

**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**
(прізвище та ініціали)

« ____ » _____ лютого _____ 2022 р.

«До захисту допущено»

Завідувач кафедри

(підпис) **Віктор СТАБНИКОВ**
(прізвище та ініціали)

« ____ » _____ 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: Біосинтез мікробних екзополісахаридів для використання у медицині _____

Виконав: здобувач _____ **ІІ** _____ курсу, групи _____ **02** _____

(прізвище, ім'я, по батькові повністю) **ЛИСЕНКО Людмила Вікторівна**
(підпис)

Керівник _____ **РЕЗНИЧЕНКО Юрій Миколайович** _____
(прізвище, ім'я та по батькові повністю) (підпис)

Консультанти _____
(прізвище та ініціали) (підпис)

(прізвище та ініціали) (підпис)

(прізвище та ініціали) (підпис)

Рецензент _____ **Алла КІЗЬ** _____
(прізвище та ініціали) (підпис)

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

Здобувач _____
(підпис)

Київ – 2022 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь магістр

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

Освітньо-професійна програма: «Фармацевтична біотехнологія»
(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри
біотехнології і мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ

«03» листопада 2021 року

ЗАВДАННЯ

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

ЛИСЕНКО Людмили Вікторівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Біосинтез мікробних екзополісахаридів для використання у медицині

Керівник роботи РЕЗНИЧЕНКО Юрій Миколайович, к.т.н., доц.

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

затверджені наказом вищого навчального закладу від «02» листопада 2021 року № 865-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 1 лютого 2021 року

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Pseudomonas mendocina* ССТ, цільовий продукт: альгінат

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

РОЗДІЛ 1. Характеристика мікробних екзополісахаридів.

РОЗДІЛ 2. Біосинтетична активність продуцентів ЕПС.

РОЗДІЛ 3. Особливості технології виробництва ЕПС.

РОЗДІЛ 4. Техніко-економічне обґрунтування випуску субстанції для лікарського засобу та виробництва готової форми ЛЗ.

РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми біосинтезу субстанції та технологічної схеми виробництва ЛЗ.

РОЗДІЛ 6. Опис технологічного процесу виробничого біосинтезу.

РОЗДІЛ 7. Опис технологічного процесу виробництва ЛЗ.

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема виробництва альгінату та ЛЗ – 2 аркуша формату А1.

Апаратурна схема виробництва альгінату та ЛЗ – 3 аркуша 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

№ з/п	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1.	Характеристика мікробних екзополісахаридів	02.11.2021-05.11.2021	
2.	Біосинтетична активність продуцентів ЕПС	06.11.2021-15.11.2021	
3.	Особливості технології виробництва ЕПС	16.11.2021-19.11.2021	
4.	Техніко-економічне обґрунтування випуску субстанції для лікарського засобу та виробництва готової форми ЛЗ	20.11.2021-22.11.2021	
5.	Обґрунтування вибору технологічної схеми біосинтезу субстанції та технологічної схеми виробництва ЛЗ	23.11.2021-28.11.2021	
6.	Опис технологічного процесу виробничого біосинтезу	29.11.2021-02.12.2021	
7.	Опис технологічного процесу виробництва ЛЗ	03.12.2021-10.12.2021	
8.	Оформлення пояснювальної записки	11.12.2021-20.12.2021	
9.	Виконання графічної частини проекту	21.12.2021-26.12.2021	

Здобувач

(підпис)

Керівник роботи

(підпис)

Людмила ЛИСЕНКО

(прізвище та ініціали)

Юрій РЕЗНІЧЕНКО

(прізвище та ініціали)

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	5
ВСТУП	6

ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА МІКРОБНИХ ЕКЗОПОЛІСАХАРИДІВ	8
1.1. Роль та сфери застосування ЕПС.....	8
1.2. Перспектива та потреба у ЕПС.....	16
РОЗДІЛ 2. БІОСИНТЕТИЧНА АКТИВНІСТЬ ПРОДУЦЕНТІВ ЕПС	17
2.1. Леван.....	17
2.2. Декстран.....	19
2.3. Пуллулан.....	20
2.4. Геллан.....	21
2.5. Галоглікан.....	22
2.6. Ксилофан і анцилан.....	23
РОЗДІЛ 3. ОСОБЛИВОСТІ ТЕХНОЛОГІЇ ВИРОБНИЦТВА ЕПС	28

ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

РОЗДІЛ 4. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ВИПУСКУ СУБСТАНЦІЇ ДЛЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ТА ВИРОБНИЦТВА ГОТОВОЇ ФОРМИ ЛЗ	37
4.1. Передумови виробництва ЛЗ.....	37
4.1.1. Аналіз фармакологічних властивостей цільового ЛЗ, галузей використання.....	37
4.1.2. Обсяг ринку та очікувані темпи його розвитку.....	40
4.1.3. Вибір форми випуску лікарського засобу.....	41
4.1.4. Опис лікарського засобу згідно АНД.....	43
4.1.5. Розрахунок річної потужності та кількості серій на рік.....	58
4.2. Розрахунок потреби у субстанції для випуску ЛЗ.....	59
4.2.1. Перелік виробників кінцевого продукту і виробників субстанції.....	59
4.2.2. Розрахунок річної потужності виробництва субстанції, об'єму ферментера та кількості виробничих циклів.....	60

РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ СУБСТАНЦІЇ ТА ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА ЛЗ.....	65
5.1. Обґрунтування вибору біологічного агенту, поживного середовища для його культивування.....	65
5.2. Обґрунтування вибору способу культивування і типу ферментера.....	70
5.3. Обґрунтування стадій виділення і очищення субстанції для виробництва ЛЗ.....	73
5.4. Обґрунтування вибору класів чистоти виробничих приміщень виробництва ЛЗ, вибору первинної упаковки ЛЗ.....	79
РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ.....	88
6.1. Специфікація обладнання ділянки виробничого біосинтезу.....	88
6.2. Опис технологічної схеми виробничого біосинтезу.....	91
6.3. Контроль ділянки біосинтезу.....	101
РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ ВИРОБНИЦТВА ЛЗ.....	113
7.1. Специфікація обладнання ділянки виробництва ЛЗ.....	113
7.2. Опис технологічного процесу виробництва ЛЗ.....	117
7.2.1. Опис допоміжних робіт.....	117
7.2.2. Опис основних стадій процесу виробництва ЛЗ.....	121
7.3. Контроль ділянки виробництва ЛЗ.....	123
ВИСНОВКИ.....	128
ЛІТЕРАТУРА.....	129
ДОДАТКИ	

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена розробці виробництва препарату Гавіскон для лікування гастроєзофагеальної рефлюксної хвороби. До технології введено біотехнологічну частину одержання основної діючої речовини, а саме екзополісахариду альгінату. Дану речовину одержують шляхом культивування *Pseudomonas mendocina* ССТ, який за 22 години утворює 8,2 г/л полісахариду. З метою використання даної речовини у складі препарату Гавіскон розрахована річна потужність виробництва, яка становить 7250,25 кг альгінату за рік.

Виробництво альгінату передбачає ряд допоміжних робіт, які включають в себе підготовку аераційного повітря, приготування та стерилізацію поживних середовищ. До технологічного процесу виробництва відносяться підготовка посівного матеріалу, виробництво культивування та стадії виділення. Технологію виробництва альгінату продемонстровано в технологічній та апаратурній схемах даної роботи.

Кваліфікаційна робота включає в себе 149 сторінок друкованого тексту, включаючи 18 таблиць та 10 малюнків, складається з вступу, семи розділів, списку використаної літератури (177 найменувань) та графічної частини (листа формату А1 та 1 лист формату А3).

Ключові слова: альгінат, ГЕРХ, Гавіскон, фармацевтика, екзополісахариди, аеробне культивування, *Pseudomonas mendocina* ССТ.

ВСТУП

Гастроєзофагеальна рефлюксна хвороба, або ГЕРХ — стан, при якому занедбаність вмісту шлунку в стравохід (гастроєзофагеальний рефлюкс) турбує пацієнта, порушуючи якість його життя. Наразі, це захворювання зустрічається у 18-46% дорослих людей [1].

Сам по собі рефлюкс не патологія, навіть у здорових людей він може траплятися до 20 разів на добу. ГЕРХ діагностують, коли рефлюкс відбувається настільки часто і вміст шлунку затримується в стравоході настільки довго, щоб спровокувати характерні симптоми захворювання: печію, біль за грудиною, відрижку кислим [1].

Із-за постійного впливу шлункового соку слизова оболонка запалюється — починається рефлюкс-езофагіт. З часом можуть з'явитися ерозії і виразки, які, заживаючи, викликають стриктури, або рубцеві звуження стравоходу [1].

Ще одне небезпечне ускладнення ГЕРХ — стравохід Баррета. Це стан, при якому клітини слизової оболонки стравоходу (розраховані на протидію лужному середовищу слини) заміщуються клітинами, схожими зі слизовою оболонкою шлунка (розрахованими на взаємодію з кислим середовищем). Стравохід Баррета — передраковий стан, так як змінені клітини з часом трансформуються в злоякісні [1].

У структурі захворювань стравоходу ГЕРХ посідає провідне місце. Близько 20 — 40 % населення страждає на печію — основний клінічний симптом цього захворювання. При цьому захворюваність на ГЕРХ продовжує неухильно зростати, зокрема, частота виявлення ерозивної форми ГЕРХ зросла з 3,1 до 16 % [2].

Поширеність ГЕРХ неоднакова в різних регіонах світу. Доведено, що печія однаково часто має місце у чоловіків і жінок, а також у різних вікових групах.

					НУХТ БТЕК 02.02.07 КР ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата					
Розроб.		Лисенко Л.В.			ВСТУП				
Перевір.		Резніченко Ю.М.							
Реценз.									
Н. Контр.									
Затверд.		Стабніков В.П.							
					Лім.	Арк.	Аркушів		
						6	149		
					Кафедра БТМ				

Поширеність печії та ерозивного езофагіту максимальна в США і країнах Західної Європи (близько 20 % населення) і мінімальна в Китаї (2,5 %). Причому печію щодня відчують 10 % населення, щотижня – 30 %, щомісячно – 50 %, проте тільки 2 % пацієнтів лікуються з приводу ГЕРХ. Рефлюкс-езофагіт виявляється у 6 - 12 % осіб, яким проводиться ендоскопічне дослідження. В Японії, де широко застосовуються скринінгові обстеження населення, тільки ендоскопічно позитивна ГЕРХ виявляється в 16,5 % випадків. Частота виникнення важкого езофагіту в загальній популяції складає 5 випадків на 100 000 населення за рік. Поширеність стравоходу Барретта серед осіб з езофагітом наближається до 8 - 10 %, при цьому ризик подальшого розвитку аденокарциноми підвищується в десятки разів: до 800 випадків на 100 тис. населення на рік. Поширеність ГЕРХ у стаціонарних хворих складає 30 %. В 25 % випадків ГЕРХ проявляється тільки позастравохідними симптомами. Росія за частотою виявлення цих симптомів посідає проміжне положення (10 і 7,5 % відповідно). В Україні, за даними А.В. Острогляд, поширеність печії серед дорослого населення становить 30 % [2,3].

Впровадження новітніх діагностичних технологій зумовило потребу в оцінці інформативності методів діагностики ГЕРХ, особливо у хворих з неерозивною формою. Останніми роками велика увага сфокусована на проблемі неерозивної форми ГЕРХ. У терапевтичних дослідженнях за участі пацієнтів, які не зверталися по медичну допомогу, з'ясовано, що у більшості хворих з печією не діагностуються пошкодження стравоходу, у хворих з типовими симптомами ГЕРХ і нормальною структурою слизової оболонки стравоходу антирефлюксна терапія мала менш виражений позитивний вплив, ніж у пацієнтів з ерозивним езофагітом. Ці факти спонукають до переоцінки механізмів, які призводять до генерації симптомів ГЕРХ, особливо у хворих з нормальною структурою слизової оболонки стравоходу [2].

Тому, можна зробити висновок про актуальність розробки ефективних ліків проти даного захворювання, яке з кожним роком набуває все більшого поширення.

РОЗДІЛ 1

ХАРАКТЕРИСТИКА МІКРОБНИХ ЕКЗОПОЛІСАХАРИДІВ

1.1. Роль та сфери застосування ЕПС

Полісахариди – макромолекули, що належать до групи вуглеводів, які складають найбільш важливу і численну групу сполук, синтезованих бактеріями, грибами і водоростями. Зокрема функція мікробних полісахаридів різна в залежності від бактеріального виду, який їх виробляє, і умов навколишнього середовища, за яких може здійснюватися накопичення вуглецю, поверхнева адгезія, розвиток біоплівки і ліпополісахарид клітинної поверхні формування. Вони також можуть діяти як фактори вірулентності фітопатогенів і захищати від несприятливих умов навколишнього середовища, таких як висока солоність, посуха чи низькі температури [4].

Отримання полісахаридів з мікроорганізмів дає значні промислові переваги в порівнянні з екстракцією і подальшим очищенням полісахаридів рослин, так як сезонні зміни безпосередньо впливають на ріст рослин, що є основною перешкодою для виробництва полісахаридів з рослин. Перевагами на користь мікроорганізмів є здатність забезпечити бажані умови, в яких вони синтезуватимуть значну кількість полісахаридів за відносно короткий проміжок часу. Умови ферментації підбираються для отримання найвищого титру полісахаридів, що значно полегшує їх очистку [4]. Крім того, мікробні полісахариди зазвичай мають більш високомолекулярну масу, ніж полісахариди рослин, що істотно впливає на їх функціональні властивості [5].

Окрім того, біотехнологічне виробництво ЕПС має свої переваги над хімічним синтезом в значно менших енергетичних потребах та можливості використовувати в якості субстрату промислові та сільськогосподарські відходи, що забезпечує екологічність виробництва [6].

					НУХТ БТЕК 02.02.07 КР ПЗ						
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 1 ХАРАКТЕРИСТИКА МІКРОБНИХ ЕКЗОПОЛІСАХАРИДІВ			Лім.	Арк.	Аркушів	
Розроб.		Лисенко Л.В.									
Перевір.		Резніченко Ю.М.								8	149
Реценз.								Кафедра БТМ			
Н. Контр.											
Затверд.		Стабніков В.П.									

