогою гель-хроматографічної колонки та висушування.

Концентрування.

Для концентрування ферментів та розчинів амінокислот у промисловості використовуються метод ультрафільтрації.

Ультрафільтрація застосовується за необхідності концентрувати розчини низькомолекулярних речовин з одночасним очищенням їх від високомолекулярних речовин. Цей процес відбувається під тиском 7-8 МПа, діаметр пор ультрафільтраційної мембрани підбирають в залежності від розмірів молекули цільового продукту. Процес переносу низькомолекулярних сполук через мембрану відбувається за рахунок осмосу, тому що осмотичний тиск у них на декілька порядків більший ніж у високомолекулярних речовин тієї ж концентрації [81].

Так, як розмір нашого ферменту складає ~50 кДа [6], то ми для початку відсічемо молекули більшого розміру (застосувавши мембрану з відсічення сполук з молекулярною масою 100 кДа), а далі фільтрат пропустимо через

мембрану з розміром пор меншим від нашого цільового продукту (для звільнення від низько молекулярних сполук) – 30 кДа [78].

Таким чином ми зможемо сконцентрувати наш цільовий продукт у 15 разів [78, 82].

До ультрафільтраційних установок висувається ряд вимог:

– виготовлення з матеріалів, стійких до корозії і з достатньою механічною міцністю;

– можливість швидкого розбирання і складання при проведенні ремонту і транспортуванні;

– компактність і легкість обслуговування при експлуатації, можливість ефективного періодичного промивання з метою відновлення продуктивності мембран і підтримки відповідних санітарно-гігієнічних умов;

– забезпечення підігріву або охолодження вихідних сумішей.

До переваг методу можна віднести простоту конструкції, а також високу селективність, хімічну стійкість, біологічну інертність, міцність та довговічність ультрафільтраційних мембран. З недоліків можна виділити високу вартість та складність виявлення неполадок [83].

Тож зупинимось на перевіреному та популярному методі – ультрафільтрації.

Можна було б зупинитися на цьому етапі, але нам необхідно не тільки виділити фермент, а і очистити його для підвищення специфічності амілази (власне за рахунок чого і буде здійснюватися терапевтичний ефект).

Тож наступним є етап **осадження**.

Для осадження протеїнів із культуральної рідини найчастіше застосовують сульфат амонію (*B. licheniformis*, *T. thalporophilus* KSV 17, *Bacillus sp.* УХ-1, *B. stearothermophilus* NCIM 2922, *B. cereus*, *B. subtilis* 147), хоча деякі дослідники віддають перевагу органічним розчинникам (етанолу, ацетону, ізопропанолу) (*Bacillus sp.* А3-15, *B. cereus*) [75].

Наш вибір зупинимо на сульфаті амонію, адже через малі об'єми виробництва (55 л за цикл) немає потреби у регенерації органічних

розчинників (це буде дорожче, аніж використовувати хімічні сполучення, які в подальшому можна буде знешкодити при утилізації).

Головна умова при осадженні – зберігати сталу температуру 4°C для унеможливлення зміни конформації амілази, що може привести до втрати активності ферменту.

Після обробки сульфатом амонію амілаза випадає в аморфний осад. Тому наступним етапом є відділення осаду від рідкої фази.

Для розділення цих фаз можна застосовувати такі процеси, як фільтрування, центрифугування, відстоювання, флотацію тощо.

Найбільш доцільним буде застосування методу центрифугування. Хоча цей метод є більш дорогим, але при тому він є більш швидким, оскільки суспензія фільтрується досить повільно. А також основною задачею є отримання максимально звільнену фракцію із цільовим продуктом, який після центрифугування повністю відділиться від рідкої фази, чого за допомогою фільтрації досягнути неможливо. Центрифугування проводимо зі швидкість 35000 об/хв протягом 15 хв. А оскільки процес проводимо при досить великій швидкості, тому для того, щоб запобігти саморозігріву проводимо процес при 0 °C, для збереження властивостей продукту [78].

Після осадження варто додати ще *етап очистки*, для отримання лише цільового продукту з високою специфічною активністю. Найпоширенішими методами, які використовують для очистки ензимів, є гель- та іонообмінна хроматографія на різних носіях [75].

Наш вибір зупинимо на *гель-фільтрації* – розділення за розміром молекул, адже за використання даного методу ми унеможливуємо дію температурних або фізичних (взаємодія з колонкою або матеріалом наповнення) факторів на активність кінцевого продукту [84].

Також варто звернути увагу на наповнення та матеріал, що буде застосовуватися при гель-фільтрації. Проаналізувавши літературні дані [6,75,78-80] зупинимось на Цефарозній колонці CL 6-B (швидкість потоку 0,5 мл/хв).

Отже, після низки дій, направлених на виділення та очищення нашого цільового продукту, необхідно привести амілазу до вигляду, який буде застосовуватися за нашим цільовим призначенням – як складова препарату для лікування дизфункції шлунку та кишківника. Тому, нам необхідно перевести амілазу у сухий стан – для подальшого введення в лікарську форму перорального застосування.

Сушіння.

Сушіння – видалення рідини (вологи) з твердих та рідких матеріалів (продуктів, препаратів). Здійснюється за допомогою сушильних установок різного типу [76-77].

Більшість ферментів є термолабільними, тому для їх висушування необхідно використовувати методи, що не призводять до втрати біологічної активності. Крім звичайних методів сушіння, широкого поширення набуло ліофільне висушування препарату. Ліофільне сушіння – широко розповсюджений прийом, що проводиться при порівняно низьких температурах (від -8 до -12 °C). Висушування з використанням розпилюючої сушарки – прогресивний метод; розчин з цільовим продуктом пневматично розпилюється до дрібних крапель у камері зі струмом нагрітого повітря. Процес висушування відбувається протягом декількох секунд. При цьому навіть термолабільні препарати не змінюють свої властивості. Метод завислого шару (сушіння у вакуум-сушильних шафах) застосовується для висушування зернистих та пастоподібних препаратів [85].

Вибір оптимального температурного режиму сушіння обумовлений необхідністю збереження активності субстанції.

У даний час у зв'язку з переходом на GMP-стандарти ведуться розробки нових альтернативних способів сушіння, що відповідають таким критеріям, як високий ступінь чистоти, безперервність і автоматизація процесу, можливість суміщення декількох стадій процесу в одному апараті, контроль якості продукту протягом всього процесу.

Однак, сьогодні для сушіння термолабільних, нестабільних в рідкому стані препаратів широко використовують сублімаційні сушарки, принцип дії яких ґрунтується на випаровуванні води із замороженого стану, оминаючи рідкий агрегатний стан. Підведення тепла до матеріалу, що сушиться, здійснюють контактом з порівняно теплою поверхнею або радіаційним шляхом. Проте, цей метод сушки має ряд недоліків, найбільш значущі з яких:

- високі капітальні та експлуатаційні витрати,
- тривалість і періодичність процесу,
- труднощі автоматизації процесу і контролю якості продукту безпосередньо під час процесу сушіння,
- необхідність подрібнення продукту після сушки, що підвищує ризик забруднення препарату [81].

Тому сублімаційний метод сушіння не використовуємо.

Сушка в псевдорозрідженому шарі - оптимальний спосіб контрольованої, і рівномірної сушки. Завдяки інтенсивному тепло / масообміну в киплячому шарі, процес йде особливо ефективно і швидко. Для висушування матеріалу в періодичному режимі вологий вихідний продукт поміщається партіями в приймальну ємність сушильної установки. Там він перемішується в висхідному турбулентному потоці нагрітого газу і підтримується в підвішеному стані. При цьому продукт висушується в процесі з високими коефіцієнтами тепло- і масопередач до необхідної залишкової вологості. Оптимальна швидкість газу суттєво залежить від величини і щільності частинок. Тепло надходить разом з технологічним повітрям. Температуру технологічного повітря в процесі висушування можна змінювати. В порівнянні з розпилючою сушаркою, сушка в псевдорозрідженому шарі забезпечує надзвичайно швидку, ніжну та рівномірну сушку, а з додаванням форсунки для розпилення сушарка стає гранулятором. Таким чином покриття, гранулювання та сушка - все в єдиній системі, в одному апараті. Суміщення декількох стадій процесу в одному апараті дає можливість автоматизувати

процес, що зменшує втручання людини в процес, що є необхідним при виробництві про біотичних препаратів [6,78].

У фармацевтичній промисловості цей інноваційний метод вже давно замінив сушку в поличних сушарках, що вимагає значних витрат часу. В результаті досягається швидка сушка в м'яких температурних умовах, що дозволяє отримати якісний порошкоподібний продукт, добре розчинний і не вимагає подальшого подрібнення.

Підбір обладнання на даному етапі також залежить від об'ємів матеріалу, що буде надходити на сушіння.

Обґрунтування вибору сушильного агенту

У технології сушіння псевдорозрідженим шаром можна використовувати інертні гази та повітря. Якість повітря використовуваного для сушіння має відповідати певним вимогам (температура, відсутність домішок, вологість). В той же час відпрацьоване повітря не повинно бути небезпечним для оточуючого середовища. Тому необхідна попередня підготовка повітря і знешкодження його після технологічної операції.

Азот в якості сушильного агента було обрано через можливість використання його в рециркуляції в апараті для сушіння з псевдорозрідженим шаром. Це дозволяє зменшити витрати використання сушильного агенту.

4.7. Обґрунтування вибору товарної форми випуску продукту мікробного синтезу Sollpura (упаковки)

Перш за все, перед обранням товарної форми випуску готового лікарського засобу Sollpura, до складу якого входить амілаза (продуцент *Bacillus sp. WangLB*), варто проаналізувати ринок готових лікарських засобів, що містять амілази або інші ферменти. Загалом, це пероральні ліки, які представлені або кишковорозчинними таблетками або капсулами [85].

Також, враховуючи призначення готового лікарського засобу Sollpura – для лікування дизфункції шлунку та кишківника варто зупинитися саме на пероральному шляху введення – для забезпечення швидкого потрапляння ліків у місце призначення та дії.

Згідно літературних джерел [86, 87] пероральні лікарські засоби поділяють таблетки, капсули, драже, гранули, порошки, мікрокапсули, розчини, суспензії, емульсії, настої, відвари, настойки, сиропи, желе. Так як, цільове місце призначення лікарського засобу Sollpura є шлунок та кишківник, то варто обрати лікарську форму, що матиме захист від дії рН та специфічну розчинність – це таблетки, капсули. Таблетки – це тверда лікарська форма, а таблетпреси – доволі складні апарати. Варто зазначити, що підбір правильного складу для таблетки, що забезпечить злипання, зберігання форми та цілеспрямовану доставку, підбір та використання інертної первинної упаковки (блістер), що забезпечить безпечне зберігання лікарського є доволі довготривалим процесом. Набагато простіше використовувати капсули – первинна упаковка з бажаними характеристиками замовляється у виробників з відпрацьованим процесом. А наповнення передбачає використання суміші ферменту (активного фармацевтичного інгредієнту), наповнювача та, за необхідності, стабілізатора.

Тому товарною формою готового лікарського засобу з амілозою у якості діючої речовини будуть капсули у пластикових флаконах.