Проте деякі обмеження можуть бути пов'язані з собівартістю виробництва, що може ускладнювати процес [7].

Останні дослідження зосереджені на нетоксичному і «більш екологічному» виробництві ЕПС, що традиційно одержували з рослинних і тваринних ресурсів. Зокрема, в своєму дослідженні Anderson з колегами, зауважують перспективність використання мікробного біосинтезу, уникаючи видобутку з водоростей, коли мова заходить про альгінат, кислотного гідролізу хітину і хітозану з молюсків для одержання деяких амінополісахаридів, або очищення тваринних тканин для одержання гіалуронової кислоти [8].

Харчові добавки

Завдяки своїм винятковим фізико-хімічним властивостям мікробні полісахариди придбали значну увагу в харчовій промисловості в якості харчових інгредієнтів. Наприклад, псевдопластичні та реологічні властивості ксантану роблять його відмінним харчовим інгредієнтом для покращення сенсорних характеристик продуктів. Окрім того, оскільки він дуже стабільний в широкому діапазоні температур і рН, ксантан може успішно використовуватися в багатьох процесах виробництва харчових продуктів [9].

Геллан може використовуватися в якості гелеутворюючого агента в харчових продуктах або для плівкового покриття завдяки гелеутворюючій і плівкоутворюючій здатності [10,11].

Декстрини демонструють ідеальні гідроколоїдні характеристики, і вони зачасту вже є присутніми в їжі в якості емульгаторів або стабілізаторів.

Леван, ще один мікробний полісахарид з великим потенціалом в якості харчового інгредієнта. Він володіє не тільки антиоксидатними, емульгуючими, стабілізуючими і плівкоутворюючими властивостями, а і разом з його олігоформами (наприклад, фруктоолігосахаридами) виявляє помітну пребіотичну активність, що використовується в виробництві йогурту [12], як агент, покращуючий текстуру пластівців, хлібу, молока і соків [13,14], і як матеріал покриття для наночастинок-мікроелементів в харчових добавках [15,16]. У даного полісахариду є потенціал для використання в якості

промислового підсолоджувача жувальної гумки, добавка до рецептури, носій ароматизатора, агент для поверхневої обробки, стабілізатор, загущувач, осморегулятор, кріопротектор і емульгатор [4].

Мікробні полісахариди мають широке використання в молочній галузі. Причиною цього є їх здатність зв'язувати воду, що в подальшому допомагає забезпечити необхідну текстуру та смак молочних продуктів [17,18].

Декстран використовується в випічці для покращення вологоутримуючих властивостей і запобіганню кристалізації цукру [19].

Не зважаючи на широке різноманіття мікробних екзополісахаридів в США і країнах Європи, в усіх них дозволені до використання в якості харчових добавок лише два представники: ксантан і геллан [20].

Ксантан, на частку якого припадає 6 % ринку полісахаридів, використовується, головним чином, як загущувач в соусах, як кріопротектор в заморожених харчових продуктах, стабілізатор в соках і десертах [21].

Курдлан також використовується в харчових продуктах як харчова добавка для підвищення кремоподібності, стійкості та в'язкості їжі [22].

Пуллулан використовується в харчовій промисловості як стабілізатор в мікрокапсульованих харчових продуктах [23], як харчовий захисний пакувальний матеріал [24-26], як наповнювач з низькою в'язкістю в напоях, як пребіотичне дієтичне волокно, в якості зв'язуючого агенту і стабілізатору харчових паст, як захисна глазурь і як замітник холестерину і жирних кислот в стабілізації жирової емульсії [27].

Медичний та фармацевтичний напрям

У медичній та фармацевтичній галузях леван знаходить безліч застосувань завдяки його біорозкладаємості, біосумісності і плівково-формульовальній здатності.

Його в медичній промисловості застосовують як протипухлинний і антигіперліпідемічний засіб, радіопротектор, засіб для продовження доставки ліків і замітник плазми [28]. Може використовуватися в якості плазмового замітника (наприклад, леван з молекулярною вагою від 3000 до 100000 Да), як

пролонгатор наркотичної діяльності, радіопротектор, матеріал покриття для систем доставки ліків, або лікарський носій нанорозмірного діапазону для пептидів і білків (наприклад, леван, отриманий від *Halomoas smyrnensis* AAD6T) [29,30], біофлокулюючий засіб, барвник і ароматизатор у виробництві таблеток і капсул [28]. Багато досліджень показали, що леван має великий благотворний вплив на здоров'я людини і тварин. Зокрема, повідомляється про використання левану як протипухлинного засобу і проводяться дослідження впливу левана на імунологічну систему, придушення пухлин і посилення протипухлинної активності лейкоцитів, його здатності змінювати проникність пухлинних клітин [31,32]. Леван, що продукується *Z.mobilis* і *M.laevaniformans*, вважається протипухлинним імунним модулятором у людини, і демонструє імуно-модуляційні ефекти на макрофаги, В і Т-клітини [18]. Леван, синтезований *Z. Mobilis*, був вивчений проти Саркоми-180, і було доведено, що його протипухлинна активність залежить від його молекулярної ваги [33]. Крім того, деякі дослідження, в яких використовувалися *Aerobacter* sp. і *Microbacterium* sp. проти раку шлунку показали, що він проявляє вищу антипроліферативну активність проти ракових клітин шлунку людини [18]. Його роль в зниженні окисного стресу і вільних радикалів демонструє антиоксидантний потенціал левана (наприклад, в стані наявності високого рівня глюкози в бета-клітинах підшлункової залози) [34-37].

Крім того, леван має гіпохолестеринемічну активність (анти-гіперліпідемічний агент), запобігає гіперхолестеричному атеросклерозу (антидіабетичний агент), а також протизапальну активність. І, як згадувалося раніше, леван відомий своїм біфідогенним ефектом. Він може бути використаний в якості пребіотика людини або тварини, який може значно модулювати кишкову мікробіоту, стимулюючи зростання молочних кислотних бактерій, таких як біфідобактерії, і в той же час захищаючи товсту кишку від канцерогенів [18]. В інших дослідженнях вплив левану було продемонстровано в області захисту печінки і нирки, підшлункової залози і серцевих тканин, в результаті пошкодження, викликаного алоксаном, діабетичних щурів і

посилення ферментативного захисту [18, 37]. Крім того, відмінні властивості левана сприяють зниженню факторів ризику коронарної хвороби, профілактиці інфекцій і некрозу або загоєнню дерматологічних ран [18,38]. Крім того, він відіграє терапевтичну роль в карієсі зубів (наприклад, підшкірне пломбування) [38,39] і проявляє антитромбаційний фактор під час операції на серці пацієнтів, а також у лікуванні рестенозу після ангіопластики. Esawy з колегами згадували про можливу придатність левана як дешевого і природного продукту в протівірусній терапії (антивірусна активність левана була досліджена проти респіраторного вірусу HPA1, H5N1 і кишкового вірусу, аденовірусу типу 40 [40]. Леванові похідні, а саме його сульфати, фосфати і ацетати можуть використовуватися в лікуванні СНІДу або в якості інгібіторів поширення м'язів [41,42].

Отримані з легкодоступних, відновлюваних ресурсів, біосумісні та, мабуть, нетоксичні, мікробні ЕПС знайшли дуже велику область застосування, в рамках якої їх використання в медицині відіграє важливу роль [43].

Декстран, нейтральний полімер, який використовувався для збільшення обсягу плазми (плазмовий розширювач) для контролю ударної дії на рану [44]. Припускається застосування екзополісахаридів в доставці ліків, зокрема повідомляється про запобігання штучного крововиливу і тривалої доставки амоксициліну за використання полі-ε-капролактону з вмістом декстрану в формі наночастинок як носія антибіотику [45].

Гелан використовується в якості дезінтеграційного агента в таблетках з швидким вивільненням лікарських речовин, або у великих концентраціях входить до складу матричної системи доставки лікарських речовин, за рахунок його властивості до біодеградабельності та розбухання [46]. Геланова наногідрогенна система використовується для забезпечення цільової доставки погано розчинних у воді лікарських засобів, таких як Паклітаксел (протираковий препарат) і Преднізолон (протизапальний препарат) [44]. Кульки гелан-пектину, отримані за допомогою іонотропного гелеутворюючого гелю,

проявляють значну мукоадгезію поруч з підконтрольним вивільненням такого препарату, як Кетопрофен [47].

Тверді ліпідні наночастинки з покриттям гіалуронової кислоти проявляють стійку і цілеспрямовану доставку протиракового препарату Воринонат до клітинної лінії раку SCC7, клітинної лінії аденокарциноми грудей людини (MCF-7) і епітелію легенів людини (A549) [48].

Холестерин на пулулановому носії разом з холестерином на манановому носії доповнені білком, який кодується рецептором 2 (HER2), використовується як система доставки білків в імунотерапії раку. Також окрім гарних механічних властивостей пулуану, його високої здатності до гідратації, і біосумісності, він використовується як полімер для тканинної інженерії. Каркаси на його основі відіграють багатообіцяючу роль в заміні шкіри на основі клітин, тканинній інженерії клітин судин, та регенерації кісток [48,49].

Як альтернатива альгінату, виробленого із бурих морських водоростей, мікробний альгінат можна використовувати для пов'язок для ран, систем доставки ліків, та капсулюванні тканин для регеративної терапії [47].

Косметична галузь

У косметиці, гіанітід є морським похідним екзополісахариду, та проявляє ефективність в прискоренні синтезу гіалуронової кислоти в шкірі для зменшення носолобних складок. Наявність ОВС скорочується в міру старіння внаслідок зміни балансу між синтезом і деградацією ОВС, що призводить до зневоднення і втрати обсягу шкіри [44]. Пуллулан, ксантан і декстран мають застосування в косметичних продуктах. Пуллулан володіє стійкою властивістю в'язкості до нагрівання і зміни рН; таким чином, він використовується в лосьйонах, кремах і т.д. Ксантан володіє високою стабільністю, тому він використовується в зубній пасті, кремах і шампунях для збільшення їх довговічності, а також для покращення суспензії інгредієнтів [50]. Декстран використовується в зволожуючих засобах завдяки його загущуючим та емульгуючим властивостям [18]. Як рецептурна добавка в косметичних виробках (компонент змішування) леван надає чудовий вплив на проліферацію клітин,

подразнення шкіри і зволоження шкіри. Крім того, леванові похідні можуть бути присутні і у виробах по догляду за волоссям [28].

Інші напрями застосування

Леван також виявляється перспективним біополімером в інших промислових областях. Він може використовуватися в якості поверхневого оздоблювального агента [51], як "зелений" клей (наприклад, Montana Biotech Southeast Inc. виробляє два леванові клеї для внутрішнього і зовнішнього використання) [18], поверхнево-активна речовина для домашнього використання [52], або як закупорююча речовина (наприклад, для закупорення пор високопроникних ґрунтів). Інші спеціальні напрями використання левана - це технологія «*laserdirectwriting*» для отримання нових біоактивних поверхонь [53], і очищення біологічних матеріалів за допомогою ПЕГ/Левандвухфазної рідкої системи [18].

Агар широко використовується в якості гелеутворюючого агента в різних середовищах для покращення росту мікроорганізмів, в той час як деякі прісноводні штами, такі як *Gemmatimonas aurantiaca*, можуть рости і утворювати колонію на гелановому середовищі, а не на агаризованому. Біополімер, названий поліакриламідом (ЕРАА) є хорошою альтернативою для заміни агару в лабораторіях. Основна особливість ЕРАА полягає в тому, що він не впливає на зростання мікробів, морфологію колоній і біохімічні властивості штаму мікробів. ЕРАА підтримує захисні мікроареали проживання навколо мікроорганізмів у водному і холодному середовищах [44].

Життєво важливу роль в сільськогосподарській промисловості грають екзополісахариди з властивостями біосурфактантів – ці молекули допомагають в рухливості, сигналізації, тим самим сприяють взаємодії рослин за допомогою екзополісахариду. Є повідомлення, що біосурфактант синтезований штамом *Staphylococcus spp.* (Штам 1Е), виділений із забрудненого сировою нафтою ґрунту, інгубує *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Bacillus subtilis*, і *Staphylococcus aureus*. Гелланікурдлан широко використовуються в сільськогосподарській практиці в

якості ґрунтових кондиціонерів, що веде до підвищення водоутримуючої здатності оброблюваних земель [44].

Нафтова промисловість

У нафтовій промисловості, ксантан використовується для буріння, розриву і очищення трубопроводів. Мікробний інтенсивний нафтовидобуток - біотехнологічний метод, який використовується в нафтовій промисловості для управління структурою і функцією мікроорганізмів, що існують в нафтових пластах. У цьому методі природний мікроорганізм, як *Enterobacter cloacae*, використовується для виробництва нешкідливих побічних продуктів, таких як газ (CO_2 , CH_4 і H_2), кислоти (оцтові і пропіонова кислоти) і розчинники (ацетон, етанол, бутанон), які полегшують потік масла, знижуючи його в'язкість. Таким чином, зі свердловини, видобувається більш значний обсяг нафти [44].

У порівнянні з синтетичними полімерами, екзополісахариди (ЕПС) мікробного походження мають ряд істотних переваг, включаючи ті, які дозволяють використовувати їх в дуже жорстких умовах; в умовах, коли використання синтетичних полімерів неефективне. Таким чином, ЕПС стабільні при температурі в діапазоні 100-120 °С. І деякі зберігають свої властивості навіть в діапазоні 150 °С, що відповідає температурному діапазону нафтових родовищ. ЕПС стабільні в широкому діапазоні рН як у кислотному, так і у лужному. Перевагами мікробних полісахаридів в порівнянні з іншими реагентами є їх безпека як для людини, так і для навколишнього середовища.

Вітчизняний полісахарид багатофункціонального призначення – етаполан, має кілька переваг у порівнянні з іншими ЕПС для видобування нафти, включаючи найбільш відомий полісахарид ксантан: висока в'язкість води під час процесу, підвищення в'язкості при наявності одновалентних і двовалентних катіонів в системі Cu_2^{+} - гліцин і при низьких значеннях рН, значне підвищення в'язкості в зонах з низькою швидкістю зсуву, етаполан може стабілізувати емульсії води з маслом і іншими вуглеводнями через присутність ліпофільної частини в його молекулі [54].

1.2. Перспектива та потреба у ЕПС

Зростаюча потреба в екологічно безпечних продуктах в біомедичному і фармацевтичному секторах або в продуктах харчування і кормах (наприклад, в області аквакультури) відкрила новий комерційний ринок для біопродуктів, серед яких успішно з'явився леван. До сих пір наявна інформація про вплив левану, використовуваного в якості різних біоактивних агентів в здоров'я людини і тварин, не є повною. Необхідно широко використовувати його благотворні властивості в біомедичних секторах, особливо в області нанотехнологій (наприклад, розробка профілактичних препаратів або підготовка нових нанокомпозитів – біополімерних нанорозмірних лікарських засобів) або аквакультури (в якості стимулятора імунної системи) [54].

Незважаючи на ряд привабливих властивостей мікробних полісахаридів, існують деякі фактори, які перешкоджають їх промислому виробництву. В даний час вартість полісахаридів мікробного походження все ще висока, що пояснюється високою вартістю біосинтезу і розподілу продуктів. Тому дослідження вирішення цих проблем є одним із головних завдань ЕПС в галузі біотехнології [54].

Незважаючи на різні переваги, мікробні полісахариди як і раніше залишаються в тіні за своїми показниками, ніж аналоги рослин і водоростей на світовому ринку, в основному через їх дороге виробництво і процеси очищення. Значна частка виробничих витрат мікробного полісахариду залежить від складу самого середовища для ферментації. Майже всі мікробні полісахариди виробляються з бактерій або грибів, які використовують глюкозу або сахарозу як джерело вуглецю. Якщо мікробні полісахариди націлені на більш широку аудиторію, на світовому ринку біополімерів вони повинні використовувати дешеві альтернативні джерела вуглецю під час обробки. Для вирішення цього питання і ефективного виробництва мікробних полісахаридів була проведена велика робота з застосуванням відходів, таких як патока, сиропи, стічні води [4].

РОЗДІЛ 2

БІОСИНТЕТИЧНА АКТИВНІСТЬ ПРОДУЦЕНТІВ ЕПС

2.1. Леван

Леван синтезується як екзополісахарид в позаклітинному матриксі бактерій різних родів, таких як *Acetobacter*, *Aerobacter*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Gluconobacter*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Streptococcus* і *Zygomonas* sp. та деякими іншими [33]. Зокрема, відомими штамми для одержання левану є молочнокислі бактерії, такі як *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mutants*, *Leuconostoc mesenteroides* NRRLB-512F, *Lactobacillus sanfranciscensis* LTH 2590, *Lactobacillus reuteri* LB121, *Microbacterium laevaniformans* [18].

В дослідженнях останнього десятиріччя особливо помітно, що нині переважна кількість надсинтетиків левану представлена видами роду *Bacillus* [55].

Зокрема, в дослідженні Feng повідомляється про трансформований штам *Bacillus amyloliquefaciens* NK-ΔLP, що утворений шляхом видалення кластеру генів, що кодуєть синтез синтез γ -поліглутамінову кислоту, за рахунок чого спостерігається надсинтез левану. Вихідним для вирізання кластеру використовувався штам *B. amyloliquefaciens* NK-1. Окрім того, оптимізували склад поживного середовища та умови культивування, вдалося прибрати інші лімітуючі фактори. Концентрація левану в культуральній рідині через 48 годин культивування досягла максимальної для цього штаму концентрації 22,6 г/л. Це було досягнуто в 5 літровому ферментері при встановленні початкового рН на рівні 6,0, за температури 37 °C та швидкості перемішування середовища 180 об/хв [58].

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.07 КР ПЗ</i>		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 2 БІОСИНТЕТИЧНА АКТИВНІСТЬ ПРОДУЦЕНТІВ ЕПС		
Розроб.		Лисенко Л.В.					
Перевір.		Резніченко Ю.М.					
Реценз.							
Н. Контр.							
Затверд.		Стабніков В.П.			<i>Кафедра БТМ</i>		
					Лім.	Арк.	Аркушів
						17	149

Далі повідомляється, що Gu з колегами підсилили у вже трансформованого штаму *Bacillus amyloliquefaciens* NK-ΔLP біосинтетичну продуктивність через посилення секреції левансахарози, ключового ферменту біосинтезу левану.

Було випробувано 7 плазмід, що кодують найкращі сигнальні пептиди *B. subtilis* 168. В результаті було створено новий штам *B. amyloliquefaciens* NK-ΔLP-Y з збільшеною здатність до синтезу левану порівняно з вихідним на 161%. В цьому дослідженні даний штам був випробуваний на середовищі з 250 г сахарози і 2,6 г сечовини (як джерел азотного живлення) і шляхом періодичного культивування. Через 30 годин культивування за значення рН = 6,0, температури 37 °C, перемішуванні в 300 об/хв, та аерації – 6 л повітря за хвилину значення концентрації левану в культуральній рідині досягло 51,2 г/л. При зміні типу культивування на напівперіодичне – дробне підживлення сахарозою (300 г), за 48 годин концентрація левану була збільшена вдвічі і досягла вже 102 г/л [57].

Є і немодифіковані штами, здатні до надсинтезу левану. Зокрема, таким є комерційний штам, виділений з так званої страви «натто», японської традиційної їжі, яку готують з зброджених соєвих бобів [58]. Даний штам представлений в дослідженні Wu і його колег, і має назву *B. subtilis* (natto) Takahashi. Зокрема, даним штамом досягається концентрація левану 61, 5 г/л за 24 години на середовищі з 250 г сахарози [59].

Ще одним немодифікованим штамом є *B. licheniformis* NS032, який на мелясному середовищі (з вмістом сахарози 200 г/л) за 48 годин культивування продукує леван в концентрації - 53,2 г/л [60].

Серед інших представників левансинтезуючих агентів відомо про рекомбінантний штам дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*, який був трансформований сконструкованою плазмідною, що несе ген левансахарази. Зокрема, кількісна оцінка біосинтезу левану є досить високою, і складає 76 г/л за 24 години, на середовищі з 191 г/л сахарози. Важливим є те, що синтез здійснюється в аеробних умовах при аерації 0,5 л/хв [61].

Наступним продуцентом, на який варто звернути увагу, є *Serratia levanicum* NN. Цей штам здатен до швидкого синтезу левану в першій фазі культивування, з досягненням 36 г/л левану за 10 годин, після чого продуктивність падає і максимальний вихід пулулану - 50 г/л досягається вже на 168 годині [62].

Zygomonasmobilis CCT 4494 є найменш продуктивним біологічним агентом для синтезу левану, проте також зустрічається серед продуцентів. Зокрема, на середовищі з 250 г/л сахарози даний штам трансформує субстрат лише в 7,6 г/л левану через 72 години [63].

2.2. Декстран

Деякі молочно-кислотні бактерії, такі як *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Weissella*, *Pediococcus* і *Lactobacillus* можуть виробляти **декстран** при ферментації в присутності цукру [64] і його характеристики визначаються багатьма факторами, включаючи тип штаму, стан ферментації, наявність поживних речовин в середній концентрації сахарози, концентрації ферменту дектрансахарози і температури [65]. *Leuconostoc mesenteroides*, що належить до групи молочних кислотних бактерій, може рости в навколишньому середовищі, що містить цукор, і синтезувати декстран [66]. Зокрема повідомляється, що для біосинтезу дектрану на молекулярну вагу дектрану синтезованого дослідженнях *L. mesenteroides*, впливає використання штучного або природнього середовища. Так, отримання дектрану штамми *L. Mesenteroides* NRRL B-512F, NCIB 8023 и NRRL B-512 на середовищі MRS і молочному пермеаті вказує на те, що декстран, одержаний на синтетичному середовищі, забезпечує більшу молекулярну вагу порівняно з декстраном, одержаним на синтетичному [67].

Серед надсинтетиків левану за останні 10 років можна виділити лише представників роду *Leuconostoc*.

Leuconostoc pseudomesenteroides XG5 описується в дослідженні Zhou як ізолюваний з домашнього вина штам. Культивуючи його при 30 °C 48 годин, на середовищі, що містить 125 г/л сахарози, 20 г/л глюкози як вуглецеве

живлення, та 10 г/л триптон, 10 г/л – яловичого екстракту, та 5 г/л дріжджового екстракту як азотне живлення, досяг концентрації декстрану 35,5 г/л [68].

В іншому дослідженні Yang з колегами дослідили штам, який ізолювали з маньчжурської домашньої квашеної капусти, після ідентифікації цьому штамові було присвоєно назву *L. citreum* NM105. При дослідженні було встановлено його здатність до синтезу декстрану. Зокрема при культивуванні штаму при 25 °C протягом 48 годин кількісний аналіз показав присутність декстрану в концентрації 23,5 г/л [69].

Іншим продуцентом левану з високою біосинтетичною продуктивністю є комерційний харчовий штам *L. mesenteroides* BD1710. Особливістю дослідження, де він застосовується, є використання томатного соку як азотного живлення та джерела ростових факторів. Сахароза використовувалася як вуглецеве живлення. Концентрація, яку здатен досягти штам, виявилася 32,15 г/л за 48 годин [70].

2.3. Пуллулан

Пуллулан, в свою чергу, в основному, синтезується поліморфним дріжджоподібним грибом *Aerobasidium pullulans*, хоч є і інші різноманітні види, такі як *Tremellamesenterica*, *Cytariaharioti*, *Cytariadarwinii*, *Cryphonectriaparasitica*, *Teloschistesflavicans* і *Rhodotorulabacarum*, що здатні синтезувати пуллулан [71]. В нині наявних дослідженнях, в основному лише *A. pullulans*, або деякі споріднені до нього види (різновиди) продовжують досліджуватися в виробництві пулууану, адже тільки їх штами здатні синтезувати високі концентрації даного екзополісахариду.

Один з найбільш перспективних для синтезу є природній штам *A. pullulans* RBF 4A3. Найвищі значення, які були досягнуті за його використання становлять 83,98 [72] та 88,59 [73] г/л при культивуванні протягом 5 діб. Найголовнішою перевагою даного штаму є його економічна доцільність застосування, адже для одержання пулууану використовуються дешеві субстрати азотного живлення, що в свою чергу знижує вартість одиниці

продукту. Зокрема, середовища для культивування даного продуцента є доволі простими, глюкоза виступає вуглецевим живленням, тоді як макуха ятрофи та кукурудзяний екстракт – азотним та мінеральним живленням.

Інші штами найчастіше є мутантами. Так, є повідомлення, про штам *A. pullulans* CCTCCM20-12259 [74]. Попри значно нижчий вихід пуллуану - 22,2 г/л, варто відмітити, що дана концентрація досягається за 72 години. Те, що стосується економічної перспективи, то даний штам культивується на значно нижчих концентраціях глюкози, порівняно з вищезгаданим штамом RBF 4A3. Проте варто відмітити, що в складі середовища для одержання *A. pullulans* CCTCCM20-12259 використовується дріжджовий екстракт, який виступає дорогим джерелом азотного живлення, і збільшує вартість сировини. Середовище є збалансованим за балансом мікроелементів, проте продуктивність біосинтезу вказує на лімітування за швидкістю процесу.

Іншим перспективним штамом, який здатен до надсинтезу пулулану є мутантний штам *A. pullulans* MTCC 1991. За оптимальних умов його концентрація становитиме 125,7 г/л. Виробниче середовище для одержання такої високої концентрації є найбільш повноцінним за своїм складом з по-між згаданих раніше, проте це не надто впливає на вартість, адже серед компонентів азотного та вуглецевого живлення використовуються відходи інших виробництв такі як - соєве борошно, концентрований гідролізат соєвого екстракту [75].

Серед споріднених видів, можна виділити штам *A. melanogenum* A4. Адже за його культивування з дробним підживленням культури вдалося досягти найвищої концентрації серед попередників, а саме - 122,34 г/л [76].

2.4. Геллан

Щодо геллану, то повідомляється про штами *Sphingomonas paucimobilis* QHZJWCGMCC2428 та *Sphingomonas* sp. ZJUT 1008, які синтезують його в концентраціях 19,9 та 14,41 г/л відповідно, за 72 та 48 годин, що в перерахунку на продуктивність має близькі значення. Перший штам синтезує геллан на середовищі з сахарозою як субстратом при pH = 7,00, 30 °C

та продуванні повітря через середовище - 1,2 л /хв, тоді як для другого характерним є глюкоза як субстрат та культивування при 28 °С при перемішуванні 220 об/хв [77,78].

Роди *Azotobacter* та *Pseudomonas*, можуть продукувати мікробний альгінат як альтернативу водоростям [79].

Проте сучасні дослідження ведуться лише, в основному, по відношенню до *Azotobacter chroococcum*. Так, повідомляється про штам *Azotobacter chroococcum* NCBIMH 249629, який може за 72 години, на середовищі з лактозою як вуглецевий субстрат синтезувати 5,65 г/л альгілату [80].

Окремо варто виділити таких продуцентів екзополісахаридів, що є представниками роду *Halomonas*. Перш за все відомо про культуру *Halomonas maurei*, з якої був виділений аніонний сульфатований гетерополісахарид мауран. Найбільш незвичайними складовими маурана є його сульфатні залишки і високий вміст уронової кислоти, що надають йому специфічні властивості. Даний продуцент в оптимізованих культуральних умовах здатний до синтезу 3,8 г/л високов'язкого маурану [81].

Також, є дослідження, присвячені новим неідентифікованим екзополісахаридам, синтезованих двома новими видами галофільних бактерій *Halomonas ventosae* та *Halomonas anticariensis*. При оптимальних культурних умовах ЕПС виробництва на *H. ventosae* і *H. anticariensis* становить 0,28 г/л і 0,49 г/л відповідно. Хоча виробництво було порівняно низьким, полісахариди демонстрували високу здатність зв'язування металів. Більше того, ці екзополімери виявляли емульгуючу активність до багатьох гідрофобних субстратів, завдяки високому вмісту білка та низькій в'язкості [82].