Вторинна упаковка буде власне пластикові флакони з матеріалу, що дозволений для використання у фармацевтичній галузі. Зупинимось саме на

флаконах, адже у нас передбачається довготривалий курс лікування (підтримуюча терапія протягом всього життя), тому немає сенсу обирати більш індивідуальну вторинну упаковку (блістери) – це невиправдано підвищить ціну на наш готовий лікарський засіб.

Випуск будемо здійснювати по 30 капсул у одному флаконі. Зважаючи на потребу – 14 802 750 000 ОД амілази в рік, та вміст ферменту в одній капсулі (1500 ОД) матимемо 9 868 500 капсул, що дорівнює 328 950 флаконам.

РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДАННЯ

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

Таблиця 5.1

Специфікація ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу ферменту

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
1	2	3	4
P-1	Реактор-змішувач для приготування робочого розчину кальцинованої соди	1	Реактор-змішувач об'ємом 150 л, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (20-1000 об/хв), сталь н/ж 316L AISI. Виробник: «Промвіт» (Україна) ¹
H-2, H-4, H-13, H-16, H-18, H-21, H-24, H-27	Насос відцентровий	3	Насос відцентровий Debem MB 120. Продуктивність 25,0 м ³ /год, матеріал поліпропілен (PP/PVDF). Виробник: «Debem» (Україна). ²
P-3	Реактор-змішувач для приготування буферу	1	Реактор-змішувач об'ємом 80 л, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (20-1000 об/хв), сталь н/ж 316L AISI. Виробник: «Промвіт» (Україна) ¹
ПЗ-5	Пристрій для забору повітря	1	Повітрязабірник, обладнаний металевою сіткою для видалення механічних забруднень
Ф-6, Ф-32	Фільтр грубої очистки повітря	2	Фільтр CFM. Фільтруючий матеріал – плетена алюмінієва проволка, швидкість фільтрування – 2 м/с, Е = 75 %. Виробник: «General filter» (Італія). ³
К-7	Компресор	1	Компресор Inversys Plus з прямим приводом. Максимальний робочий тиск 1,0 МПа. Виробник: «Dalgakiran» (Туреччина). ⁴

НУХТ БТЕК 02.02.06 КР ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата
		Козаченко Є.Р.		
		Слободян О.П.		
		Стабніков В.П.		
РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДАННЯ				
		Літ.	Арк.	Акрушів
		48	89	Кафедра БТМ

Продовження табл. 5.1

1	2	3	4
T-8	Теплообмінник-охолоджувач	1	Охолоджувач повітря Systemair PGK. Максимальний робочий тиск 1,6 МПа, вихідна температура повітря 20 °С. Виробник: «Systemair» (Швеція). ⁴
P-9	Ресивер	1	Ресивер РВ 900.10. Об'єм 900 л, робочий тиск 1,1 МПа. Виробник: «Remeza» (Білорусь). ⁴
T-10	Теплообмінник-нагрівач	1	Повітренагрівач каналний водяний Systemair VBR. Максимальний робочий тиск 1,6 МПа, при температурі води 100 °С. Виробник: «Systemair» (Швеція). ⁴
Ф-11, Ф-31, Ф-36	Головний фільтр очистки повітря	3	Фільтр (P)–GSL N. Фільтруючий матеріал – нержавіюча сталеві сітка, швидкість фільтрування – 0,025 м/с, E = 95 %. Виробник: «Donaldson» (США). ⁵
P-12	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації композиції I	1	Реактор-змішувач об'ємом 63 л, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (20-500 об/хв), сталь н/ж 316L AISI. Виробник: «Промвіт» (Україна) ¹
Ф-14	Індивідуальний фільтр очистки повітря	1	Фільтри (P)–SRF N. Фільтруючий матеріал – фторопласт, швидкість фільтрування – 0,025 м/с, E = 99,9999 %. Виробник: «Donaldson» (США). ⁵
ФР-15	Ферментер	1	Ферментер об'ємом 100 л, оснащений сорочкою, барботером, пробовідбірником, лопатевою мішалкою (50-500 об/хв), $K_{зап} = 0,5-0,6$, нержавіюча сталь 304. Виробник: Vionet (Іспанія) ⁶
P-17	Реактор-змішувач для зберігання культуральної рідини	1	Реактор-змішувач об'ємом 80 л, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (20-1000 об/хв), сталь н/ж 316L AISI. Виробник: «Промвіт» (Україна) ¹
Ц-19	Центрифуга	1	Центрифуга Alfa Laval ВТРХ, є можливість підключення до СІР мийки, можливість стерилізації та використання при потоковій швидкості культуральної рідин до 100 л/год Виробник: Alfa Laval, Швеція ⁷

Продовження табл. 5.1

1	2	3	4
P-20	Реактор-змішувач для зберігання рідини	1	Реактор-змішувач об'ємом 80 л, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (20-1000 об/хв), сталь н/ж 316L AISI. Виробник: «Промвіт» (Україна) ¹
УФ-22	Ультрафільтраційна установка	1	Установка ультрафільтрації ECOSOFT UF-01 Виробник: Україна ⁸
P-23	Реактор-змішувач для зберігання рідини	1	Реактор-змішувач об'ємом 80 л, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (20-1000 об/хв), сталь н/ж 316L AISI. Виробник: «Промвіт» (Україна) ¹
Ц-25	Центрифуга	1	Центрифуга EMBL 503. Продуктивність центрифуги складає від 50 до 3000 л/год, обороти – 35000 об/хв
P-26	Реактор-змішувач для зберігання рідини	1	Реактор-змішувач об'ємом 80 л, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (20-1000 об/хв), сталь н/ж 316L AISI. Виробник: «Промвіт» (Україна) ¹
ГХ-28	Гель-хроматографічна колонка	1	Колонка заповнена сефарозою CL 6-B
Б-29	Балон зі стисненим іназотом	1	Балон 40 л. Стиснений, очищений азот, робочий тиск 150-200 атм. Виробник : «Weldex» (Україна).
T-30 T-35	Теплообмінники для охолодження та нагрівання азоту	2	Теплообмінники для охолодження та нагрівання азоту. Виробник «Innojet» Німеччина
Ц-33	Циклон	1	Циклон Виробник «Glatt», Німеччина з модифікованою системою фільтрації вихідного отвору (Innojet, Німеччина)
С-34	Апарат для сушки в псевдорозрідженому шарі	1	Апарат для сушки в псевдорозрідженому шарі GPCG 10. Виробник «Glatt», Німеччина з модифікованою системою фільтрації вихідного отвору (Innojet, Німеччина)

1	2	3	4
Є-37	Ємність для сухої сировини	1	Ємність сталь 12X18H10T. Виробник: Завод химического оборудования «Заря» (Росія).
A-38	Змішувач	1	Змішувач «П'яна бочка» MIXOMAT C-SE «FUCHS, виробник: Maschinen AG», Гранж- Пакко (Швейцарія) ¹⁰ .
ПМВ-39	Фасувальна машина	1	Фасувальна машина сипучих матеріалів в капсули
	Фасувальна машина	1	Фасувальна машина капсул у флакони
	Закупорювач кришок	1	Закупорювач кришок HUALIAN DK-50/D
	Етикетувальна машина	1	Етикетувальна машина RF-50 / 120-24 (Німеччина)
	Групова тара	1	Групова тара з картону на 20 флаконів

Примітка: пошук і підбір обладнання здійснювався з використанням наступних електронних джерел: 1. <http://promvit.com.ua/> («Промвіт», ємнісне обладнання), 2. www.debem.com.ua («Debem», насоси), 3. <http://www.air-filter.com.ua> («General filter», фільтри для повітря), 4. <http://www.vent-magazin.ru>, <http://www.dalgakiran.com.ua> («Далгакиран компресор Україна», обладнання для підготовки повітря), 5. <http://www.emea.donaldson.com> («Donaldson» фільтри для повітря), 6. <https://bionet.com/technology/f3-bioreactor/> (De Dietrich®, ферментер), 7. <https://www.alfalaval.com/products/separation/centrifugal-separators/separators/btpx/> (центрифуга), 8. <https://santlux.com.ua/ustanovka-ultrafiltratsii-ecosoft-uf-01> (Ультрафільтраційна установка), 9. <https://www.yenchen.com.tw/en/product/Spray-Dryer/spray-dryer-331.html> (сушарка), 10. <https://www.fuchsag.com/smesitel-tipa-pjanaja-bochka.html> (п'яна бочка),

РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

Технологічна схема біосинтезу ферменту амілази під час культивування *Bacillus* sp. WangLB включає в себе допоміжні роботи (приготування та стерилізація 6% розчину NaOH, приготування та стерилізація поживних середовищ) та технологічний процес (підготовка посівного матеріалу і біосинтез цільового продукту).

Технологічну схему біосинтезу ферменту амілази *Bacillus* sp. WangLB наведено у графічній частині проекту.

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

Обов'язковою частиною підготовчих робіт на біотехнологічних підприємствах є проведення робіт санітарно-гігієнічного спрямування. Основним спрямуванням санітарної підготовки виробництва є забезпечення мінімальної кількості контамінантів у всіх учасників виробничого процесу: в поживному середовищі, на поверхнях обладнання, яке контактує з культуральною рідиною, забезпечення чистоти на виробничих ділянках де чистота та асептика впливають на якісні показники продукції. Роботи санітарно-гігієнічного призначення суттєво впливають на створення безпечних умов праці і охороні здоров'я працівників підприємства. Санітарна підготовка виробництва реалізується виконанням робіт по щоденному позмінному та генеральному прибиранні виробничих приміщень та централізованою підготовкою обладнання.

ДР 1.1. Підготовка мийних та дезінфікувальних засобів

ДР 1.1.1. Приготування робочого розчину Хлорантоїну

У лабораторному приміщенні у переносній емальованій ємкості об'ємом 10 л готують робочий мийно-дезінфікувальний засіб Хлорантоїну концентрацією 0,2 %. Для цього змішують 16 г порошку і 8 л питної гарячої води ($T=60\pm 5^{\circ}\text{C}$) – для кращого розчинення Хлорантоїну.

					НУХТ БТЕК 02.02.06 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Козаченко С.Р.			РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	Літ.	Арк.	Акрюшів
Перевір.		Слободян О.П.					52	89
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

ДР 1.1.2. Приготування робочого розчину кальцинованої соди

Необхідно приготувати 100 л робочого розчину кальцинованої соди концентрацією 2,0 %. У реактор-змішувач (Р-1) об'ємом 150 л об'ємно-ваговим дозатором вносять 2 кг кальцинованої соди і додають 98 л питної води. Для повного розчинення у сорочку збірника подають пару для досягнення температури розчину 55-60°C, і вмикають перемішуючий пристрій (100-500 об/хв).

ДР 1.2. Підготовка виробничих приміщень

ДР 1.2.1. Щоденне прибирання виробничих приміщень

Один раз на зміну проводять миття підлоги, використовуючи розчин мийно-дезинфікувального засобу Хлорантоїну (від ДР 1.1.1). Цим же розчином протирають ззовні апаратуру і комунікації; змочують килимки при вході у всі приміщення. Так як виробництво триває 300 днів, необхідно забезпечити виробництво додатковим миючим засобом з іншою діючою речовиною. Через 3 місяці будемо використовувати Біодез-Р.

ДР 1.2.2. Генеральне прибирання виробничих приміщень

Раз на місяць проводять миття стін, вікон та дверей, використовуючи розчин мийно-дезинфікувального засобу Хлорантоїну (від ДР 1.1.1). Протирають ззовні апаратуру і комунікації.