2.5. Галоглікан

Провели дослідження екзополісахариду, продукованого штамом НК30 *Halomonas stenophila*, який назвали **галогліканом**. Штам НК30 був виділений із солонцювато-водно-болотного угіддя в місті Брікча (Марокко). Він виробляв ЕПС переважно під час експоненціальної фази зростання і меншою мірою під час стаціонарної фази. Параметри культури впливали як на ріст бактерій, так і

на продукцію ЕПС, при цьому доведено, що вихід ЕПС завжди безпосередньо пов'язаний з кількістю біомаси. В оптимальних умовах культивування штам НК30 виробляв 3,89 г/л галоглікану, який був дуже в'язким і здатним емульгувати різні вуглеводні. Має здатність до формування біоплівки [83].

2.6. Ксилофані анцилан

В результаті проведених досліджень, Кичемазовою були виділені і охарактеризовані ЕПС синтезовані *X. xylophilus*Z-0055 (**ксилофан**) і *A. abiegnus* Z-0056 (**анцилан**). При оптимізованих умовах їх синтез складає 0,3 г/л. Такими умовами для синтезу ксилофану було використання середовища МС для ксилофану, перемішування при 200 об/хв, та додаткове підвищення концентрації в середовищі для нітрата амонію та дигідрофосфату калію – 0,25 г/л та 0,14 г/л відповідно [84].

Зокрема, в таблиці 2.1 зібрані літературні дані, щодо найкращого надсинтезу продуцентами пропромислово цінних ЕПС.

Таблиця 2.1

Надпродуценти, їх умови культивування та вихід екзополісахаридів

Біологічний агент	Склад поживного середовища для біосинтезу, г/л	Режим культивування	Час біосинтезу, год	Вихід ЕПС, г/л	Продуктивність біосинтезу, г/л/год	Література
Пулулан						
<i>Aureobasidium pullulans</i> RBF 4A3	Глюкоза – 150,0; Знежирена макуха насіння ятрофи – 80,0	pH=6,0 28 ° C $\omega=200$ об / хв	120	83, 98	0,70	[72]
	Глюкоза – 150,0; Кукурудзяний екстракт – 20,0	pH=4,5 20 ° C $\omega=300$ об / хв	96	88,59	0,92	[73]
<i>A. pullulans</i> CCTCCM20- 12259 (мутант)	Глюкоза – 45,0; (NH ₄) ₂ SO ₄ - 0,6; Дріжджовий екстракт - 3,0; K ₂ HPO ₄ – 2,0; NaCl - 1,0; MgSO ₄ – 0,1	pH=6,8, 30 ° C $\omega=200$ об / хв 3 л / хв	72	22,20	0,31	[74]
<i>A. pullulans</i> MTCC 1991 (мутант)	Соеве борошно – 50,0; Сахароза – 50,0; Глюкоза-10,0; Концентрований гідролізат соєвого екстракту – 15,0; Дріжджовий екстракт – 2,0; Сульфат амонію – 5,0; Пептон – 0,5; FeSO ₄ - 0,2; MgSO ₄ - 0,1; NaCl – 5,0; CaCl 0,2	27 ° C $\omega=210$ об / хв 1,25 л / хв	168	125,70	0,75	[75]

Продовження табл.2.1

<i>A. melanogenum</i> A4	Мальтоза – 303 (50 на початку + 253 дробним підживленням); Дріжджовий екстракт -10; Пептон – 20; K ₂ HPO ₄ – 5; MgSO ₄ ×7H ₂ O – 0,6; NaCl – 1; (NH ₄) ₂ SO ₄ - 0,6; 8 г/л Твін-80.	pH = 7 од., t = 30°C, ω=800 об/хв аерація = 1,5-4,5 л/хв	120	122,34	1,02	[76]
Леван						
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (рекомбінантний штам)	Сахароза – 191, Дріжджовий екстракт – 10,0, Пептон - 20,0	pH 5,5 30 °C ω=300 об/хв аерація = 0,5 л/хв	24	76,0	3,17	[61]
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> NK-ΔLP	Сахароза – 250,9; сечовина – 2,6; MgSO ₄ – 0,62; KH ₂ PO ₄ – 8,16; K ₂ HPO ₄ – 18,24; 1мМ FeSO ₄ , 1мМ CaCl ₂ , 1мМ MnSO ₄ ; 1мМ ZnCl ₂	pH 6,0 37 °C ω= 180 об/хв	48	22,6	0,47	[56]
<i>B. amyloliquefaciens</i> NK-ΔLP-Y	Сахароза – 250,9; сечовина – 2,6; MgSO ₄ – 0,62; KH ₂ PO ₄ – 8,16; K ₂ HPO ₄ – 18,24; 1мМ FeSO ₄ , 1мМ CaCl ₂ , 1мМ MnSO ₄ ; 1мМ ZnCl ₂	pH 6,0 37 °C ω= 300 об/хв аерація = 6 л/хв	30	51,2	1,71	[57]
<i>B. amyloliquefaciens</i> NK-ΔLP-Y	Сахароза – 250,9 (+300 дробне підживлення); сечовина – 2,6; MgSO ₄ – 0,62; KH ₂ PO ₄ – 8,16; K ₂ HPO ₄ – 18,24; 1мМ FeSO ₄ , 1мМ CaCl ₂ , 1мМ MnSO ₄ ; 1мМ ZnCl ₂		48	102,0	2,31	

Продовження табл.2.1

<i>B. subtilis (natto)</i> Takahashi	Сахароза – 250 MgSO ₄ ·7H ₂ O - 0,5 NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O – 3; Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O - 3	pH 7,0 37 °C ω= 175 об/хв	24	61,5	2,56	[59]
<i>Serratia levanicum</i> NN	Сахароза – 200, дріжджовий екстракт – 8,5, поліпептон – 8,5, глюкоза – 0,3	pH = 7,0 30 °C ω= 80 об/хв аерація = 1 л/хв	168	50,0	0,30	[62]
<i>Zymomonasmobilis</i> CCT 4494	Сахароза – 250, Дріжджовий екстракт – 5,0, KH ₂ PO ₄ -1.0; MgSO ₄ ·7H ₂ O – 1,0; (NH ₄) ₂ SO ₄ – 1,0.	25 °C pH = 4.5	72	7,6	0,11	[63]
<i>B. licheniformis</i> NS032	М'яса (з розрахунку на сахарозу – 200), дріжджовий екстракт – 1,6, , K ₂ HPO ₄ – 3, KH ₂ PO ₄ – 3, NaCl - 1, MgSO ₄ x 7H ₂ O – 0,2, FeSO ₄ x 7H ₂ O – 0,001	pH = 7.2	48	53,2	1,11	[15]
Декстран						
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> XG5	Сахароза – 125; глюкоза - 20, триптон - 10, яловичий екстракт – 10; дріжджовий екстракт – 5; K ₂ HPO ₄ – 2; CH ₃ COONa – 5; цитрат амонію – 2; MgSO ₄ ·7H ₂ O – 0,58; 0,25; MnSO ₄ ·H ₂ O Tween 80 - 1 мл	30 °C	48	35,5	0,74	[68]

Закінчення табл.2.1

<i>L. ctireum</i> NM105	Сахароза – 150; глюкоза -	25 °C	48	23,5	0,49	[69]
-------------------------	---------------------------	-------	----	------	------	------

	20, тритон - 10, яловичий екстракт – 10; дріжджовий екстракт – 5; K_2HPO_4 – 2; CH_3COONa – 5; цитрат амонію – 2; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,58; 0,25; $MnSO_4 \cdot H_2O$ Tween 80 - 1 мл					
<i>L. mesenteroides</i> BD1710 (CGMCC6432)	Сахароза – 150 Томатний сік	30 °C	48	32,15	1,20	[70]
Геллан						
<i>Sphingomonas paucimobilis</i> QHZJUIW CGMCC2428	Сахароза – 40,0; Пептон – 30,0; $MgSO_4$ – 9,2; KH_2PO_4 – 7,5; Na_2HPO_4 - 4,3; K_2SO_4 - 4,3	pH 7,00, 30 °C, 1,2 л /хв	72	19,90	0,28	[77]
<i>Sphingomonas</i> sp. ZJUT 1008	Глюкоза 33,75, кукурудзяний екстракт - 10; сечовина - 2,5; $MgSO_4$ - 1,08; KH_2PO_4 - 3,24; K_2SO_4 - 1; Триптон X 100 - 0,75.	28 °C, 220 об/хв	48	14.41	0,29	[78]
Альгінат						
<i>Azotobacter chroococcum</i> NCBI MH249629	Лактоза – 45; дріжджовий екстракт - 15; солодовий екстракт – 0,5; Na_2HPO_4 - 1; NH_4NO_3 – 5; $MgSO_4$ – 0,5.	30 °C 200 об/хв	72	5,65	0,08	[80]

РОЗДІЛ 3

Першим і найбільш критичним фактором, який безпосередньо найбільше впливає на здатність продуценту до синтезу тих чи інших екзополісахаридів є концентрація та співвідношення джерела вуглецевого та азотного живлення.

Так в роботі Esmailnejad-Moghadam [85] на прикладі оптимізації синтезу декстрану штамом *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F показано, що при низьких та середніх концентраціях сахарози збільшення концентрації дріжджового екстракту не призводить до зміни кількості синтезованого декстрану, та збільшується за рахунок збільшення вмісту дріжджового екстракту при високій концентрації сахарози. Подальше збільшення дріжджового екстракту до перевищення певної межі діапазону може навіть пригнічувати виробництво декстрану внаслідок збільшення в'язкості середовища, що приводить до обмеження масового переносу поживних речовин. Зокрема, в цьому ж дослідженні, було встановлено оптимальну концентрацію сахарози і дріжджового екстракту, що склала 15,78%, та 1,27% відповідно, а також вихід декстрана був на 51% вище, ніж у неоптимізованого середовища.

В цьому ж дослідженні повідомляється, що видалення глюкози з середовища культивування не має значного впливу на виробництво декстрану, і не є обмежуючим фактором. Крім того, доведено, що завдяки видаленню глюкози з середовища культивування і наявності в ньому лактози, об'єм накопичення біомаси продуценту знижується, тоді як і синтез декстрансахарози і споживання цукру збільшується.

					НУХТ БТЕК 02.02.07 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 3		
Розроб.	Лисенко Л.В.						
Перевір.	Резніченко Ю.М.						
Реценз.							
Н. Контр.							
Затверд.	Стабніков В.П.				Кафедра БТМ		
						Лім.	Арк.
							28
							149

З цього можна зробити висновок, що глюкоза інгібує синтез ключового ферменту для накопичення декстрану і частково змінює біосинтез декстрану на ріст бактерії.

Дріжджовий екстракт є стимулятором росту для лактобацил, проте в іншому дослідженні для іншого штаму повідомляється, що лімітом вмісту екстракту дріжджів є 0,05%, і перевищення цієї межі не призводить до збільшення виходу декстрану [86]. Говорячи про декстран, то його синтез пов'язаний з кількістю декстрансахарази, яка синтезується в середовищі. Сахароза використовується в якості джерела вуглецю для декстрансахарази, а для декстранового синтезу необхідний дріжджовий екстракт як джерело азоту [87].

Аналізуючи літературні дані, можна сказати, що підвищення коннтрації дріжджового екстракту вище оптимального, збільшує рівень рН і знижує розбавлення, що призводить і до зменшення виходу декстрану. Окрім того, висока вартість дріжджового екстракту та додавання його в високих концентраціях не є економічно вигідним.

Незважаючи на таку значну реалізацію та понад 40 років мікробних досліджень EPS, в їх біосинтезі використовуються переважно дорогі вуглеводневі субстрати. Слід зазначити, що майже половина фінальної вартості продуктів мікробного синтезу може бути вартістю вуглецю та джерела енергії. Це вимагає пошуку альтернативних дешевих субстратів для біосинтезу полісахаридів з акцентом на токсичні відходи, які з екологічної точки зору слід безпечно утилізувати [88].

Так відчизняними дослідниками, зокрема, д.б.н., професором Пирог Т.П. та співавторами проводилися дослідження та вивчення ЕПС мультифункціонального призначення Етаполану (продуцент - штам *Acinetobacter* sp. IMB B-7005). Було вивчено його синтез на дешевих субстратах, умови та їх вплив на культивування ЕПС (температура, рН, швидкість перемішувань, тривалість процесу, склад живильного середовища - вуглець, азот, фосфор, їхня концентрація і співвідношення). Обґрунтовано

вибір оптимальних умов культивування, які впливають на швидкість синтезу та вихід кінцевого продукту [115,116].

У дослідженнях Пирог Т.П., Лащук Н.В. [117] наведено експериментально підтверджену можливість заміни глюкози на дешевий субстрат - мелясу. Представлено показники синтезу ЕПС за культивування при відсутності мінерального джерела азотного живлення, і використання посівного матеріалу, вирощеного на ацетаті; синтез ЕПС на суміші етанолу і меляси при використанні інокуляту, вирощеного на C_2 - субстратах. Встановлено, що на суміші етанолу і меляси вихід ЕПС у 1,3-1,5 рази більший, ніж на мелясі.

В роботі Пирог Т.П., Коваленко [118] представлено синтез етаполану на суміші енергетично-нерівноцінних ростових субстратів (етанол+глюкоза). Визначено, що обидва субстрати споживаються продуцентом одночасно, при цьому підвищується в 1,3-1,9 рази його максимальна питома швидкість росту. Етаполан, синтезований на даній суміші, характеризується підвищеним вмістом жирних кислот, має гарні реологічні властивості і практичну цінність.