Для перевірки мікробіологічної чистоти проводять мікробіологічний контроль ($KУО < 800/см^2$).

ДР 1.3. Підготовка технологічного обладнання та комунікацій

ДР 1.3.1. Миття та ополіскування обладнання та комунікацій

Для миття обладнання та комунікацій застосовують розчин кальцинованої соди у концентрації 2 % (від ДР. 1.1.2) підігрітого до температури 50 – 60 °С, а саме подаючи цей розчин від збірника (Р-1) відцентровим насосом (Н-2) по комунікаціям до відповідних апаратів до заповнення 50% об'єму апаратів, вмикають перемішуючий пристрій. Миття здійснюють протягом 1 год при перемішуванні. Відпрацьований розчин після миття йде на стадію

знешкодження відходів (до ЗВ 13.1). Для ополіскування в апарати по комунікаціях подається питна вода до заповнення 50% об'єму апаратів, вмикають перемішуючий пристрій. Далі після зливу вода направляєється на стадію знешкодження відходів (до ЗВ 13.1).

ДР 1.3.2. Технічний огляд

Після миття та ополіскування ємкісного обладнання проводять його технічний огляд з метою виявлення можливих неущільнень в комунікаціях та запірній арматурі на обладнанні. У разі їх знаходження проводять підтягування різьбових з'єднань.

ДР 1.3.3. Перевірка на герметичність

На ємкісному обладнанні закривають усю запірну арматуру і подають аераційне повітря до набору надлишкового тиску $P = 0,1-0,2$ МПа. Перекривають вентиль подачі повітря і фіксують показання манометра на кришці апарату та час витримки (30-60 хв) в операційному журналі. Якщо падіння тиску не перевищує 0,01 МПа, вважається, що апарат герметичний. В іншому випадку здійснюють пошук неущільнень за допомогою галогенових течієпошукачів. Перед набором тиску в апарат вносять невелику кількість легкої галогенвмісної речовини (чотирихлористий карбон), закривають усю запірну арматуру, апарат нагрівають до температури 80 °С і збільшують тиск в апараті до 0,2 МПа.

Тривалість операції становить 1,5-2 год. У разі виявлення неущільнень здійснюють їх ліквідацію.

ДР 1.3.4. Стерилізація обладнання

Для проведення стерилізації в сорочку апарата подають пару і нагрівають апарат до температури 80–90 °С. Відкривають усю запірну арматуру на відкритих трубних закінченнях та підведених до апарата комунікаціях і подають гостру пару безпосередньо в апарат (через нижній спуск або барботер), при цьому обов'язково відкривають вентиль виходу відпрацьованого повітря для видалення повітря з апарату. При досягненні температури стерилізації (130–135 °С) всю запірну арматуру, крім парової,

закривають і витримують протягом 1 години. Після завершення витримки парову арматуру закривають, подають в апарат стерильне повітря, а в сорочку холодну воду. Процес охолодження здійснюють до досягнення температури 30–40 °С і надлишкового тиску $P = 0,003\text{--}0,005$ МПа.

ДР 1.4. Підготовка персоналу

ДР 1.4.1 Навчання персоналу

Навчання персоналу забезпечує саме підприємство. На підприємстві існують такі види навчань:

1. Основне навчання: проводиться один раз на рік; персонал ознайомлюється з теорією і практикою;
2. Вхідне навчання: проводиться по мірі необхідності, коли на певну посаду наймають нового співробітника;
3. Подальше навчання: здійснюється систематично з подальшим оцінюванням практичної ефективності проведених навчань.

ДР 1.4.2 Санітарно-гігієнічна підготовка персоналу

Для миття рук персоналу використовують мило туалетне та мило господарське.

ДР 2. Підготовка аераційного повітря

ДР 2.1. Забір атмосферного повітря

Забір атмосферного повітря здійснюють на висоті 5 м через пристрій для забору повітря (ПЗ-5).

ДР 2.2. Грубе очищення повітря

Повітря очищується від грубого аерозолю на фільтрі грубої очистки (Ф-6). Ступінь очищення – 90 %.

ДР 2.3. Стиснення повітря

Повітря стискають у компресорі (К-7) до 0,4 МПа. Стиснення повітря в компресорі призводить до підвищення його температури до 120–250 °С і збільшення вмісту вологи.

ДР 2.4. Охолодження повітря та видалення вологи

Стиснене повітря «переохолоджують» в охолоджувачі (Т-8) повітря до температури 20 °С для відведення надлишкової вологи. Далі повітря подають на ресивер (Р-9) для згладжування пульсацій і відділення зайвої вологи (W = 60 %).

ДР 2.5. Нагрівання повітря

Охолоджене повітря підігривають до 35 °С для унеможливлення конденсації пари на волокнах головного та індивідуальних фільтрів. Нагрів здійснюють за теплообмінника (Т-10).

ДР 2.6. Очищення повітря в головному фільтрі

Попереднє очищення повітря від мікроорганізмів здійснюють в головному фільтрі (Ф-11). Ступінь очищення – 98 %.

ДР 2.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

Всі інокулятори і ферментер оснащують індивідуальним фільтром для заключної очистки повітря (Ф-14). Ступінь очищення досягає 99,999%.

ДР 3. Підготовка азоту як сушильного агенту.

ДР 3.1 Нагрівання азоту.

Азот подають від балону (Б-29) через вентиль до теплообмінника (Т-35), де нагрівається до заданої температури $(75) \pm 2^\circ\text{C}$.

ДР 3.2 Очищення азоту на фільтрі тонкої очистки.

Азот додатково очищується на фільтрі тонкої очистки (Ф-36) та подається в апарат сушки (С-34). Ступінь очищення становить 95 %. (до ТП 8)

ДР 3.3 Очищення відпрацьованого азоту на фільтрі грубої очистки.

Так як процес замкнений і відбувається рециркуляція азоту, то відпрацьований азот пройшовши через циклон (Ц-33) подається на фільтр грубої очистки G2 (Ф-32), ступінь очищення 75%.

ДР 3.4 Очищення відпрацьованого азоту на фільтрі тонкої очистки.

Подальше очищення азоту відбувається на фільтрі тонкої очистки (Ф-31). Ступінь очищення становить 95 %.

ДР 3.5 Охолодження азоту.

Потім азот направляється до охолоджувача (Т-30), де конденсується зайва волога, після чого азот знову можна використовувати і цикл повторюється (до ДР 3.1).

ДР 4. Приготування та стерилізація розчинів реагентів

ДР 4.1. Приготування і стерилізація 6% розчину гідроксиду натрію

Для приготування 200 мл 6% розчину NaOH, необхідно 12 г кристалічного NaOH і 188 мл дистильованої води.

На технічних вагах зважують 12 г кристалічного NaOH. Наважку поміщають в колбу об'ємом 500 мл, додають 188 мл дистильованої води і перемішують до повного розчинення, далі закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізують в автоклаві при температурі 131°C (0,15 МПа) упродовж 40 хв.

ДР 4.2. Приготування фосфатного буферного розчину

Для приготування фосфатного буферу використовують суміш солей гідро-, дигідрофосфату натрію та дистильованої води. Згідно літературних даних [5] значення рН фосфатного буферу становило 7,5. Для отримання розчину заданого значення рН потрібно [16]:

- NaH_2PO_4 – 3.4 г розчиненому у 1000 мл дистильованої води;
- Na_2HPO_4 – 20.2 г розчиненому у 1000 мл дистильованої води.

Отриманий розчин стерилізують в реакторі (Р-3) при $t=121^\circ\text{C}$, 20 хв. У подальшому розчин будемо використовувати на стадіях концентрування та очищення цільового продукту (для розчиння ферменту і збереження необхідної конформації).

ДР 5. Приготування та стерилізація поживних середовищ

ДР 5.1. Приготування поживного середовища для вирощування інокуляту у колбах на качалках

Для вирощування інокуляту на даному етапі необхідно приготувати 2,6 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 2,6 л поживного середовища наведено в табл. 6.1.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 2,6 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 2,6 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
крохмаль	20	52	I	1,6
пептон	1	2,6		
аланін	1 780 мг	4628 мг		
KH_2PO_4	0,5	1,3	II	0,5
KNO_3	1	2,6	III	0,5
NaCl	0,5	1,3		
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5	1,3		
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,01	0,003		

ДР 5.1.1. Приготування і стерилізація композиції I

На технічних вагах зважують 52 г крохмалю, 2,6 г пептону, та на аналітичних вагах зважують 4628 мг аланіну. Наважки поміщають у колбу об'ємом 3 л, додають 1600 мл дистильованої води і перемішують до повного розчинення. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112°C упродовж 30 хв.

ДР 5.1.2. Приготування і стерилізація композиції II

На технічних вагах зважують 1,3 г монофосфату калію. Наважку поміщають у колбу об'ємом 1 л, додають 500 мл дистильованої води і стерилізують при температурі 131°C упродовж 40 хв.

ДР 5.1.3. Приготування і стерилізація композиції III

На технічних вагах зважують 2,6 г калій нітрату, 1,3 г натрій хлориду, 1,3 г кристалогідрату магній сульфату та на аналітичних вагах зважують 0,003 г ферум сульфату. Наважки поміщають у колбу об'ємом 1 л, додають 500 мл дистильованої води і перемішують до повного розчинення. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°C упродовж 40 хв.

ДР 5.2. Приготування поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 100 л

Для проведення стадії виробничого біосинтезу необхідно приготувати 55,5 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 55,5 л поживного середовища наведено в табл. 6.2.

Для засіву поживного середовища у ферментері необхідно внести 2,6 л рідкого інокуляту, тому сумарна кількість води для композиції становить 50 л (так як стерилізація проходить безпосередньо в ферментері, також враховують 10% конденсату).

Таблиця 6.2

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 55,5 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 55,5 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
крохмаль	20	1110	I	49,5
пептон	1	55,5		
аланін	1 780 мг	98,8		
KH_2PO_4	0,5	27,75	II	0,1
KNO_3	1	55,5	III	0,4
NaCl	0,5	27,75		
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5	27,75		
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,01	0,55		

ДР 5.2.1. Приготування і стерилізація композиції I

На технічних вагах зважують 1110 г крохмалю, 55,5 г пептону, та 98,8 г аланіну. Наважки поміщають у реактор-збірник (Р-12) об'ємом 63 л та додають за допомогою об'ємно-вагового дозатора 49,5 л питної води. Для повного розчинення компонентів у сорочку збірника подають пару для досягнення температури розчину 40°C, і вмикають перемішувачий пристрій.

Приготовлену композицію подають за допомогою насосу (Н-13) у попередньо простерилізований ферментер (ФР-15). Стерилізація композиції проходить безпосередньо в ферментері при температурі 112°C упродовж 40 хв. Після стерилізації здійснюють мікробіологічний контроль.

ДР 5.2.2. Приготування і стерилізація композиції II

На технічних вагах зважують 27,75 г монофосфату калію. Наважку поміщають у колбу об'ємом 200 мл, додають 100 мл дистильованої води і стерилізують при температурі 131°C упродовж 40 хв.

ДР 5.2.3. Приготування і стерилізація композиції III

На технічних вагах зважують 55,5 г калій нітрату, 27,75 г натрій хлориду, 27,75 г кристалогідрату магній сульфату та 0,55 г ферум сульфату. Наважки поміщають у колбу об'ємом 1 л, додають 400 мл дистильованої води і перемішують до повного розчинення. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°C упродовж 40 хв.