В декількох працях Пирог Т.П., Вороненко А.А., Івахнюк М.О. [119,120] було описано використання нейтралізованої після стерилізації меляси в суміші з рафінованою олією, яке супроводжувалося підвищенням кількості синтезованого етаполану у 1,15—1,25 раз порівняно із застосуванням звичайної гідролізованої меляси. Також було досліджено заміну рафінованої олії на різні види відпрацьованої олії (після смаження м'яса, картоплі, овочів і змішаної після приготування різних страв). Найвищий вихід ЕПС спостерігався на суміші меляси та відпрацьованої олії після смаження овочів, а найнижчий - після смаження м'яса.

Саме через вартість є багато досліджень, які використовують в поживних середовищах альтернативні джерела живлення. Зокрема, сироватка, молочна сироватка використовувалася у виробництві екзополісахаридів [86].

Щодо пулулану, то його можна синтезувати із великої кількості вуглецевих джерел, включаючи моно- і дисахариди. В дослідженні, присвяченому синтезу пулулану штамом *A. pullulans* Y68 на різних

вуглеводних джерелах повідомляється, що максимальний вихід досягається в присутності глюкози, тоді як для сахарози, дектрину, мальтози, фруктози і ксилози ці значення є значно меншими. Підтверджуючи тезис на початку розділу, джерела вуглецю і азоту – це два фактори, які визначають вихід і молекулярну вагу пулулану. Натрат амонію, сечовина, пептон, дріжджовий екстракт, макуха сої та кукурудзяного екстракт, найчастіше можна спостерігати в середовищах як джерела азотного живлення [89].

Багато вчених присвячують свої дослідження на пошук оптимальних складів поживних середовищ. Наприклад, Cheng з співавторами [87] вивчали вплив джерела азоту і концентрацію сахарози в виробництві пулулану. Зокрема, повідомляється, що надлишок сахарози негативно впливає на вихід пулулану, знижуючи його концентрацію з 115–125 г/л до 50,8–58,2 г / л, тобто в 2 рази. Вони також підтвердили, що джерело азоту необхідне для виробництва біомаси і пулулану.

Повідомляється про дослідження щодо виробництва пулулану при періодичному культивуванні за використання різних концентрацій сульфату амонію і дріжджового екстракту. Вихід пулулану покращився в умовах лімітування за азотним живленням в порівнянні з умовами надлишку джерел азоту. Це вказує на те, що обмеження азоту збільшує активність ключових ферментів біосинтезу пулулану – мутази α -фосфоглюкози і глюкозилтрансферази [91].

Про це свідчать і більш ранні дослідження команди вчених на чолі з Jiang про те, що наявність надлишкового азоту в середовищі посилює ріст *A. pullulans*, але негативно впливає на вихід полімерів, синтез яких корелює з УДФГ-фосфорилазною активністю [92].

Температура, рН і концентрація кисню в середовищі також є важливими параметрами, які впливають на врожайність того чи іншого екзополісахариду. У літературі є розбіжності у встановленні оптимального рН і температури для виробництва ЕПС.

Зокрема, для пуллулану повідомляється коливання в діапазоні від рН 5,5-7,5 і 25-30 °С в залежності від морфології продуцента [93]. Аерація також може змінити профіль росту, і як наслідок різко збільшити або зменшити врожайність пуллулану [94].

Витрати на виробництво пуллулану відносно високі (як видно на прикладі багатьох інших біополімерів), тому недорогі поживні речовини поживних середовищ необхідні для його рентабельного промислового виробництва.

Göksungur з командою вчених [95] досліджували виробництво пуллулану з відходів – гідролізованого картопляного крохмалю, як вуглецевого субстрату для *A. pullulan*P56. Окрім того для оцінки результатів використовувалася методологія поверхні відгуку. Також були досліджені різні джерела азоту, і як оптимальне, обрано культивування на дріжджовому екстракті. На такому середовищі вихід пуллулану на рівні 19,2 г/л одержано при встановлених оптимальних параметрах культивування: час біосинтезу - 118,8 годин, вихідна концентрація 79,4 г / л і вихідна концентрація 7,26 рН. Використання методології поверхневого відгуку призвело до збільшення виробництва пуллулану на 20 %.

Виробництво пуллулану за допомогою *A. pullulans* призводить до утворення небажаного чорного пігменту - меланіну. Він утворюється в кінці експоненційної фази і потрапляє в середовище, забарвлюючи її в чорний колір [96]. Щоб вирішити цю проблему, в якості штаму продуцента рекомендується використання *A. pullulans*, які не синтезують меланін.

Виробництво пуллулану методом глибинного культивування – це найбільш оптимальна методологія. Вихід пуллулану безпосередньо пов'язаний з параметрами біореактора і його раціональним дизайном. Дослідники використовують різні типи конструкції і системи біореакторів, такі як періодичний з підживленням, безперервний, іммобілізована біоплівка, аерліфтні і барботажні системи відповідно до особливостей і потреб технології і продуцентів [97].

Дешевше джерело вуглецю «Джагері» було успішно використане в якості заміни очищеного тростинного цукру (сахарози) для пулуланової ферментації. Джагері, що виробляється домашнім виробництвом в Індії, є твердим продуктом рафінованого або неочищеного цукрового тростинного соку і містить 75-85% сахарози. При культивуванні штаму *A.pullulans* RBF 4A3 на цьому субстраті концентрації 180г/л призводить до синтезу 66,25 г/л пуллулану протягом 72 годин ферментації, що свідчило про гарний ріст продуцента. В'язкість пігментного полімеру була в п'ять разів вище, ніж у чистої сахарози як джерела вуглецю [98].

Величезна кількість побічних продуктів на основі сільськогосподарської продукції може використовуватися як субстрати для пулуланової ферментації. Вони представляють собою гідролізат торфу, відпрацьований сульфітовий лікер, пережарену оливкову олію, екстракт шкірок винограду, мелясу, побічні продукти виробництва паливного етанолу, гідролізат інуліну, гідролізований крохмаль, відходи картоплі, кукурудзяний екстракт, м'яса буряка, відпрацьований зерновий екстракт, сок горіха кешью, кокосова вода [95].

Є повідомлення [96], що при безперервному культивуванні концентрація пуллулану, синтезованого штамом *A. pullulans* ATCC 201253, досягла максимального значення 60,7 г / л відповідно в пластиковій композитній трубці. Така система з пластикових композитних трубок має кілька переваг, таких як розширення профілю виробництва пуллулану, подолання ефекту придушення цукру і отримання пуллулану при помірній швидкості підлучення азотом. Крім добре відомих переваг високостабільних систем з меншими капітальними витратами, біоплівкові реактори також мають великий потенціал для розвитку в більш продуктивний процес, що має назву - безперервна ферментація.

Незважаючи на різноманітність мікроорганізмів-продуцентів левану, витрати на виробництво леванового полісахариду залишаються високими. Середовище для ферментації становить приблизно 50% виробничих витрат на мікробний процес, однак недорогі джерела вуглецю, такі як сиропи і патока раніше використовувалися для виробництва мікробного левану [94].

Згідно з іншими дослідженнями, патока цукрової тростини для культури *Bacillus lentus* V8[97], фініковий сироп для *Mycobacterium levaniformis* 1406 [98], патока і сироп в культурах *Z. mobilis* ATCC 31821 [102] досліджені як недорогі джерела вуглецю для виробництва левану. Біосинтез левану в системах глибокої ферментації обмежений вимогами росту клітин, який може не відповідати оптимальним умовам для високої активності левансахарози [103].

Srikanth [18] досліджував ефекти параметрів ферментації, включаючи початковий рН, концентрацію сахарози, азотне живлення, концентрацію посівного матеріалу і час культивування при синтезі левану з використанням *Acetobacter xylinum* NCIM2526 як штаму-продуцента. Оптимальні умови були визначені як 10, 50-60 і 1,49 г/л для азоту, сахарози і відповідно інокулята. Концентрація левану помітно поступово збільшується через перші 24 години, а максимальна продуктивність для синтезу левану досягається через 122 години, коли вихідний рН був встановлений на рівні 6,8. Концентрації посівного матеріалу від 5 % до 10 % призводили до зміни виходу левану, як і очікувалося, максимальний вихід (1,46 г/л) було досягнуто при 7 %. Зміна концентрації сахарози від 20 до 80 г/л впливала на врожаність левану. У діапазоні 40-50 г/л вихід продукції був збільшений, в діапазоні 70-80 г/л він був знижений, а в діапазоні 20-40 г/л, діапазон не змінився.

Sarilmiser з колегами [35] вивчали продукцію левану у галофільних штамів мікроорганізмів *Halomonas smyrnensis* AAD6T з використанням різних стимулюючих факторів. Наприклад, різні стратегії голодування застосовувалися в різних тимчасових інтервалах в системі періодичного біореактору. Серед різних рН і перевірених концентрацій сахарози, максимальний вихід левану був досягнутий при рН 7 (1,345 г / л) і 50 г/л сахарози (1,320 г/л). Коли обмеження по азоту і фосфору були застосовані і концентрація левану, і біомаса були зменшені, в той час як значення виходу продукту з субстрату зросло. Цікаво, що культури, вирощені в присутності

борної кислоти справили найвищі концентрації левану (8,84 г/л) в умовах контролювання біореактору.

Це поліпшення було пояснено біологічним феноменом, відомим як кворум-зондування (QS), в якому беруть участь атоми бору. Одна з сигнальних молекул бере участь в QS у *H. smyrnensis* AAD6T; пізніше був ідентифікований як C 16 –ацілгомосерінілактон [104].

Коли застосовувалися високі (400 г/л) і низькі (20 г/л) концентрації сахарози, були одержані відповідно низькі і високі молекулярні маси левану. Ця лінійна залежність пояснюється дією сахарози на фермент левансахарози. Автори прийшли до висновку, що молекулярна маса левану залежить від умов реакції, таких як рН, температура, перемішування швидкості і сахарози, причому остання є найбільш ефективним фактором, що визначає молекулярну масу. Виробництво Левана в системах з іммобілізованими клітинами також вигідне, оскільки такі системи мають вигоду з відносно простих наступних процесів, високої об'ємної продуктивності, вдосконаленого процесу контролю і зниження ризику забруднення при виробництві пінополістиролу [105].

Впровадження цього сприятливого методу виробництва левану може використовуватися в якості альтернативи періодичним процесам, процесам з підживленням і безперервним процесам [5].

Наприклад, Silbir з колегами [105] проаналізували виробництво левану в періодичному і безперервному режимі культивування з використанням штаму *Zyotomonas mobilis* B-14023. Безперервне бродіння виробництва здійснювалося в біореакторі з ущільненим шаром, в якому використовувався іммобілізований альгінат кальцію клітини. Час інкубації, початковий рН і концентрація субстрату були трьома найбільш важливими змінними процесу для серійного виробництва левану. Найбільша сума левану - 40,2 г/л була отримана при використанні дріжджового екстракту як органічного джерела азоту. Більш того, іммобілізовані клітини *Z. mobilis* в безперервній системі ферментації були успішно застосовані для виробництва Левана. Неконтрольоване падіння тиску в

системі і руйнування кульок гелю альгілату кальцію були основними обмеженнями для більш тривалого часу бродіння.

Варто згадати і про **альгінат**. Його промислова цінність також залежить від ціни виробництва. Одним з основних параметрів, що впливає на ціну бактеріального альгілату, є джерело вуглецю, що використовується для виробництва. Як відомо, виробництво бактеріального альгілату досліджувалося роками, використовуючи зазвичай глюкозу та сахарозу, оскільки вони є простими цукрами і бактерії можуть легко їх засвоїти. Альтернативами для зменшення вартості виробництва біополімерів можуть бути або відходи патоки (зазвичай стічні води харчової промисловості містять деякі цукри, після таких виробництв як пивоварні заводи, а також при переробці фруктів), або дешевші джерела вуглецю.

Патока як побічний продукт виробництва цукру також може бути прикладом дешевого субстрату. Патока містить в основному цукри, такі як сахароза, глюкоза та фруктоза, що становлять до 50 %. Її досліджували як джерело вуглецю для виробництва полігідроксіалканоатів [107], целюлози [108], таксантану [109], а також біополімерів із різним вмістом цукрів [110]. З іншого боку, виробництво альгілату з меляси є порівняно рідкісним [111]. Мальтоза є основним цукром у стічних водах пивоварні, оскільки під час процесу солод перетворюється в цукор – мальтозу. Дуже обмежена кількість досліджувала використання мальтози або стічних вод пивоварень як джерело вуглецю. Крохмаль також використовували для зниження собівартості біополімерів, таких як полігидроксibuтирату [112], ксантану [113], целюлози [114].

РОЗДІЛ 4

ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ВИПУСКУ СУБСТАНЦІЇ ДЛЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ

4.1. Передумови виробництва ЛЗ

4.1.1. Аналіз фармакологічних властивостей цільового ЛЗ, галузей використання

Альгірати важливі для медичної практики, оскільки мають властивість запобігати розвитку багатьох захворювань - онкологічних, серцево-судинних, ниркових, шлунково-кишкових, здатні зміцнювати імунну систему [121].

Ряд фізико-хімічних властивостей, притаманних альгірату, а саме біосумісність та відсутність токсичності, дозволяють його широко застосовувати з метою доставки лікарських засобів, як для загальної, так і місцевої терапії різноманітних захворювань. У присутності іонів кальцію, барію, цинку, альгірат при рН більше 6 утворює глобули, тому його використовують для інкапсуляції лікарських засобів. Ряд вчених пропонують застосовувати полііонні гібриди нанокомпозитних систем на основі альгірату натрію та хітозану для доставки гідрофобних лікарських засобів. Перспективним є використання в саме такій лікарській формі певних медикаментів, які до цього часу мали лише парентеральні шляхи введення [122].

Також були синтезовані плівки з використанням тіолованого альгірату натрію для покращеної доставки Метформіну в проблемну зону з метою місцевого лікування періодонтиту. Згідно зроблених висновків, ця багатошарова мукоадгезивна плівка у вигляді внутрішньокишечкових аплікацій дозволяє контролювати перебіг у хворих хронічного періодонтиту.