ТП 6. Підготовка посівного матеріалу

ТП 6.1. Підтримання колекційної культури

Культуру *Bacillus sp.* WangLB зберігають у пробірках зі скошеним агаризованим середовищем LB (дріжджовий екстракт, пептон і натрій хлорид) у холодильнику при температурі 4 °C. Пересіви здійснюють кожний місяць. Усі роботи з культурою проходять строго в стерильних умовах.

ТП 6.2. Одержання робочої культури Bacillus sp. WangLB на агаризованому середовищі

Робочу культуру штаму-продуцента отримують розсівами культури на чашки Петрі із агаризованим LB середовищем в асептичних умовах. Культуру на чашці Петрі вирощують при температурі 37°C протягом 24 год.

ТП 6.3. Вирощування робочої культури Bacillus sp. WangLB на агаризованому середовищі

Ізольовані колонії від ТП 5.2 в асептичних умовах пересівають петлею у пробірки з агаризованим середовищем. Одна ізольована колонія засівається в одну окрему пробірку. Для пересіву використовують колонії, що знаходяться на відстані не менше 1 см одна від одної. Пробірки інкубують 24 год при температурі 37°C.

ТП 6.4. Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках

У колбу об'ємом 3 л із 1600 мл розчину композиції I (від ДР 4.1.1) в асептичних умовах вносять 500 мл розчину композиції II (від ДР 4.1.2) та 500 мл композиції III (від ДР 4.1.3). Розчин перемішують і розливають по 200 мл в 13 стерильних качалочних колби об'ємом 750 мл.

У пробірку з робочою культурою *Bacillus sp. WangLB*, вирощену на LB агарі, асептично вносять 5 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини (змивають культуру), піпеткою відбирають одержану суспензію клітин і вносять у колби з розлитим поживним середовищем. Для засіву однієї колби використовують бактеріальну суспензію, одержану з однієї пробірки.

Культивування продуцента здійснюється у колбах на качалці (200 об/хв) при 30°C упродовж 48 год. Під час культивування відбирають пробу для здійснення мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси. Після завершення вирощування в асептичних умовах інокулянт з 13 колб переносять в засівну колбу об'ємом 3 л, перемішують, закривають пробкою.

ТП 7. Біосинтез

У ферментер (ФР-15) об'ємом 100 л з композицією I (ДР 5.2.1) за допомогою засівної колби подають композицію II (ДР 5.3.2) та композицію III (ДР 4.3.3), далі за допомогою засівної колби 6% розчин NaOH (ДР 4.1) до рН 10,0.

Далі за допомогою засівної колби вносять посівний матеріал (від ТП 6.4). Вмикають перемішування та аерацію, в рубашку ферментера подають пару.

Культивування здійснюють при температурі 35 °C впродовж 48 год, швидкість перемішування становить 400 об/хв.

Кожні 4-6 години відбирають пробу культуральної рідини для проведення мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси. У пробі відібраній на 48 годину культивування, активність ферменту повинна перебувати в межах $26,670 \pm 1390$ ОД/мл.

ТП 8. Видділення біомаси

Культуральна рідина з ферментаційного процесу насосом передається в реактор (P-17). З реактора (P-17) відцентровим насосом (Н-18) культуральна рідина подається до центрифуги (Ц-19). Центрифугування відбувається упродовж 15 хвилин, у центрифугі (Ц-19) при частоті обертання 30000 об/хв при температурі 4°C. Біомаса подається на знешкодження відходів (ЗВ 13.2). Супернатант подається на наступні етапи виділення та очищення.

ТП 9. Концентрування та очищення цільового продукту

ТП 9.1. Ультрафільтрація

Супернатант (від ТП 8) перекачується у збірник нативного розчину ультрафільтраційної установки (P-20). Після чого супернатант перекачується за допомогою насоса (Н-21) на ультрафільтраційну установку (УФ-22), де через попередній фільтр (з відсічення молекулярної маси 100 кДа), після чого потрапляє до ультрафільтраційного модуля. Після першого процесу ультрафільтрації фільтрат подається на наступний попередній фільтр (з відсічення молекулярної маси 30 кДа), після чого потрапляє до ультрафільтраційного модуля. Після другої ультрафільтрації фільтрат перекачували у реактор (P-23). Пермеат направляли на знешкодження (до ЗВ 13.1)

ТП 9.2. Осадження амоній сульфатом

Кристалічний сульфат амонію повільно додавали до реактора (P-23) при постійному перемішуванні (підтримували температуру 4°C) до отримання кінцевої концентрації насичення 40%. Витримували протягом 18 год при 4 °С.

ТП 9.3. Відокремлення осаду

Осад відокремлювали центрифугуванням (Ц-25) при 35000 об/хв протягом 15 хвилин при температурі 0 °С Далі осад подавали в реактор (P-26) і розчиняли у мінімальному об'ємі 0,1 М фосфатного буфера (рН 7,5) (від ДР 4.2.).

ТП 9.4. Гель-фільтрація

Потім концентрат (від ТП 8.3) наносили на колонку з сефарозою CL 6-B (ГХ-28), попередньо врівноважену 0,1 М фосфатним буфером (рН 7,5) (від ДР 4.2.). Колонку промивали 500 мл врівноважувальним буфером і зв'язаний білок елюювали тим же буфером. Фракції (2,0 мл) збирали при швидкості потоку 0,5 мл/хв і аналізували на активність ферменту.

ТП 10. Сушіння

Суспензію отриману в результаті гель-фільтрації (від ТП 9.4) подають на сушильну установку з псевдорозрідженим шаром (С-34), і через розпилюючу форсунку, яка знаходиться знизу, розпилюється на амілазу. Швидкість потоку $7 \pm 0,5$ м/с. Температура сушильного агента $(75 \pm 2)^\circ\text{C}$. Час розпилення 15 хв. Після розпилення суспензії сушку продовжують, доки температура продукту не підвищиться на 3°C вище початкової температури $(40 \pm 2)^\circ\text{C}$. Висушену амілазу через циклон (Ц-33) вивантажуються до ємності (Є-37). Вологість кінцевого продукту становить 5%.

ТП 11. Змішування компонентів

У змішувач (А-38) додаються попередньо зважені допоміжні речовини (целюлоза мікрокристалічна, кремнію діоксид безводний, магнію стеарат, тальк натрію гідроксид) інші активні фармацевтичні інгредієнти (ферменти протеазу та ліпазу мікробного походження, виготовленими іншими компаніями) та суха амілоза (від ТП 10).

ПМВ 12. Пакування, маркування, відвантаження

ПМВ 12.1. Фасування

Готову суміш з амілазою подають в пакувальну установку (ПМВ-39), де спочатку суміш подається в апарат для наповнення капсул. Закупорені капсули по транспортеру потрапляють у пакувальну машину для наповнення флаконів. Апарат автоматично відраховує по 30 капсул в один флакон.

ПМВ 12.2. Пакування та маркування

На флакони (від МПВ 12.1) наносять етикетки з інструкцією, датою виробництва.

ПМВ 12.3. Фасування флаконів у групову тару

Готові флакони (від МПВ 12.2) пакують у групову тару (по 20 флаконів) та відвантажують на склад.

ЗВ 13. Знешкодження відходів

ЗВ 13.1. Знешкодження рідких відходів

Розчини мийно-дезінфікувальних засобів від ДР 1.2.1, ДР 1.2.2, ДР 1.3.1 йдуть на очисні споруди. Стічні води біотехнологічних виробництв можуть містити живу мікрофлору та інші шкідливі речовини. На виході з цеху стічні води стерилізують і нейтралізують. Надалі їх спрямовують в каналізацію.

ЗВ 13.2. Знешкодження твердих відходів

Для знешкодження та утилізації твердих відходів використовують термічні методи їх обробки на сміттєспалювальних заводах та полігонах.

ЗВ 13.3. Знешкодження газоподібних відходів

Відпрацьовані гази подають на розділення методом низькотемпературної ректифікації, для отримання аргону, який повторно залучається у процес. Відпрацьоване повітря, що надходить з ферментеру (від ТП 7) відправляють у системи знешкодження повітряних відходів.

РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

7.1. Мікробіологічний контроль

Здійснення мікробіологічного контролю відбувається розсівом культуральної рідини на чашки Петрі з агаризованими середовищами та мікроскопіюванням.

Культуральну рідину розсівають петлею до ізольованих колоній на чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром (МПА) для виявлення бактерій. Сусло-агар (СА) або глюкозо-картопляний агар (ГКА) використовують для виявлення дріжджів та грибів [70].

Мікроскопіювання здійснюють з використанням препаратів «роздавлена крапля». Препарат готують на предметному склі, яке попередньо знежирюють. Після нанесення на скло маленької краплі культуральної рідини, його накривають накривним скельцем і мікроскопіюють з об'єктивом 40x без імерсійної системи та 90x з імерсійною системою. Наявність інших клітин, які будуть відрізнятися за формою та розмірами, може свідчити про наявність сторонньої мікробіоти.

7.2. Показники росту і синтезу

Визначення концентрації біомаси

Біомасу визначають непрямим методом – за оптичною густиною клітинної суспензії з наступним перерахунком на суху біомасу за допомогою калібрувального графіка.

Суть методу є вимірювання інтенсивності світла при його проходженні через суспензію мікроорганізмів. Клітини мікроорганізмів поглинають і розсіюють світло, причому інтенсивність цих процесів залежить від числа клітин і їх розмірів.

					НУХТ БТЕК 02.02.06 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Козаченко Є.Р.			РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Слободян О.П.					65	89
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Методика визначення: відбирають проби по 10 мл культуральної рідини. Зміну інтенсивності світла при проходженні через суспензію клітин вимірюють за допомогою фотоелектроколориметра (ФЕК) або спектрофотометра, вибираючи довжину хвилі (зазвичай в інтервалі 540-650 нм), за якої поглинання світла даною суспензією клітин є мінімальним. За високих концентрацій клітин в культуральній рідині відбувається вторинне розсіювання світла, що призводить до отримання занижених результатів. Тому суспензії великої щільності перед вимірюванням необхідно розводити водою. Розведення проб однієї і тієї ж культури різними рідинами неприпустимо, так як набухання і стиснення клітин впливає на величину світлорозсіювання. Для побудови калібрувальної вимірюють величину світлорозсіювання суспензій з різним вмістом клітин і в кожній з них визначають одним із застосовуваних методів кількість клітин або біомасу. Отриману залежність виражають графічно, відкладаючи на осі ординат значення ФЕК, а на осі абсцис – кількість клітин, що містяться в 1,0 мл суспензії, або біомасу в г/л. Для кожного мікроорганізму слід будувати свою калібровану криву [70].

Визначення концентрації цільового продукту – амілази [6]

Культуральну рідину центрифугували при $12000 \times g$ та $4^\circ C$ протягом 10 хв. Далі супернатант фільтрували за допомогою поліетерсульфонової мембрани (0,22 мкм; Sterlitech Corporation, Кент, Вашингтон, США) з подальшою діалізацією за допомогою діалізної трубки (відсікання молекулярної маси, 1 кДа) при $4^\circ C$ протягом 24 год. Потім розчин перенесли в іншу діалізну пробірку з обмеженням молекулярної маси 50 кДа і концентрували 10% (м / об) поліетиленгліколем при $4^\circ C$ протягом 24 год. Потім фермент очищали методом осадження білка за дії суміші трихлороцтова кислота (ТСА) / ацетон (об/об, 1:4). Розчини ТСА / ацетон додавали до концентрованого розчину ферменту з об'ємним співвідношенням 4: 1 для осадження ферменту при $-20^\circ C$ протягом 12 год. Після осадження розчин ферменту центрифугували при $12000 \times g$ протягом 10 хв. Білкову гранулу тричі промивали 100% ацетоном, а потім сушили з отриманням сирого

ферменту для наступних експериментів. Очищену амілазу вимірювали електрофорезом додецилсульфату натрію в поліакриламідному гелі (SDS-PAGE) для визначення молекулярної маси та активності

7.3. Визначення концентрації джерел вуглецю і азоту

Визначення концентрації джерела вуглецю

Джерелом вуглецю є крохмаль.

Визначення редукуючих цукрів (метод Мюллера) [88]

Реактив Мюллера складається з сульфату міді, сегнетової солі та карбонату натрію.

Метод визначення ґрунтується на окисненні редукуючих цукрів сіллю двовалентної міді та прямому визначенні відновленої форми міді в присутності її окисненої форми .

Метод визначення: у термостійку конічну колбу вносять 25 мл поживного середовища, в якому міститься 15-40 мг/100 мл редукуючих цукрів і додають 10 мл реактиву Мюллера. Колбу витримують 10 хв у киплячій водяній бані так, щоб рівень розчину в ній був на 2-3 см нижчим, ніж рівень води у бані. Дно колби не повинне торкатись дна бані. Після десятихвилинного кип'ятіння колбу виймають з бані, швидко охолоджують до кімнатної температури.

Розчин повинен мати голубе або зелене забарвлення. Наявність жовтого забарвлення вказує на недостатню кількість реактиву Мюллера. У цьому випадку дослід слід повторити. Після охолодження додають 5 мл оцтової кислоти і 5-20 мл розчину йоду концентрацією $C = 1/30$ моль/л. колбу закривають пробкою і залишають на 2 хв при кімнатній температурі, періодично перемішуючи суміш. Надлишок йоду титрують розчином $N_2S_2O_3$ до появи блідо-жовтого забарвлення, надалі додають 2-3 мл 0,5% розчину крохмалю. титрування завершують після досягнення зеленого забарвлення розчину.

Паралельно ставлять контрольний дослід за цією ж методикою, але без кип'ятіння. Вміст редуруючих цукрів розраховують з врахуванням того, що 1 мл витраченого на реакцію розчину йоду відповідає 1 мг інвертного цукру:

$$C = 100 \cdot (V_1 - (V_2 - V_3)) \cdot n / 1000 \cdot V$$

- V_1 – об'єм доданого розчину йоду, мл;
- V_2 – об'єм розчину $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, витрачений на титрування в контрольному досліді, мл;
- V_3 – об'єм розчину $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, витрачений на титрування в основному досліді, мл;
- n – ступінь розбавлення специфічного розчину;
- V – об'єм аналізованої проби, мл.

Визначення концентрації джерела азоту

В якості джерела азоту в середовищі виступають пептон та аланін. Для визначення азоту амінокислот (у пептоні та аланіні) використовуємо метод формольного титрування (або титрування по Серенсену). Метод базується на взаємодії аміногруп білків з формаліном. Під час реакції з формаліном аміногрупа втрачає свої основні властивості, а утворювана метиламінокислота відтитровується 0,1 нормальним розчином лугу NaOH. За кількістю витраченого на титрування лугу визначають кількість COOH-груп. В середньому число карбоксильних груп в амінокислотах приймають рівним числу аміногруп (що цілком справедливо для моноамінокислот, для діамінокислот вводяться відповідні поправки в методику титрування).

Методика визначення. До 1 мл супернатанту культуральної рідини додають 9 мл води (рН розчину має становити 7,0). При необхідності розчин нейтралізують шляхом додавання 0,1 М розчину NaOH або 0,1 М розчину HCl. Після закінчення нейтралізації додають 2 мл розчину формальдегіду, перемішують і титрують 0,1 М розчином NaOH до значення рН 9,1, що не змінюється при перемішуванні протягом 2 хв, або до появи слабо рожевого

забарвлення (індикатор – 1% розчин фенолфталеїну). Паралельно проводять контрольний дослід (паралельно титрують дистильовану воду). 1 мл 0,1 М розчину натрію гідроксиду відповідає 1,4 мг амінного азоту [89].

7.4. Контроль виробництва

7.4.1. Визначення молекулярної маси амілази

Очищену амілазу аналізували за допомогою гель-електрофорезу у гелі з поліакриламідом (SDS-PAGE) для визначення молекулярної маси [30].

Аналіз SDS-PAGE проводили за методом, описаним Laemmli, за допомогою апарату для електрофорезу Bio-Rad (Bio-Rad, Hercules, CA, США). Білковий маркер (з відомою молекулярною масою) та очищену амілазу запускали одночасно у 10% SDS-PAGE для визначення молекулярної маси амілази [30].

7.4.2. Визначення активності ферменту

Після дій описаних в пункті 5.4.1. гель фарбували в Coomassie Brilliant Blue R-250 (панель а) для визначення молекулярної маси ферменту. Гель, що містить 0,25% крохмалю, використовували для визначення активності амілази (панель б). Гель промивали 2% тритоном X-100 і тричі промивали дистильованою водою. Потім гель переносили в 100 мМ буфер PBS (pH 7) та інкубували при 55 °C протягом 20 хв. Отриманий гель фарбували 0,1% розчином червоного конго, а потім очищали 1 М NaCl для візуалізації чітких смуг активності амілази.

Активність амілази визначали шляхом вимірювання вивільнення редукуючого цукру методом 3,5-динітросаліцилової кислоти (DNS). 0,1 мл очищеного ферменту змішували з 0,1 мл 1 % (мас./об.) крохмалю і тримали на водяній бані при 40 °C протягом 20 хв. Після чого додавали 0,3 мл реагенту DNS. Реакційну суміш нагрівали на киплячій водяній бані протягом 5 хв. Після охолодження 0,3 мл розчину наносили в 96-лунковий планшет ELISA для визначення поглинання при 520 нм. Одна одиниця “активності амілази” визначалася як кількість ферменту в 1 мл реакційної суміші, який гідролізував

1 мкмоль відновлюючого цукру (в даному випадку мальтози) за хвилину за стандартних умов аналізу [30].

7.4.3. Вологість кінцевого продукту

Контроль вологості готового продукту проводять за допомогою аналізатора вологості Radwag MA 50/C/P – це сучасний лабораторний електронний вимірювальний прилад виробництва фірми Radwag (Польща), призначений для визначення маси та відносної вологості або сухого залишку у будь-яких сипких і рідких продуктах.

За допомогою даного аналізатора вологості необхідні вимірювання провести набагато простіше і швидше – всього за 5-20 хвилин.

У конструкції аналізатора вологості моделі Radwag MA 50/C/P закладена можливість для підключення персонального комп'ютера, принтера КАФКА і клавіатури, а це, спрощує введення параметрів сушіння.

Бібліотека програми дозволяє користувачеві запрограмувати в прилад до 99-ти власних унікальних умов сушіння. Для роботи системи необхідно буде тільки обрати назву потрібного продукту, а не вводити кожен раз усі параметри сушки. У бібліотеці пам'яті аналізатора зберігаються дані про останні 99 виміри. Ці дані включають дату і час вимірювання, назва продукту, час сушіння, стартову та кінцеву масу, температуру і профіль сушки та результат (вміст вологи).

Загалом, аналізатор вологості Radwag MA 50/C/P – це зручний, практичний і сучасний прилад, який робить процес визначення вологості швидким і нескладним [90].

7.5. Карта постадійного контролю

Таблиця 7.1.

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
1	2	3	4	5
Кх 1.1.1 Підготовка робочого розчину Хлорантоїну	Концентрація розчину Хлорантоїну	Хімічний метод	Після приготування розчину	$C = 0,2 \%$
Кх 1.1.2 Підготовка робочого розчину кальцинованої соди	Концентрація розчину кальцинованої соди	Хімічний метод	Після приготування розчину	$C = 2\%$
Км 1.2.1. Щоденне прибирання виробничих приміщень	Підлога, обладнання, чистота	Візуальний огляд	Під час прибирання	Чисте приміщення, відсутність пилу та бруду
Км 1.2.2. Генеральне прибирання виробничих приміщень	Підлога, стіни, вікна, двері, чистота	Візуальний огляд, мікробіологічний метод	Під час прибирання	Чисте приміщення, відсутність пилу та бруду, КУО < 800/см ²
Кт 1.3.1. Миття та ополіскування обладнання та комунікацій	Мийний розчин, обладнання, температура робочого розчину, чистота	Термометр технічний, годинник	Під час проведення операції обробки, візуальний огляд після миття	$t = 50-60 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 60 \text{ хв}$, чисте обладнання
Кт 1.3.3. Перевірка на герметичність	Герметичність роботи обладнання, час роботи, перепад тиску	Манометр технічний, годинник	Тиск визначається безперервно під час перевірки на герметичність, перепад тиску визначають після проведення операції	$P = 0,1-0,2 \text{ МПа}$, $\tau = 30-60 \text{ хв}$, $\Delta P < 0,01 \text{ МПа}$

Продовження табл. 7.1.

1	2	3	4	5
Кт 1.3.4. Стерилізація обладнання	Обладнання, температура стерилізації, час стерилізації, тиск	Манометр технічний, годинник	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, надлишковий тиск визначають після проведення стерилізації	$P=0,15$ МПа ($t = 130-135$ °С), $\tau = 1$ год, $P = 0,003-0,005$ МПа
Кт 2.2. Грубе очищення повітря	Повітря на виході з фільтра грубої очистки, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр технічний, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення	$E = 90$ %, тиск згідно паспорту
Кт 2.3. Стиснення повітря	Тиск, температура повітря	Манометр технічний, термометр	Після стиснення повітря	$P=0,4$ МПа $t = 120-250$ °С
Кт 2.4. Охолодження повітря та видалення вологи	Температура та вологість повітря	Термометр, психрометричний метод	Після охолодження та видалення вологи	$t = 20$ °С $W = 60$ %
Кт 2.5. Нагрівання повітря	Температура повітря	Термометр	Після нагрівання вологи	$t = 35$ °С
Кт 2.6. Очищення повітря в головному фільтрі	Повітря на виході з головного фільтра, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр технічний, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у головного фільтра	$E = 98$ %, тиск згідно паспорту
Кт 2.7 Очищення повітря в індивідуальному фільтрі	Повітря на виході з головного фільтра, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр технічний, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у головного фільтра	$E = 99,999$ %, тиск згідно паспорту
Кт 3.1 Нагрівання азоту	Нагрітий азот, температура	Термометр технічний	Температура визначається безперервно.	$t = 75 \pm 2$ °С
Кт 3.2 Очищення азоту на фільтрі тонкого очищення	Очищений азот, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр технічний, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки азоту у тонкого очищення фільтра	$E = 95$ %, тиск згідно паспорту

Продовження табл. 7.1.