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.07 КР ПЗ</i>		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Лисенко Л.В.			РОЗДІЛ 4 ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ВИПУСКУ СУБСТАНЦІЇ	Літ.	Арк.
Перевір.		Резніченко Ю.М.					37
Реценз.						Кафедра БТМ	
Н. Контр.							
Затверд.		Стабніков В.П.					
						Аркушів	149

Отже, лікарські препарати, капсульовані в оболонку на основі альгінату натрію, можуть забезпечувати стійку кінетику їх вивільнення, що, у свою чергу, мінімізує розвиток побічних та токсичних реакцій [122].

Імуностимулююча дія альгінатів пов'язана з активізацією фагоцитозу (що підвищує противірусні та протимікробні реакції), з адсорбцією надмірної кількості імунних комплексів в крові (тим самим запобігає розвитку запальних і алергічних реакцій). Альгінати підвищують бар'єрну функцію шкіри і слизової оболонки дихальних шляхів і шлунково-кишкового тракту по відношенню до патогенної дії мікроорганізмів за рахунок стимулювання синтезу антитіл (імуноглобулінів А). Стимулюючи фагоцитоз, вони надають і протипухлинний ефект. Солі альгінової кислоти є сорбентами холестерину і жирних кислот, тим самим, усуваючи основні можливі причини розвитку атеросклерозу. Альгінати здатні зв'язувати і виводити з організму іони важких металів, забезпечуючи протирадіаційний ефект. Також вони входять до складу препаратів для лікування виразкових захворювань шлунково-кишкового тракту, так як здатні зупиняти кровотечі, володіють антацидними властивостями, стимулюють загоєння виразкових уражень. Для лікування ран різного походження, опіків, трофічних виразок випускаються пов'язки з альгінатним покриттям. Такі пов'язки мають дренируючі властивості, прискорюють очищення ран, захищають рану від проникнення інфекції і від травмування, сприяють позитивному перебігу раневого процесу і загоєнню [121].

Модифікований альгінат має широке застосування і для місцевого лікування захворювань шкіри та слизових оболонок. Гелі та плівки на основі альгінату кальцію сприяють регенерації шкіри, загоєнню ран. Додавання до складу альгінату інших хімічних речовин змінює не лише його фізико-хімічні властивості, а й надає йому нових лікувальних характеристик. Відомо, що рани, особливо хронічні, погано загоюються через лужне значення середовища раневого вмісту. Застосування рН-модулюючих пов'язок може бути одним із методів лікування таких ушкоджень. Так, включення карбоксильних кислот до

складу гідрогелей на основі діакрил/акрил/альгілату призводить до збільшення їхніх рідинно-поглинаючих властивостей на 500 % [122].

Біополімер альгілат натрію у вигляді гідрогелю був застосований місцево під час облітерації лобової пазухи остеопластичним матеріалами. Ця методика лікування гнійного фронтиту характеризувалася відсутністю післяопераційних ускладнень, та сприяла більш швидкому загоєнню лобових пазух, і, як наслідок, скоротила тривалість перебування хворих у стаціонарі. Також він є хорошим кровоспинним засобом при внутрішніх кровотечах. Альгілат-вмісні матеріали сприяють кращому згортанню крові [122].

Для швидкого полегшення печії використовують антациди і препарати альгінової кислоти (альгілати). Дослідження, які порівнюють їх ефективність, демонструють значну перевагу альгілатів. Це пояснює принципова відмінність механізмів їх дії. Антациди хімічно нейтралізують соляну кислоту, інактивують пепсин, адсорбують жовчні кислоти і т. д., тому здатні швидко, але нетривало зменшити вираженість або зупиняти печію. Відомо, що систематичний прийом антацидів загрожує побічними ефектами, серед яких відзначають перевантаження солями алюмінію, запор, гіперкальціємію, а також вплив на всмоктування інших препаратів, зокрема антибіотиків [123].

Гастроезофагеальна рефлюксна хвороба (ГЕРХ) – це надзвичайно поширене захворювання. У дорослого населення країн Західної Європи і Північної Америки її поширеність досягає 10-20 %. ГЕРХ розглядають як стан, який розвивається, коли рефлюкс вмісту шлунку викликає появу турбуючих пацієнта симптомів і / або розвиток ускладнень. Найбільш характерними симптомами захворювання визнані печія і регургітація (кисла відрижка, зригування), а найпоширенішим ускладненням - рефлюкс-езофагіт. Цілями терапії ГЕРХ є швидке зупинення і контроль симптомів, поліпшення самопочуття і якості життя хворого, загоєння рефлюкс-езофагіту і профілактика ускладнень. Їх досягнення забезпечують зміну способу життя, дотримання дієти, фармакотерапію (інгібітори протонної помпи, H₂-блокатори рецепторів

гістаміну, прокинетики, альгінати, антациди), при неефективності якої вдаються до хірургічного лікування (лапароскопічна фундоплікація і ін.) [123].

Препарати альгінової кислоти при прийомі всередину надають, скоріше, фізичний, ніж хімічний вплив. У кислому середовищі шлунка альгінові кислоти осаджуються, в результаті чого протягом декількох хвилин утворюється невимотувальний альгінатний гель. При взаємодії препарату бікарбонату натрію з соляною кислотою утворюється вуглекислий газ, що завершує формування рафта («альгінатного плота»), який плаває на поверхні вмісту шлунка в якості рухомого нейтрального наповнювача, і вибірково входить в стравохід до або замість вмісту шлунка під час епізодів рефлюксу. Структура рафта може залишатися в шлунку до 4 годин за умови прийому препарату через 30 хвилин після їжі. Таким чином, препарати, що містять альгінати, діють так само швидко, як антациди, але тривалість їх ефекту значно більша. Альгінова кислота не має системної дії і специфічних побічних ефектів. Вважається, що альгінати не роблять істотного впливу на внутрішньошлунковий рН і інтрагастральний протеоліз. Важливий факт відсутності фармакокінетичної взаємодії альгінатів та інгібіторів протонних помп, що дозволяє при необхідності використовувати їх для комбінованої терапії [123].

4.1.2. Обсяг ринку та очікувані темпи його розвитку.

За даними останніх років захворюваність на ГЕРХ збільшилася. Внаслідок харчування в «фаст фудах», тютюнопаління з дитячого віку, надмірного вживання шоколаду, напоїв, особливо газованих, які містять кофеїн, барвники та ароматизатори, слабоалкогольних напоїв, вживання солодкої та жирної, смаженої їжі, вживання алкоголю – ГЕРХ стала актуальною проблемою дитячої гастроентерології. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ) у європейських країнах, в тому числі в Україні, збільшується кількість вживання алкоголю на душу населення, а перший досвід вживання алкогольних напоїв стається до 13–15 років [124].

За даними літератури серед дітей та підлітків від 6 до 18 років з патологією органів травлення у третини пацієнтів виявлено ендоскопічно

позитивну форму захворювання, яка в 24,8 % випадках проявлялась у формі катарального та в 5,6 % – у формі ерозивно-виразкового рефлюкс-езофагіту [124].

Розповсюдженість хвороби серед всього населення у світі також достатньо висока – від 7 % до 20 %, що дозволило назвати ГЕРХ «проблемою третього тисячоліття». Протягом останніх 20 років реєструється зростання поширеності ГЕРХ в світі. За даними популяційних досліджень, поширеність ГЕРХ (печія і/або регургітація, що виникають не рідше одного разу в тиждень) в світі становить приблизно 13 %. При цьому мають місце суттєві географічні відмінності. Результати більшості досліджень свідчать про те, що максимальна поширеність ГЕРХ спостерігається в Південній Азії і Південно-Східній Європі (> 25 %), мінімальна – в Південно-Східній Азії, Канаді та Франції (<10 %). У країнах Західної Європи цей показник коливається від 10 % в Іспанії і Великобританії до 17 % в Швеції, в США - від 13 до 29 %. Поширеність ГЕРХ в Туреччині досягає 23 % [124,125].

В Україні статистична реєстрація ГЕРХ почалася з 2009 року, і, на жаль, дані ще не є повними, захворюваність складає 10 випадків на 1000 населення. Наявні повідомлення, що поширеність ГЕРХ в Україні складає від 11,1 % до 30 %. За іншими даними, реальна поширеність ГЕРХ може бути значно більшою, оскільки близько 25 % хворих на ГЕРХ не звертаються до лікарів, займаються самолікуванням, у частини пацієнтів ГЕРХ має безсимптомний перебіг [126].

Можна зробити висновок, що захворюваність людей на ГЕРХ лише набирає обертів і стрімко поширюється, тому ринок препаратів на основі альгінатів в подальші роки буде лише збільшуватись.

4.1.3. Вибір форми випуску ЛЗ

Як за основу, було обрано препарат Гавіскон. Даний лікарський засіб випускається в таблетках та у вигляді сиропу.



Рис.4.1. Лікарські форми Гавіскону [127,128]

Вибору лікарської форми залежить упаковка лікарського засобу. Таблетки ми вибираємо через ряд переваг, а саме [129]:

- точність дозування лікарських речовин, що знаходяться в таблетці;
- портативність таблеток, що забезпечує зручність випуску, зберігання і транспортування лікарської форми;
- збереження лікарських речовин в спресованому стані. Для недостатньо стійких речовин можливе нанесення захисних оболонок;
- маскування неприємних органолептичних властивостей лікарських речовин (смак, запах, фарбувальна здатність), яка досягається накладанням оболонок з цукру, какао, шоколаду та ін.;
- локалізація дії лікарської речовини в певному місці шлунково-кишкового тракту шляхом нанесення оболонок, розчинних у кислому та лужному середовищі;
- пролонгування дії лікарських речовин (шляхом нанесення покриттів);
- регулювання послідовного всмоктування окремих лікарських речовин з таблетки складного складу в певні проміжки часу (багатошарові таблетки);
- поєднання лікарських речовин, несумісних за фізико-хімічними властивостями.

Таблетки мають первинну (блістер) та вторинну (коробка) упаковку. Такий метод пакування дозволяє зручно та безпечно транспортувати ліки у будь-яку точку світу. Для лікування - найоптимальніший варіант виробництва для лікування ГЕРХ - по 8 таблеток в 1 блістері, в упаковці - по 2 блістера.

4.1.4. Опис лікарського засобу згідно АНД

Гавіскон

Ця аналітично нормативна документація поширюється на медичний препарат Гавіскон, який являє собою таблетки, що містять альгінат, натрій гідрокарбонат та кальцій карбонат як основні діючі речовини.

Склад [130]:

Діючі речовини:

1 жувальна таблетка містить 250 мг альгінату, 133,5 мг натрію гідрокарбонату, 80 мг кальцію карбонату;

Допоміжні речовини:

маніт (Е 421),

макрогол 20 000,

магнію стеарат,

коповідон,

калію ацесульфам,

м'ятний ароматизатор,

аспартам (Е 951).

Призначення. Лікування симптомів гастроезофагеальної рефлюксної хвороби, а саме: печії; відрижки кислим, розладів травлення, що відносяться до рефлюксу, у тому числі у період вагітності [130].

Форма випуску. По 8 жувальних таблеток у блістері, по 2 або 3 блістери у картонній коробці. По 16 жувальних таблеток у поліпропіленовому контейнері [130].

СПЕЦИФІКАЦІЯ

Гавіскон

Найменування показників контролю	Встановлені значення	Методи контролю
Опис	Таблетка кругла, плоска з фаскою, майже білого або кремового кольору, з невеликими вкрапленнями, з ароматом м'яти. Таблетка має тиснення меча та кола з одного боку та G 250 зі зворотного.	За п. 1 АНД, візуально
Мікробіологічний контроль	Загальне число аеробних мікроорганізмів: не більше 10^3 КУО в 1 г. Загальне число дріжджових та плісневих грибів: не більше 10^2 КУО в 1 г.	За п. 2 АНД, висівом на чашки Петрі ДФУ 2.6.12
Розпадання	При додаванні води Р протягом 30 хвилин таблетка повинна розпастись	За п.3 АНД, візуально ДФУ 2.9.1
Розчинення	За 45 хв до розчину повинно перейти 75 % і не більше 15 % діючої речовини	За п.4 АНД, ДФУ 2.9.4
Однорідність маси	Відхилення маси вмісту кожної таблетки від середньої маси має бути в межах $\pm 5\%$	За п.5 АНД, ДФУ 2.9.5
Стираність	Втрата в масі має бути не більше 1 %	За п.6 АНД, ДФУ 2.9.7
Стійкість до роздавлювання	Менше 97 % маси має проходити через сито	За п.7 АНД, ДФУ 2.9.8
Втрата в масі при висушуванні	Не більше 3 %	За п. 8 АНД, ДФУ, 2.5.12
Геометрична відповідність	Діаметр 1,2 см, Висота 0,6 см	За п.9 АНД, штангенциркулем
Розмір часток порошку	5 мкм	За п. 10 АНД, ДФУ, 2.9.13
Насипний об'єм	250 мкг	За п. 10 АНД, ДФУ, 2.9.15

Методи контролю

Гавіскон

1. Опис

Таблетка кругла, плоска з фаскою, майже білого або кремового кольору, з невеликими вкрапленнями, з ароматом м'яти. Таблетка має тиснення меча та кола з одного боку та G 250 зі зворотного.

Визначають візуально та органолептично [130].

2. Мікробіологічний контроль

Згідно ДФУ для таблеток та порошків проводять визначення загального числа життєздатних аеробних мікроорганізмів, а також можуть проводити випробування на окремі види біологічних агентів. Найпростішим та загальновживаним методом визначення загального числа життєздатних аеробних мікроорганізмів є висівання дослідних зразків на поживні середовища.

Порядок відбору проб. Відбір проб лікарського засобу треба проводити в суворо визначеному порядку. Порядок відбору проб залежить від розмірів серії, ступеня небезпеки для здоров'я, пов'язаного з мікробним забрудненням лікарського засобу вище допустимого рівня, характеристиками лікарського засобу й очікуваним рівнем мікробного забруднення. Якщо немає інших зазначень в окремій статті, для випробування використовують зразки по 10 г або 10 мл субстанції або готового лікарського засобу, відібрані з дотриманням застережних заходів, як зазначено вище. Зразки відбирають у випадковому порядку з упаковок *in bulk* або з контейнерів з готовим лікарським засобом. Якщо необхідно, при відборі однієї проби змішують вміст кількох контейнерів, для того щоб одержати зразок необхідної маси або об'єму (залежно від природи випробовуваної субстанції або готового лікарського засобу) [131].