1	2	3	4	5
Кт 3.3 Очищення відпрацьованого азоту на фільтрі грубої очистки	Очищений азот, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр технічний, ступень очищення згідно паспорту	Після очистки азоту у фільтра грубого очищення	E = 75 %, тиск згідно паспорту
Кт 3.4 Очищення відпрацьованого азоту на фільтрі тонкої очистки	Очищений азот, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр технічний, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки азоту у тонкого очищення фільтра	E = 95 %, тиск згідно паспорту
Кт 3.5 Охолодження азоту	Охолоджений азот, температура	Термометр технічний	Температура визначається безперервно.	T = конденсування °C,
Кт, Кх 4.1. Приготування ы стерилізація 6%-го розчину гідроксиду натрію	Температура, концентрація, тиск, тривалість	Датчик температури та тиску, хімічний метод, годинник	Концентрація визначається після приготування розчину	C = 6 % t = 131 °C P=0,15МПа τ = 40 хв
Кх, Кт 4.2 Приготування фосфатного буферного розчину	Перевірка значення рН, температура, час	Хімічний метод Термометр технічний, Годинник	Перед початком кожного виробничого циклу	pH=7.0 t = 121 °C τ = 20 хв
Кт, Км 5.1.1. Приготування і стерилізація композиції I	Композиція I, тиск, час стерилізації, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 112 °C, P=0,05 МПа, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 5.1.2. Приготування і стерилізація композиції II	Композиція II, тиск, час стерилізації, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °C, P=0,15 МПа, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 5.1.3. Приготування і стерилізація композиції III	Композиція III, тиск, час стерилізації, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °C, P=0,15 МПа, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти

Продовження табл. 7.1.

1	2	3	4	5
Кт, Км 5.2.1. Приготування і стерилізація композиції I	Композиція I, тиск, час стерилізації, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 112^{\circ}\text{C}$, $P=0,05\text{ МПа}$, $\tau = 40\text{ хв}$, відсутність мікробіоти
Кт, Км 5.2.2. Приготування і стерилізація композиції II	Композиція II, тиск, час стерилізації, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 131^{\circ}\text{C}$, $P=0,15\text{ МПа}$, $\tau = 40\text{ хв}$, відсутність мікробіоти
Кт, Км 5.2.3. Приготування і стерилізація композиції III	Композиція III, тиск, час стерилізації, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 131^{\circ}\text{C}$, $P=0,15\text{ МПа}$, $\tau = 40\text{ хв}$, відсутність мікробіоти
Кт, Км 6.1. Підтримання колекційної культури	Колекційна культура, температура, частота пересівів, мікробіологічна чистота	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура протягом зберігання. Мікробіологічна чистота після вирощування культури	$t = 4^{\circ}\text{C}$, $\tau = 3\text{ місяці}$, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 6.2. Одержання робочої культури <i>Bacillus sp.</i> WangLB на агаризованому середовищі	Колекційна культура, температура, тривалість вирощування, мікробіологічна чистота	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура під вирощування. Мікробіологічна чистота після вирощування культури	$t = 30^{\circ}\text{C}$, $\tau = 72\text{ год}$, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 6.3. Вирощування робочої культури <i>Bacillus sp.</i> WangLB на агаризованому середовищі	Робоча культура, температура, тривалість вирощування, мікробіологічна чистота	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура під вирощування. Мікробіологічна чистота після вирощування культури	$t = 37^{\circ}\text{C}$, $\tau = 24\text{ год}$, відсутність сторонньої мікробіоти

Продовження табл. 7.1.

1	2	3	4	5
Кт, Км 6.4. Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках	Посівний матеріал, температура, швидкість перемішування, тривалість культивування, мікробіологічна чистота	Термометр технічний, тахометр, годинник, мікробіологічний контроль	Після вирощування культури в колбах на качалках	$t = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $n = 180\text{ об/хв}$, $\tau = 48\text{ год}$, відсутність сторонньої мікробіоти
Кх, Кт, Км 7. Біосинтез	Культуральна рідина, рН, температура, швидкість перемішування, тривалість культивування, мікробіологічна чистота, концентрація біомаси та кінцевого продукту	Датчик рН та температури, годинник, мікробіологічний контроль, ваговий метод	Під час вирощування культури в ферментері і в кінці процесу. Відбір проб культуральної рідини – кожні 4-6 год	$\text{pH} = 10,0$, $t = 35\text{ }^{\circ}\text{C}$, $n = 400\text{ об/хв}$, $\tau = 48\text{ год}$, відсутність сторонньої мікробіоти, $C = 26,670 \pm 1390$ ОД/мл
Кт 8. Відділення біомаси	Швидкість обертання, тривалість, температура	Датчик швидкості обертання, годинник, датчик температури	Під час процесу	$W = 30000\text{ об/хв}$, $t = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ $\tau = 15\text{ хв}$
Кт 9.1 Ультрафільтрація	Розмір пор	Характеристика пор	Перед початком процесу	$D_{\text{пор}} = 100\text{ кДа}$ $D_{\text{пор}} = 30\text{ кДа}$
Кт 9.2. Осадження амоній сульфатом	Температура, концентрація, тривалість	Датчик температури, хімічний метод, годинник	Під час процесу	$t = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ $C = 40\%$ $\tau = 18\text{ год}$
Кт 9.3. Центрифугування	Швидкість обертання, тривалість, температура	Датчик швидкості обертання, годинник, датчик температури	Під час процесу	$W = 35000\text{ об/хв}$, $t = 0\text{ }^{\circ}\text{C}$ $\tau = 15\text{ хв}$
Кт 9.4. Гель-фільтрація	Швидкість потоку	Датчик	Під час процесу	$W = 0,5\text{ мл/хв}$

Закінчення табл. 7.1.

1	2	3	4	5
Кт 10. Сушіння	Температура, тривалість, кінцева вологість	Датчик температури, годинник, датчик вологості	Під час процесу	$t_{азоту} = 75 \pm 2 \text{ } ^\circ\text{C}$ $W = 7 \pm 0.5 \text{ м/с}$ $\tau = 15 \text{ хв}$ $t_{кінцева} = 43 \pm 2 \text{ } ^\circ\text{C}$ $\phi = 5\%$
Кт 12.1 Фасування	Концентрація амілази, цілісність флаконів, етикетки	Візуальний огляд, гель-хроматографія	Під час процесу	m=1500 Од, n=30 капсул, цілісність капсул та флаконів
Кт 12.2. Пакування, маркування	Цілісність флаконів, етикетки	Візуальний огляд	Під час процесу	Правильність нанесення етикетки, візуальний огляд та контроль
Кт 12.3. Пакування у групову тару	Кількість, цілісність	Візуальний огляд	Під час процесу	n=20 флаконів, цілісність групової тари

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Khristich AN, Mirkin SM. On the wrong DNA track: Molecular mechanisms of repeat-mediated genome instability. *J Biol Chem.* 2020;295(13):4134-4170. doi:10.1074/jbc.REV119.007678
2. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.statista.com/topics/2070/diseases/>
3. Варбанець Л. Д., Авдіюк К. В., Борзова Н. В. Мікробні α -амілази: виділення, властивості, практичне застосування // Біотехнологія. – 2008. – Т. 1, № 2. – С. 39-51. - <http://dspace.nbuiv.gov.ua/handle/123456789/3911>
4. Gupta R., Gigras P., Mohapatra H., Goswami V. K., Chauhan B. (2003). Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochem.* 38, 1599–1616. 10.1016/S0032-9592(03)00053-0
5. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://cysticfibrosisnewstoday.com/liprotamase-sollpura-nutritional-gi-cystic-fibrosis/>
6. Wang S, Jeyaseelan J, Liu Y, Qin W. Characterization and Optimization of Amylase Production in WangLB, a High Amylase-Producing Strain of *Bacillus*. *Appl Biochem Biotechnol.* 2016 Sep;180(1):136-51. doi: 10.1007/s12010-016-2089-5.
7. Jujjavarapu SE, Dhagat S. Evolutionary Trends in Industrial Production of α -amylase. *Recent Pat Biotechnol.* 2018;13(1):4-18. doi: 10.2174/2211550107666180816093436
8. Mehta D, Satyanarayana T. Bacterial and Archaeal α -Amylases: Diversity and Amelioration of the Desirable Characteristics for Industrial Applications. *Front Microbiol.* 2016 Jul 28;7:1129. doi: 10.3389/fmicb.2016.01129
9. [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://animalnutrition.dupont.com/fileadmin/user_upload/live/animal_nutrition/documents/open/Feed_enzyme-carbohydrase-protease_Axtra-XAP-TPT-Danisco-Animal_Nutrition.pdf
10. EFSA FEEDAP Panel (EFSA Panel on Additives and Products or Substances

- used in Animal Feed), Bampidis, V, Azimonti, G, Bastos, ML, Christensen, H, Dusemund, B, Kos Durjava, M, Kouba, M, López-Alonso, M, López Puente, S, Marcon, F, Mayo, B, Pechová, A, Petkova, M, Ramos, F, Sanz, Y, Villa, RE, Woutersen, R, Cocconcelli, PS, Dierick, NA, Glandorf, B, Herman, L, Maradona, MP, Martelli, G, Tosti, L, Saarela, M, Svensson, K, Galobart, J, Pettenati, E, Pizzo, F and Anguita, M, 2020. Scientific Opinion on the safety and efficacy of Axtra® XAP 104 TPT (endo-1,4-xylanase, protease and alpha-amylase) as a feed additive for chickens for fattening, laying hens and minor poultry species. EFSA Journal 2020;18(6)6165, 24 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6165>
11. Molobela IP, Cloete TE, Beukes M. Protease and amylase enzymes for biofilm removal and degradation of extracellular polymeric substances (EPS) produced by *Pseudomonas fluorescens* bacteria. African Journal of Microbiology Research. 2010; 4(14):1515–24.
 12. Elyasi Far B, Ahmadi Y, Yari Khosroshahi A, Dilmaghani A. Microbial Alpha-Amylase Production: Progress, Challenges and Perspectives. Adv Pharm Bull. 2020 Jul;10(3):350-358. doi: 10.34172/apb.2020.043.
 13. Sindhu R, Binod P, Madhavan A, Beevi US, Mathew AK, Abraham A, Pandey A, Kumar V. Molecular improvements in microbial α -amylases for enhanced stability and catalytic efficiency. Bioresour Technol. 2017 Dec;245(Pt B):1740-1748. doi: 10.1016/j.biortech.2017.04.098.
 14. Homaei A, Ghanbarzadeh M, Monsef F. Biochemical features and kinetic properties of α -amylases from marine organisms. Int J Biol Macromol. 2016 Feb;83:306-14. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.11.080.
 15. Lima RN, Porto AL. Recent Advances in Marine Enzymes for Biotechnological Processes. Adv Food Nutr Res. 2016;78:153-92. doi: 10.1016/bs.afnr.2016.06.005.
 16. Suriya J, Bharathiraja S, Krishnan M, Manivasagan P, Kim SK. Marine Microbial Amylases: Properties and Applications. Adv Food Nutr Res. 2016;79:161-177. doi: 10.1016/bs.afnr.2016.07.001

17. Craigen B, Dashiff A, Kadouri DE. The Use of Commercially Available Alpha-Amylase Compounds to Inhibit and Remove Staphylococcus aureus Biofilms. *Open Microbiol J.* 2011;5:21-31. doi:10.2174/1874285801105010021
18. Kalpana BJ, Aarthy S, Pandian SK. Antibiofilm activity of α -amylase from *Bacillus subtilis* S8-18 against biofilm forming human bacterial pathogens. *Appl Biochem Biotechnol.* 2012;167(6):1778-1794. doi:10.1007/s12010-011-9526-2
19. Vaikundamoorthy R, Rajendran R, Selvaraju A, Moorthy K, Perumal S. Development of thermostable amylase enzyme from *Bacillus cereus* for potential antibiofilm activity. *Bioorg Chem.* 2018 Apr;77:494-506. doi: 10.1016/j.bioorg.2018.02.014. Epub 2018 Feb 12. PMID: 29454827.
20. Fanaei Pirlar R, Emaneini M, Beigverdi R, Banar M, B van Leeuwen W, Jabalameli F. Combinatorial effects of antibiotics and enzymes against dual-species *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in the wound-like medium. *PLoS One.* 2020;15(6):e0235093. Published 2020 Jun 25. doi:10.1371/journal.pone.0235093
21. Elamary R, Salem WM. Optimizing and purifying extracellular amylase from soil bacteria to inhibit clinical biofilm-forming bacteria. *PeerJ.* 2020 Nov 2;8:e10288. doi: 10.7717/peerj.10288. PMID: 33194439; PMCID: PMC7643558.
22. Ben El Hadj Ali, Imen & Ali, Elhadj & Tajini, Fatma & Boulila, Abdennacer & Jebri, Mohamed-Amine & Boussaid, Mohamed & Messaoud, Chokri & Sebai, Hichem. (2020). Bioactive compounds from Tunisian *Pelargonium graveolens* (L'Hér.) essential oils and extracts: α -amylase and acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant, antibacterial and phytotoxic activities. *Industrial Crops and Products.* 158. 10.1016/j.indcrop.2020.112951.
23. Nwokoro O, Anthonia O. Studies on the production of alkaline α -amylase from *Bacillus subtilis* CB-18. *Acta Sci Pol Technol Aliment.* 2015 Jan-

- Mar;14(1):71-75. doi: 10.17306/J.AFS.2015.1.8.
24. Ogbonnaya N, Odiase A. Influence of media composition on the production of alkaline α -amylase from *Bacillus subtilis* CB-18. *Acta Sci Pol Technol Aliment.* 2012 Jul-Sep;11(3):231-8.
 25. Arabacı N, Arıkan B. Isolation and characterization of a cold-active, alkaline, detergent stable α -amylase from a novel bacterium *Bacillus subtilis* N8. *Prep Biochem Biotechnol.* 2018 May 28;48(5):419-426. doi: 10.1080/10826068.2018.1452256.
 26. Ojha SK, Singh PK, Mishra S, Pattnaik R, Dixit S, Verma SK. Response surface methodology based optimization and scale-up production of amylase from a novel bacterial strain, *Bacillus aryabhatai* KIIT BE-1. *Biotechnol Rep (Amst).* 2020 Jul 15;27:e00506. doi: 10.1016/j.btre.2020.e00506.
 27. Kalpana BJ, Sindhulakshmi M, Pandian SK. Amylase enzyme from *Bacillus subtilis* S8-18: a potential desizing agent from the marine environment. *Biotechnol Appl Biochem.* 2014 Mar-Apr;61(2):134-44. doi: 10.1002/bab.1122.
 28. Kalpana BJ, Pandian SK. Halotolerant, acid-alkali stable, chelator resistant and raw starch digesting α -amylase from a marine bacterium *Bacillus subtilis* S8-18. *J Basic Microbiol.* 2014 Aug;54(8):802-11. doi: 10.1002/jobm.201200732.
 29. Salman T, Kamal M, Ahmed M, Siddiqa SM, Khan RA, Hassan A. Medium optimization for the production of amylase by *Bacillus subtilis* RM16 in Shake-flask fermentation. *Pak J Pharm Sci.* 2016 Mar;29(2):439-44.
 30. Wang S, Jeyaseelan J, Liu Y, Qin W. Characterization and Optimization of Amylase Production in WangLB, a High Amylase-Producing Strain of *Bacillus*. *Appl Biochem Biotechnol.* 2016 Sep;180(1):136-51. doi: 10.1007/s12010-016-2089-5.
 31. Duan X, Shen Z, Zhang X, Wang Y, Huang Y. Production of recombinant beta-amylase of *Bacillus aryabhatai*. *Prep Biochem Biotechnol.* 2019;49(1):88-94. doi: 10.1080/10826068.2018.1536987.

32. Sethi BK, Jana A, Nanda PK, DasMohapatra PK, Sahoo SL, Patra JK. Production of α -Amylase by *Aspergillus terreus* NCFT 4269.10 Using Pearl Millet and Its Structural Characterization. *Front Plant Sci.* 2016 May 18;7:639. doi: 10.3389/fpls.2016.00639.
33. Shahryari Z, Fazaelpoor MH, Ghasemi Y, Lennartsson PR, Taherzadeh MJ. Amylase and Xylanase from Edible Fungus *Neurospora intermedia*: Production and Characterization. *Molecules.* 2019 Feb 17;24(4):721. doi: 10.3390/molecules24040721.
34. Febriani, Rayyana, Ulya M, Oesman F, Akhmaloka, Iqbalsyah TM. Low molecular weight alkaline thermostable α -amylase from *Geobacillus* sp. nov. *Heliyon.* 2019;5(7):e02171. Published 2019 Jul 29. doi:10.1016/j.heliyon.2019.e02171
35. Burhanoglu T, Sürmeli Y, Şanlı-Mohamed G. Identification and characterization of novel thermostable α -amylase from *Geobacillus* sp. GS33. *Int J Biol Macromol.* 2020 Jul 18;164:578-585. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.07.171.
36. Fang W, Xue S, Deng P, Zhang X, Wang X, Xiao Y, Fang Z. AmyZ1: a novel α -amylase from marine bacterium *Pontibacillus* sp. ZY with high activity toward raw starches. *Biotechnol Biofuels.* 2019 Apr 23;12:95. doi: 10.1186/s13068-019-1432-9.
37. Hasan MM, Marzan LW, Hosna A, Hakim A, Azad AK. Optimization of some fermentation conditions for the production of extracellular amylases by using *Chryseobacterium* and *Bacillus* isolates from organic kitchen wastes. *J Genet Eng Biotechnol.* 2017 Jun;15(1):59-68. doi: 10.1016/j.jgeb.2017.02.009.
38. Шкутина Ирина Викторовна, Мироненко Наталья Владимировна, and Селеменев Владимир Федорович. "ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА ИММОБИЛИЗОВАННОЙ α -АМИЛАЗЫ" *Медицина: теория и практика*, vol. 4, no. 5, 2019, pp. 625-626.
39. Almulaiky YQ, Aqlan FM, Aldhahri M, Baeshen M, Khan TJ, Khan KA, Afifi

- M, Al-Farga A, Warsi MK, Alkhaled M, Alayafi AAM. α -Amylase immobilization on amidoximated acrylic microfibres activated by cyanuric chloride. *R Soc Open Sci.* 2018 Nov 28;5(11):172164. doi: 10.1098/rsos.172164.
40. Al-Najada AR, Almulaiky YQ, Aldhahri M, El-Shishtawy RM, Mohamed SA, Baeshen M, Al-Farga A, Abdulaal WH, Al-Harbi SA. Immobilisation of α -amylase on activated amidrazone acrylic fabric: a new approach for the enhancement of enzyme stability and reusability. *Sci Rep.* 2019 Sep 3;9(1):12672. doi: 10.1038/s41598-019-49206-w.
41. Acer Ö, Bekler FM, Pirinçcioğlu H, Güven RG, Güven K. Purification and Characterization of Thermostable and Detergent-Stable α -Amylase from *Anoxybacillus* sp. AH1. *Food Technol Biotechnol.* 2016 Mar;54(1):70-77. doi: 10.17133/ftb.54.01.16.4122.
42. Kumar GS, Rather GM, Gurramkonda C, Reddy BR. Thermostable α -amylase immobilization: Enhanced stability and performance for starch biocatalysis. *Biotechnol Appl Biochem.* 2016 Jan-Feb;63(1):57-66. doi: 10.1002/bab.1350.
43. Yang G, Yao H, Mozzicafreddo M, Ballarini P, Pucciarelli S, Miceli C. Rational Engineering of a Cold-Adapted α -Amylase from the Antarctic Ciliate *Euplotes focardii* for Simultaneous Improvement of Thermostability and Catalytic Activity. *Appl Environ Microbiol.* 2017 Jun 16;83(13):e00449-17. doi: 10.1128/AEM.00449-17.
44. Aleem B, Rashid MH, Zeb N, Saqib A, Ihsan A, Iqbal M, Ali H. Random mutagenesis of super Koji (*Aspergillus oryzae*): improvement in production and thermal stability of α -amylases for maltose syrup production. *BMC Microbiol.* 2018 Nov 28;18(1):200. doi: 10.1186/s12866-018-1345-y.
45. He L, Mao Y, Zhang L, Wang H, Alias SA, Gao B, Wei D. Functional expression of a novel α -amylase from Antarctic psychrotolerant fungus for baking industry and its magnetic immobilization. *BMC Biotechnol.* 2017 Feb 28;17(1):22. doi: 10.1186/s12896-017-0343-8.

46. Недашківська, В., Дронова, М., & Вринчану, Н. (2016). БІОПЛІВКИ ТА ЇХ РОЛЬ В ІНФЕКЦІЙНИХ ЗАХВОРЮВАННЯХ. *Український науково-медичний молодіжний журнал*, (4(98)), 10-19. вилучено із <http://mmj.nmuofficial.com/index.php/journal/article/view/85>
47. Варбанець Л. Д., Авдіюк К. В., Борзова Н. В. Мікробні α -амілази: виділення, властивості, практичне застосування // *Біотехнологія*. – 2008. – Т. 1, № 2. – С. 39-51. <http://dspace.nbuv.gov.ua/handle/123456789/3911>
48. Борзова Н. В., Гудзенко О. В., Варбанець Л. Д. Глюкоамілаза мікроорганізмів. біосинтез, властивості, механізм дії та практичне застосування // *Biotechnologia Acta*. – 2009. – Vol. 2, No 1. – С. 9-23. http://biotechnology.kiev.ua/index.php?option=com_content&view=article&id=102%3A2011-11-10-19-48-39&catid=22%3A2009no1&Itemid=24&lang=uk
49. Авдіюк К. В., Варбанець Л. Д. Мікробні α -амілази: фізико-хімічні властивості, субстратна специфічність та доменна організація // *Укр. біохім. журн.* – 2013. – 85, № 4. – С. 5–19. <http://ua.ukrbiochemjournal.org/2016/04/mikrobnii-%CE%B1-amilazy-fizyko-himichni-vlastyvosti-substratna-spetsyfichnist-ta-domenna-struktura.html>
- Кубрак О.І., Луцзяк В.І. Одержання і властивості α -амілази з *Bacillus* sp. VKL40 // *Біотехнологія*. – 2009. – Т. 2, № 1. – С. 69-79. http://biotechnology.kiev.ua/index.php?option=com_content&view=article&id=109%3A-bacillus-sp-bkl40-&catid=22%3A2009no1&Itemid=24&lang=uk
50. Коновалова В. В., Гузикевич К. Є., Побігай Г. А., Бурбан А. Ф., Олійнічук С. Т. Імобілізація α -амілази на целюлозних мембранах, модифікованих хітозаном та Cibacron Blue F3G-A // *Biotechnologia Acta*. – 2009. – Vol. 2, No 1. – С. 117-123. http://biotechnology.kiev.ua/index.php?option=com_content&view=article&id=91%3A-ibacron-blue-f3g-a-