Альгінат є розчинним у воді, тому для нього застосовується наступна методика. 10 г або 10 мл випробовуваного лікарського засобу розчиняють або розбавляють буферним розчином із натрію хлоридом і пептоном рН 7.0 або іншою підходящою рідиною. Як правило, використовують розведення 1:10 [131].

МЕТОДИКА КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ ЗА ПОКАЗНИКОМ «МІКРОБІОЛОГІЧНА ЧИСТОТА»

Для розробки методики були проведені випробування на визначення антимікробної дії.

Антимікробну дію речовини визначали за результатами вивчення пригнічення зростання тест-мікроорганізмів в порівнянні з контролем.

Для дослідження антимікробної дії, при визначенні загального числа мікроорганізмів, висівання проводили глибинним методом.

Було виявлено, що випробувальний препарат не має антимікробної дії по відношенню до *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Aspergillus brasiliensis* в умовах проведення випробування.

На підставі отриманих результатів та враховуючи фізико-хімічні властивості, пропонуємо наступну методику контролю якості за показником «Мікробіологічна чистота»:

Випробування проводять у відповідності до вимог ДФУ, 2.6.12

Підготовка зразка.

10 г розтертого в ступці препарату вносять у стерильну ємність, доводять об'єм до 100 мл буферним розчином із натрію хлоридом і пептоном рН 7,0, що містить 4 % полісорбату-80, і струшують до отримання гомогенної проби.

Визначення загального числа аеробних мікроорганізмів (ТАМС). По 1 мл підготовленого зразка вносять у дві чашки Петрі і заливають 15-20 мл розплавленого та охолодженого до температури не вище 45 °С живильного середовища Соєво-казеїновий агар.

Інкубують посіви при температурі від 30 °С до 35 °С протягом 5 діб, якщо достовірні результати випробування не будуть отримані за більш короткий час.

Рис.4.2. Обладнання, яке використовується у дослідженні розпадання таблеток [132]

Вважається, що зразки розпалися, якщо на сітці [131,132]:

а) немає залишку;

б) є залишок, який складається з м'якої маси, що не має відчутно твердого ядра, котре не змочується;

г) є лише фрагменти покриття, або лише фрагменти оболонки на сітці.

Методика дослідження. У кожну з шести трубок кошика поміщають одну таблетку або капсулу. Корзинка приєднується до механічного пристрою. Кошик занурюють у рідину. Об'єм рідини має бути таким, щоб, коли кошик знаходиться у крайньому верхньому положенні, сітка була мінімум на 15 мм нижче поверхні рідини; коли ж кошик знаходиться в найнижчому положенні, сітка була на 25 мм вище дна посудини, а верхні відкриті кінці скляних трубок — над поверхнею рідини. Вмикають прилад, по закінченні зазначеного часу кошик виймають і досліджують стан таблеток. Препарат витримав випробування, якщо всі таблетки розпалися [132].

4. Тест "Розчинення" для твердих дозованих форм

Такий тест роблять за допомогою різноманітного обладнання. Одним із стандартних апаратів є обладнання з лопаттю [133].

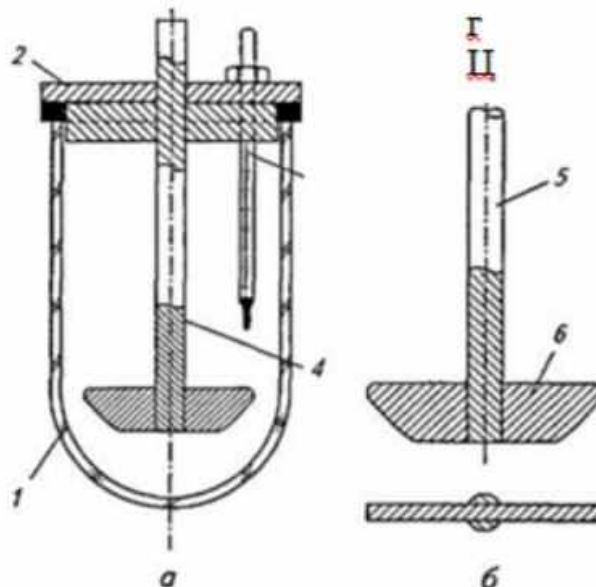


Рис. 4.3. Приклад схематичного зображення обладнання з лопаттю [134]

Нині існують ручні, автоматичні та напівавтоматичні системи для проведення тесту на розведення. Приклади таких апаратів зображено на рис. 5.3.



Рис 4.4. Обладнання з лопаттю з різними рівнями автоматизації:

1 - ручний; 2 - автоматичний; 3 - напівавтоматичний [133]

Методика дослідів. Поміщають зазначений об'єм середовища розчинення у посудину, збирають прилад, нагрівають середовище розчинення до $(37.0 \pm 0.5) ^\circ\text{C}$ і видаляють термометр. Поміщають одну одиницю випробовуваного препарату в прилад. Перед початком обертання лопаті поміщають препарат на дно посудини; тверді дозовані форми, що при цьому можуть спливати, поміщають на дно посудини горизонтально за допомогою підходящого пристрою, наприклад, дроту або скляної спіралі. Слід вжити заходів для недопущення наявності бульбашок повітря на поверхні препарату. Обертання лопаті або кошика із зазначеною швидкістю ($\pm 4 \%$) починають негайно [131].

У випадках використання приладу з лопаттю або кошиком за означений час або із зазначеними інтервалами, або безперервно здійснюють відбір зазначеного об'єму чи об'ємів з ділянки посередині між поверхнею середовища розчинення і верхньою частиною кошика або лопаті на відстані не ближче 10 мм від стінки посудини [131].

Відібрану рідину фільтрують, використовуючи інертний фільтр із відповідним розміром пор, який не викликає значної адсорбції активного компонента з розчину і не містить таких речовин, які екстрагуються середовищем розчинення і могли б впливати на результати зазначеного аналітичного методу [131].

5. Однорідність вмісту діючої речовини в одиниці дозованого лікарського засобу

Випробування на однорідність вмісту діючої речовини в одиниці дозованого лікарського засобу ґрунтується на кількісному визначенні вмісту в індивідуальних одnodозових одиницях препарату з метою з'ясування, чи знаходиться цей вміст у межах, встановлених стосовно середнього вмісту у випробовуваному зразку [131].

Для твердих дозованих форм застосовується наступна методика. У кожній із 10 відібраних одиниць визначають кількісний вміст діючої речовини, використовуючи підхожий аналітичний метод. Розраховують приймальне число, яке має наступну формулу [131]:

$$|M - X| + ks,$$

де X - середнє значення вмісту в окремих одиницях ($x_1, x_2, \dots, x_n$), виражене у відсотках від номінального значення, M - опорне значення ($M=X$), k - константа прийнятності ($n = 10, k = 2,4$; $n = 30, k = 2,0$), s - стандартне відхилення вибірки.

Як було згадано до цього, кількісний метод альгілату проводять спектрофотометрично. Наважку препарату розчиняють в 0,1 М розчині їдкого натру, доводять об'єм розчину 0,1 М розчином їдкого натру до 100 мл. В пробірку відмірюють 0,5 мл отриманого розчину, 0,25 мл 0,5% спиртового розчину карбазолу, 5,5 мл сірчаноокислого розчину сечовини і борної кислоти; пробірку з розчином кип'ятять на водяній бані протягом 15 хв, охолоджують і вимірюють оптичну щільність розчину при 520 нм [135].

Підрахунок проводять за формулою.

6. Стираність таблеток

Випробування дозволяє визначити стираність таблеток без оболонки за певних умов, тобто ушкодження поверхні таблеток під дією механічного удару або стирання [131].

Для аналізу використовується обладнання з барабаном, яке представлено на рис. 5.4. Одна сторона барабана знімна. При кожному оберті барабана

таблетки приводяться в рух за допомогою зігнутої лопаті, розташованої між центром барабана і його зовнішньою стінкою. Барабан прикріплюється до горизонтальної осі пристрою, що забезпечує швидкість обертання приблизно 25 об/хв. Отже, при кожному оберті барабана таблетки падають, перевертаючись або ковзаючи, з висоти приблизно 130 мм на стінку барабана або одна на одну [131].



Рис 4.5. Обладнання для перевірки стираності таблеток [136]

Методика досліджу. При масі однієї таблетки менше 0,65 г для випробування беруть 20 таблеток; при масі однієї таблетки більше 0,65 г – 10 таблеток. Таблетки поміщають в сито номер 1000 і ретельно видаляють пил за допомогою стисненого повітря або м'якого пензлика. Таблетки зважують (точна наважка) і поміщають у барабан. Після 100 обертів барабана таблетки виймають, знову ретельно видаляють пил. Якщо на жодній з таблеток немає ознак сколювання або тріщин, таблетки зважують з точністю до міліграма [131].

Звичайно випробування проводять один раз. Якщо одержані результати викликають сумнів або втрата перевищує 1 %, випробування повторюють ще двічі й обчислюють середнє з трьох вимірів. Якщо немає інших зазначень в окремій статті, втрата в масі має бути не більше 1 % від сумарної маси випробовуваних таблеток [131].

Стираність виражають втратою в масі, обчисленою у відсотках від вихідної маси випробовуваних таблеток. Необхідно зазначати число таблеток, взятих для випробування [131].

7. Стійкість таблеток до роздавлювання

Випробування дозволяє визначити стійкість таблеток до роздавлювання за певних умов шляхом вимірювання сили, необхідної для руйнування таблеток [131].

Прилад являє собою два розташовані один проти одного затискачі, один із яких може перемішуватися в напрямку до другого. Площини поверхонь затискачів перпендикулярні напрямку прямивання. Здавлюючі поверхні затискачів мають бути плоскими і перевищувати за розміром зону контакту з таблеткою. Прилад калібрують із використанням системи, що забезпечує точність І Н (Ньютон) [131].

Методика. Таблетку поміщають між затискачами, беручи до уваги її форму, а також розділовальну лінію і напис, якщо вони є. Для всіх вимірів таблетка має бути орієнтованою однаково стосовно напрямку сили, що прикладається. Виміри проводять для 10 таблеток. Перед кожним виміром ретельно видаляють усі фрагменти попередньої таблетки. Як результат, необхідно зазначати середнє, мінімальне і максимальне значення вимірної сили в ньютонах [131].

8. Контроль залишкового вологовмісту в препараті

Визначення проводять на галогеновому аналізаторі вологи.

Методика. Нагрів здійснюється за допомогою інфрачервоного випромінювання при впливі безпосередньо на досліджувану пробу. За допомогою клавіатури виставляють на дисплеї необхідну температуру визначення. Зважують наважку грануляту, маси в кількості $(1,000 \pm 0,005)$ г і закривають кришку з нагрівальним елементом вологовимірювача, автоматично переводячи пристрій в робочий режим.

Процес проводиться методом висушування наважки до постійної маси, при цьому на дисплеї фіксується значення вологості (%).

Про закінчення визначення прилад інформує автоматично за допомогою звукового сигналу.

Середнє значення з трьох визначень фіксується в лабораторному журналі і протоколі серії [131].

9. Контроль геометричної відповідності таблеток

Контроль геометричних параметрів таблеток проводять за допомогою штангенциркуля.

Від кожної серії готової продукції відбирають 20 таблеток і визначають геометричні розміри (діаметр, висоту) кожної таблетки вимірювальним інструментом (штангенциркулем) з ціною поділки не більше 0,05 мм.

Таблетку затискають між вимірювальними площинами штангенциркуля і знімають показання в міліметрах по великій шкалі проти нульової риски малої (рухомої) шкали. Відлік десятих і сотих часток міліметра здійснюється по малій шкалі при збігу верхньої і нижньої рисок обох шкал [137].

10. Визначення розміру часток порошків методом мікроскопії

Відповідну кількість порошку (наприклад, від 10 мг 100 мг) суспендують у 10 мл підходящої рідини, у якій порошок не розчиняється, додаючи, якщо необхідно, речовину, що покращує змочуваність часток порошку. Порцію гомогенної суспензії поміщають у підходящу лічильну чашку і переглядають під мікроскопом площу, відповідну не менше 10 мкг випробовуваного порошку. Підраховують усі частки, які мають розмір, що виходять за межі зазначеного інтервалу. Допустима кількість часток, що виходить за межі інтервалу, зазначають в окремій статті [131].

11. Насипний об'єм

Випробування дозволяє визначити за заданих умов насипний об'єм та насипну густину матеріалу, що складається з твердих часток (наприклад, порошків гранул), до усадки, здатність матеріалу до усадки, а також його об'єм і густину після усадки [131].

Обладнання. Прилад складається з таких частин [131]:

- струшувальний пристрій, що забезпечує 250 ± 15 зіскоків циліндра за хвилину з висоти (3 ± 0.2) мм;
- підставка для градуйованого циліндра, споряджена тримачем, має масу (450 ± 5) г;
- градуйований циліндр місткістю 250 мл (ціна поділки - 2 мл); маса циліндра - (220 ± 40) г.

Методика. У сухий циліндр поміщають без ущільнення 100 г випробовуваного матеріалу. Якщо це неможливо, беруть наважку випробовуваного матеріалу, що має насипний об'єм у діапазоні 50 мл - 250 мл; цю наважку зазначають у звіті. Закріплюють циліндр на підставці й фіксують насипний об'єм до усадки V_0 . Проводять 10, 500, 1250 зіскоків циліндра і фіксують об'єми V_{10} , V_{500} , V_{1250} з точністю до найближчої позначки. Якщо різниця між V_{500} і V_{1250} перевищує 2 мл, проводять ще 1250 зіскоків циліндра [131].

Подання результатів [131]:

Об'єми: насипний об'єм - об'єм до усадки: V_0 , мл; об'єм після усадки: V_{250} мл або V_{2500} мл;

Здатність до усадки: різниця об'ємів V_{10} , мл, V_{500} , мл;

Густини: насипна густина – густина до усадки: m/V_0 , г/мл; густина після усадки: m/V_{1250} , г/мл або m/V_{250} , г/мл.