- &catid=22%3A2009no1&Itemid=24&lang=uk
51. Борзова Н. В., Гудзенко О. В., Варбанець Л. Д. Грибні амілолітичні ензими та їх дія на нерозчинні субстрати // *Biotechnologia Acta*. – 2010. – Vol. 3, No 6. – С. 36-41.
http://biotechnology.kiev.ua/index.php?option=com_content&view=article&id=215%3A2011-12-10-11-16-42&catid=30%3A2010no6&Itemid=34&lang=uk
52. Авдіюк К. В., Варбанець Л. Д., Сафронова Л. А., Харкевич Е. С. Очищення α -амілаз *Aspergillus flavus* var. *oryzae* і *Bacillus subtilis* та їхні властивості // *Biotechnologia Acta*. – 2012. – Vol. 5, No 5. – С. 91-99.
http://biotechnology.kiev.ua/index.php?option=com_content&view=article&id=371%3A-aspergillus-flavus-var-oryzae-bacillus-subtilis-&catid=77%3A2012-5&Itemid=96&lang=uk
53. Авдіюк К. В., Варбанець Л. Д. α -Амілази *Aspergillus flavus* var. *oryzae* і *Bacillus subtilis*: субстратна специфічність та стійкість до низки хімічно активних речовин // *Biotechnologia Acta*. – 2013. – Vol. 6, No 3. – С. 36-45.
http://biotechnology.kiev.ua/index.php?option=com_content&view=article&id=434%3A-aspergillus-flavus-var-oryzae-bacillus-subtilis-c-&catid=84%3A2013--3&Itemid=107&lang=uk
54. Варбанець Л. Д., Мацелюх О. В., Нідялкова Н. А., Авдіюк К. В., Гудзенко О. В., Сейфулліна І. Й., Масановець Г. М., Хитрич М. В. Координаційні сполуки кобальту (II, III) з похідними дитіокарбамової кислоти - модифікатори активності ензимів гідролітичної дії // *Biotechnologia Acta*. – 2013. – Vol. 6, No 1. – С. 73-80.
http://biotechnology.kiev.ua/index.php?option=com_content&view=article&id=400%3Athe-coordination-compounds-of-cobalt-ii-iii-with-dithiocarbamic-acid-derivatives-modifiers-of-hydrolytic-enzymes-activity-l-d-varbanets-v-matselyukh-n-nidyalkova-v-vdiyuk-v-gudzenko-i-i-seifullina-g-n-snvets-n-v&catid=81%3A2013-1&Itemid=105&lang=uk

55. Авдіюк К. В., Варбанець Л. Д., Філіппова Т. О., Жиліна З. І., Ішков Ю. В., Карпенко О. В., Шульга О. М. Вплив синтетичних похідних порфіринів і флуорену та поверхнево-активних речовин на активність і біосинтез α -амілази *Bacillus subtilis* 147 // Мікробіологічний журнал. – 2015. – Т. 77, № 1. – С. 26-32. <http://microbiolj.org.ua/ua/archiv/2015-tom-77/1-jan-feb-tom-77/2015-77-1-05>
56. Авдіюк К.В., Варбанець Л.Д. Вплив іонів металів та специфічних хімічних реагентів на активність α -амілаз *Aspergillus flavus* var. *oryzae* і *Bacillus subtilis* // Мікробіологічний журнал. – 2015. – Т. 77, № 4. – С. 15-24. <http://microbiolj.org.ua/ua/archiv/2015-tom-77/4-jul-aug-tom-77/2015-77-4-03>
57. Авдіюк К. В., Варбанець Л. Д., Іваниця В. О. Оптимізація умов культивування *Achromobacter* sp. 7a – продуцента α -амілази // Мікробіологія і біотехнологія. – 2015. – № 1. – С. 21-35. <http://mbt.onu.edu.ua/article/view/48014>
58. Авдіюк К.В., Варбанець Л.Д., Зелена П.П., Шепелевич В.В. Фізико-хімічні властивості α -амілази *Achromobacter* sp. 7a // Мікробіологічний журнал. – 2016. – Т. 78, № 1. – С. 23-32. <http://microbiolj.org.ua/ua/archiv/2016-tom-78/1-jan-feb-tom-78/2016-78-1-03>
59. Авдіюк К.В., Варбанець Л.Д. Вплив іонів металів та хімічних реагентів на активність α -амілази *Achromobacter* sp. 7a // Мікробіологічний журнал. – 2016. – Т. 78, № 2. – С. 21-32. <http://microbiolj.org.ua/ua/archiv/2016-tom-78/2-mar-apr-tom-78/2016-78-2-03>
60. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://moz.gov.ua/article/news/scho-take-orfanni-hvorobi-i-jak-zminjuetsja-dostup-do-likuvannja>
61. M.W. Konstan, J.S. Wagener, M. Wilschanski, I. Laki, S.R. Boas, D.Sands, M.Gangal, R.S. Martin, W.Shanahan and J.Pennington. A comparison of

- liprotamase, a non-porcine pancreatic enzyme replacement therapy, to porcine extracted pancrelipase in a noninferiority randomized clinical trial in patients with cystic fibrosis // Clin. Invest. (Lond.) (2018) 8(4), 147–154
62. Муковісцидоз у дітей. Своєчасна діагностика як важливий предиктор ефективності лікування (клінічний випадок) / В. С. Березенко, Ю. П. Резніков, В. В. Крат // Перинатология и педиатрия. - 2017. - № 3. - С. 74-80.
63. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://pancreaze.com/what-is-pancreaze/>
64. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://pillintrip.com/ru/medicine/cr-on>
65. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://pillintrip.com/ru/medicine/triferment>
66. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://nv.ua/ukr/ukraine/events/mukoviscidoz-ta-inshi-orfanni-zahvoryuvannya-tri-istoriji-hvorih-v-ukrajini-genetika-diaagnostika-likuvannya-50070788.html>
67. Pierzynowska K, Valverde-Piedra J, Szymanczyk S, Prykhod'ko O, Pieszka M, Kardas M, Grochowska-Niedworok E, Grabowski T, Winiarczyk M, Pierzynowski S. Pancreatic-like enzymes of microbial origin restore growth and normalize lipid absorption in a pig model with exocrine pancreatic insufficiency. Arch Med Sci. 2018 Mar;14(2):407-414. doi: 10.5114/aoms.2018.73471
68. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://pepi.com.ua/zdorov-ia/411-tablytsia-normy-zrostu-i-vahy-dytyny.html>
69. Т.М. Камінська Ретроспективні дослідження показників фізичного розвитку школярів // Неонатология, хірургія та перинатальна медицина Т. V, № 2(16), 2015, УДК: 613.95 -053.5:616-058-079.7
70. Пирог Т.П., Ігнатова О.А. Загальна біотехнологія: Підручник. – К.: НУХТ, 2009. – 336 с

71. Сидоров Ю.І., Влязло Р.Й., Новіков В.П. Процеси і апарати мікробіологічної та фармацевтичної промисловості. Технологічні розрахунки. Приклади і задачі. Основи проектування. Львів: «Інтелект-Захід», 2008. – 736 с
72. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://bionet.com/technology/f3-bioreactor/>
73. Наказ МОЗ України «Про затвердження методичних рекомендацій щодо виконання санітарно-гігієнічних вимог та проведення мікробіологічного контролю у виробництві нестерильних лікарських засобів» від 14.12.2001 №502
74. Авдіюк К. В., Варбанець Л. Д. Мікробні α -амілази: фізико-хімічні властивості, субстратна специфічність та доменна структура // Укр. біохім. журн. – 2013. – Т. 85, № 4. – С. 5-19.
75. Біотехнології в екології. Методичні рекомендації до самостійної роботи студентів спеціальності 7(8).04010601 Екологія та охорона навколишнього середовища [Текст] / А.І. Горова, С.М. Лисицька, А.В. Павличенко та ін. – Д.: Національний гірничий університет, 2012. – 23 с.
76. Методичні вказівки до практичних занять з дисципліни «Основи проектування» для здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»/ Укладач: Гуляєв В.М. - Кам'янське: ДДТУ, 2019 р. – 71 с.
77. Bano S, Ul Qader SA, Aman A, Syed MN, Azhar A. Purification and characterization of novel α -amylase from *Bacillus subtilis* KIBGE HAS. AAPS PharmSciTech. 2011 Mar;12(1):255-61. doi: 10.1208/s12249-011-9586-1.
78. Wu X, Wang Y, Tong B, Chen X, Chen J. Purification and biochemical characterization of a thermostable and acid-stable alpha-amylase from *Bacillus licheniformis* B4-423. Int J Biol Macromol. 2018 Apr 1;109:329-337. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.12.004

- 79.Trabelsi S, Ben Mabrouk S, Kriaa M, Ameri R, Sahnoun M, Mezghani M, Bejar S. The optimized production, purification, characterization, and application in the bread making industry of three acid-stable alpha-amylases isoforms from a new isolated *Bacillus subtilis* strain US586. *J Food Biochem.* 2019 May;43(5):e12826. doi: 10.1111/jfbc.12826
- 80.Данилов І.П., Самойленко С.І. Апарати мікробіологічної промисловості: Навч. посібник – Харків: НТУ «ХП», 2008. – 272 с.
- 81.Arunkumar A., Etzel M.R. Negatively charged tangential flow ultrafiltration membranes for whey protein concentration. *Journal of Membrane Science*, 2015, vol. 475, pp. 340–348. DOI: 10.1016/j.memsci.2014.10.049
- 82.Н.С. Орлов. Ультра- и микрофльтрация: учебное пособие. – М. РХТУ им. Менделеева, 2014. – 117с
- 83.Мінаєва В. О. Хроматографічний аналіз: Підручник для студентів вищих навчальних закладів. – Черкаси: Вид. від. ЧНУ імені Богдана Хмельницького, 2013. – 284 с
- 84.Конспект лекцій з дисципліни «Технологія антибіотиків та лікарських препаратів» освітньо-професійної програми першого (бакалаврського) рівня вищої освіти зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» усіх форм навчання / Укладач: Головей О.П. – Кам'янське: ДДТУ, 2017. – 121 с.
- 85.[Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.add.ua/medicamenti/preparaty-dlja-podzheludochnoj-zhelezy/fermenty/>
- 86.[Електронний ресурс] Режим доступу: <https://zakon.rada.gov.ua/rada/show/v0235282-02#Text>
- 87.[Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/2076/likarska-forma>
- 88.[Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://studfile.net/preview/5194479/page:11/>

89. Навчальний посібник для студентів вищих навчальних закладів III-IV рівня акредитації «Фармацевтична хімія. Аналіз препаратів біотехнологічного виробництва» / За загальною редакцією професора В.А. Георгіянци. – Харків: 2013. – 215 с.
90. [Електронний ресурс]. Режим доступу:
<https://ukranalitika.com.ua/goods/analizatory-vlazhnosti-vlagomery-laboratornye/analizator-vlazhnosti-laboratornyy-ma-50-r-radwag-polsha/>