Пакування.

По 8 таблеток в блістерній упаковці з 8 отворами, що виготовлена з ПЕТ (PET), полімірної плівки ПВХ (PVC), полістиролу (PS) та алюмінієвої фольги типу ФОТ або ФПТ (ГОСТ 745-2014) за ТУ 2297-001-84410832-2013 [130].

По 16 таблеток разом з інструкцією з використання вкладають в упаковку за ГОСТ 64–071–89 з картону коробочного (хром-ерзац) за ГОСТ 7933–89 [130].

Групова та транспортна тара відповідно до ГОСТ 17768–90.

Маркування.

На фольгу за ГОСТ 745-79 українською або російською мовами нанесено: назву препарату, кількість таблеток, номер серії, термін придатності.

На пачці та етикетці групової тари українською та російською мовами нанесено: «Україна», виробник, товарний знак та адресу, назву препарату латинською, українською та російською мовами, лікарську форму, кількість доз, кількість флаконів, «Для застосування перорально», умови зберігання, «Зберігати у недоступному для дітей місці», номер серії, реєстраційний номер, термін придатності, штрих-код, реєстраційний номер в країні імпортерів (за необхідності).

Номер серії та термін придатності допускається наносити на боковій стороні пачки методом тиснення.

На етикетці групової тари додатково вказують кількість упаковок.

Транспортне маркування відповідно до ГОСТ 14192–96.

Примітка. При поставці товару на експорт допускається текст маркування зазначати мовою, оговореною в контракті.

Транспортування.

Транспортування в закритих транспортних засобах всіма видами критого транспорту при температурі від 2 °С до 8 °С відповідно до ГОСТ 17768–90.

Зберігання.

Зберігати у недоступному для дітей місці при температурі не вище 30 °С. [130].

Термін придатності.

2 роки. Для поліпропіленового контейнера: Зберігати не більше 3-х місяців після першого відкриття контейнера [130].

Фармакологічні властивості.

Код АТС. А02В Х13. Лікарські засоби для лікування пептичної виразки та гастроєзофагеальної рефлюксної хвороби (ГЕРХ) [130].

Фармакодинаміка. Після прийому внутрішньо таблетки швидко починають взаємодіяти зі шлунковим соком, утворюючи шар гелю альгінової кислоти на його поверхні, який має близьке до нейтрального значення рН та ефективно покриває стінки шлунка, запобігаючи появі гастроєзофагеального рефлюксу. У тяжких випадках цей шар, розподілений по поверхні вмісту шлунка, піднімається до стравоходу та запобігає його подразненню.

Фармакокінетика. Механізм дії цього лікарського засобу є фізичним та не залежить від абсорбції у системний кровообіг.

Показання до застосування. Лікування симптомів гастроєзофагеальної рефлюксної хвороби, а саме: печії, відрижки кислим, розладів травлення, що відносяться до рефлюксу, у тому числі у період вагітності.

Способи застосування та дози. Лікарський засіб призначений для перорального застосування. Таблетки необхідно ретельно розжовувати.

Дорослі та діти віком від 12 років: по 2 – 4 таблетки після їди та перед сном. Пацієнти літнього віку: для цієї вікової групи коригувати дозу не потрібно.

Клінічні дані щодо застосування дітям віком до 12 років відсутні. Не рекомендовано застосовувати дітям віком до 12 років.

Побічні дії. Побічні реакції наводяться за частотою їх прояву згідно з такою класифікацією: дуже часто (1/10), часто (від 1/100 до <1/10), нечасто (від 1/1000 до <1/100), рідко (від 1/10000 до <1/1000), дуже рідко (<1/10000), частота невідома (неможливо оцінити за наявними даними):

Таблиця 4.2.

Клас системи органів	Частота	Побічні явища
З боку імунної системи	Дуже рідко	Анафілактичні та анафілактоїдні реакції, реакції гіперчутливості, такі як кропив'янка
З боку дихальної системи, органів грудної клітки та середостіння	Дуже рідко	Прояви з боку дихальної системи, такі як бронхоспазм
З боку травного тракту	Частота невідома	Здуття живота, запор

Протипоказання. Цей лікарський засіб протипоказаний пацієнтам з відомою або підозрюваною гіперчутливістю до натрію альгінату, натрію гідрокарбонату та кальцію карбонату або до будь-якої з допоміжних речовин.

Особливості застосування. Вміст натрію у дозі, що дорівнює 4 таблеткам становить 246 мг (10,6 ммоль). Це слід враховувати пацієнтам, яким рекомендовано дотримуватися низькосольової дієти, наприклад, у деяких випадках застійної серцевої недостатності та ниркової недостатності.

Доза, що дорівнює 4 таблеткам містить 320 мг (3,2 ммоль) кальцію карбонату. Слід дотримуватися обережності при лікуванні пацієнтів з гіперкальціємією, нефрокальцинозом та рецидивуючим утворенням у нирках каменів, які містять кальцій.

Оскільки препарат містить аспартам (Е 951), його не можна призначати хворим на фенілкетонурію.

У разі відсутності покращення симптоматики через 7 днів лікування, клінічна ситуація потребує перегляду.

Застосування у період вагітності або годування груддю. Клінічні дослідження за участю більш ніж 500 вагітних жінок, а також великий обсяг даних постмаркетингового досвіду застосування вказують на відсутність токсичного впливу діючих речовин на плід або новонародженого, а також на відсутність їх здатності спричиняти уроджені вади розвитку. Гавіскон® м'ятні таблетки можна застосовувати у період вагітності за наявності клінічної необхідності.

Годування груддю. Дослідження показали відсутність впливу на новонароджених/немовлят, яких годують груддю жінки, що застосовували цей лікарський засіб. Гавіскон таблетки можна застосовувати у період годування груддю.

Фертильність. Клінічний досвід продемонстрував, що при застосуванні терапевтичних доз не очікується впливу на фертильність людини. Здатність впливати на швидкість реакції при керуванні автотранспортом або іншими

механізмами. Препарат не впливає або має несуттєвий вплив на здатність керувати автотранспортом та працювати з іншими механізмами.

Взаємодія з іншими лікарськими засобами. Між прийомом препарату Гавіскон таблетки та інших лікарських засобів, особливо тетрациклінів, дигоксину, фторхінолону, солей заліза, кетоконазолу, нейролептиків, тиреоїдних гормонів, пеніциламіну, бета-блокаторів (атенолол, метопролол, пропранолол), глюкокортикоїдів, хлорохіну, естрамустину та біфосфонатів, має пройти не менше 2 годин.

Вплив на здатність управляти автотранспортом. Не впливає [130].

Умови зберігання. Зберігати в оригінальній упаковці при температурі не вище 30 °С в недоступному для дітей місці [130].

Строк придатності. 2 роки [130].

Умови відпуску. Без рецепта [130].

Упаковка. По 8 жувальних таблеток у блістері, по 2 або 3 блістери у картонній коробці. По 16 жувальних таблеток у поліпропіленовому контейнері. [130].

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

Вводні дані для виробництва Гавіскону наступні: вміст альгінату в 1 таблетці – 250 мг, прийом – після їжі та перед сном (4 рази в день) по 2-4 таблетки за прийом, період прийому – 7 діб, не рекомендується вживати дітям до 12 років.

Як зазначалося вище, в Україні поширеність ГЕРХ серед населення досягає близько 30 %. Ця кількість варіюється від регіону. Станом на 1 вересня 2020 року у Київській області проживало 1,781 млн людей. З них, близько 400 тисяч – діти до 12 років. Тобто дорослі та діти старше 12 років складають близько 1,381 млн. Прийmemo, що 25 % цієї області хворіють на ГЕРХ. Це близько 345,25 тисяч людей.

Одна людина лікується протягом 7 днів. Щодня за показанням таблетки необхідно приймати 4 рази на день. За 1 прийом необхідно спожити 2-4

таблетки. За розрахунками приймемо, що 1 людина споживає 3 таблетки за 1 прийом. В 1 таблетці знаходиться 250 мг альгілату. Отже, необхідна кількість таблеток становить:

$$7 \times 4 \times 3 \times 345250 = 29\,001\,000 \text{ шт. табл.}$$

Враховуючи те, що у коробці знаходиться 16 таблеток, кількість упаковок становить:

$$\frac{29\,001\,000}{16} = 1\,812\,563 \text{ упаковок}$$

Оскільки за одну серію одержується близько 6070 упаковок, то кількість серій на рік становить:

$$\frac{1\,812\,563}{6070} = 298 \text{ серій}$$

4.2. Розрахунок потреби у субстанції для випуску ЛЗ

4.2.1. Перелік виробників кінцевого продукту і виробників субстанції.

Для визначення потреби у власному виробництві альгілату необхідно зазначити ймовірних виробників цієї субстанції та оцінити ринок цього препарату для подальшого підбору потужності виробництва. В таблиці 4.3 наведений перелік виробників альгілату на ринку України.

Таблиця 4.3.

Перелік виробників альгілату

Виробник	Ціна за 1 кг (грн)	Джерело
Weifang, Китай	450	1
Agnex, Польща	1195	2
ААА, Китай	344	3
Россия-СИП, Росія	350	4
Gradeis, Китай	-	5
Hangzhou Yeostar Biotech Co., Китай	138	6
FIC, Китай	275	7

Примітка (ціни наведено станом на 01.06.2021): 1 - <https://prom.ua/p913705445-alginat-natriya.html?>, 2 - <https://prom.ua/p1316037681-alginat-natriya-401.html?>, 3 - <https://prom.ua/p1026292906-alginat-natriya-pischevoj.html?&primelead=MC41Nw>, 4 - <https://prom.ua/p1130428235-alginat-natriya-sol.html?>, 5 - <http://ua.ziofoodadditives.com/thickeners/sodium-alginate/pharma-grade-sodium-alginate-cas-9005-38-3.html>, 6 - <https://russian.alibaba.com/product-detail/sodium-sodium-alginate-cas9005-38-3-sodium-alginate-for-food-medcine-textile-1600148503323.html>, 7 - <https://russian.alibaba.com/product-detail/supply-bulk-sodium-alginate-c6h7o8na-n-62422041838.html>

Як видно з табл. 4.3., основним виробником альгілату є Китай. Дана речовина в Україні не виробляється, а лише фасується. Тож, робимо висновок, що на вітчизняному ринку є лише імпортований необхідний продукт, а власне виробництво – відсутнє.

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

Для лікування ГЕРХ найчастіше прописують Гавіскон. В залежності від форми випуску, кількість альгілату в складі варіюється. Даний препарат випускають у вигляді таблеток та суспензії. Найчастіше даний препарат прописують у таблетках, тому доречно обрати подальший розрахунок саме за цією формою випуску.

Отже, необхідна кількість альгілату 1 людині за весь період лікування становить:

$$7 \times 4 \times 3 \times 250 = 21\,000 \text{ мг} = 21 \text{ г альгілату}$$

Необхідна кількість альгілату для дорослого населення Київської області становить:

$$21 \times 345250 = 7\,250\,250 \text{ г} = 7250,25 \text{ кг}$$

Узагальнюючі дані представлено в табл. 4.4.

Річна потреба в альгінаті

Цільовий продукт	Кількість альгінату в 1 таблетці, мг	Населення Київської області, що хворіє, тис.	Особливості прийому	Необхідна кількість алгінату за період лікування на 1 людину, г	Річна потреба в альгінаті, кг
Альгінат	250	345,25	7 днів, 4 рази в день, 3 таблетки за прийом	21	7250,25

Річна потреба в альгінаті була зазначена раніше і становить 7250,25 кг. За даними статті утворюється близько 8,2 г/л екзополісахариду.

Кількість культуральної рідини необхідної для отримання 7250,25 кг альгінату становить:

$$\frac{7250,25}{8,2} = 884,2 \text{ м}^3$$

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

$$V_{\text{кр}} = \frac{884,2}{1 - 0,3} \approx 1263,15 \text{ м}^3$$

Приймаємо, що для отримання 1263,15 м³ культуральної рідини необхідно 300 робочих трудоднів (Т_{рд}). Відповідно кількість культуральної рідини на добу (V_д) становитиме:

$$V_{\text{д}} = V_{\text{кр}} / T_{\text{рд}} = 1263,15 / 300 \approx 4,2 \text{ м}^3$$

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

$$V_{\text{крц}} = K_1 \cdot V_{\text{д}} \cdot T_{\text{цф}} / 24 = 1,1 \cdot 4,2 \cdot 29 / 24 \approx 5,6 \text{ м}^3,$$

де T_{цф} - цикл роботи ферментера, який включає: мийку та огляд – 1,5 год, перевірку на герметичність – 0,5 год, підігрів та стерилізацію апарату – 1,5 год, охолодження ферментеру – 1 год, завантаження поживного середовища – 1,5 год, засів культурою – 0,5 год, ферментацію – 22 год, та вивантаження – 0,5 год, і становить 29 години. K₁– коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій (K₁ = 1,1).

Геометричний об'єм ферментера для отримання 5,6 м³ культуральної рідини, з коефіцієнтом заповнення 0,6 має становити:

$$V_r = V_{\text{цк}}/K_{\text{зап}} = 5,6/0,6 \approx 9,4 \text{ м}^3,$$

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

Отже, вибираємо стандартний ферментер об'ємом $V_{\text{ф}} = 10 \text{ м}^3$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зф}} = V_{\text{цк}}/V_{\text{ф}} = 5,6/10 = 0,56$$

За виробничий цикл отримують $V_{\text{кр}} = 5,6 \text{ м}^3$ культуральної рідини.

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

$$V_{\text{роб.1}} = V_{\text{кр}}/(1-E_{\text{ф}}) = 5,6/(1-0,1) = 6,2 \text{ м}^3,$$

де $E_{\text{ф}}$ – втрати культуральної рідини під час біосинтезу.

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері з робочим об'ємом $V_{\text{роб.1}} = 6,2 \text{ м}^3$.

При вибраному коефіцієнті заповнення $K_{\text{зап}} = 0,6$ можливий геометричний об'єм ферментера $V_{\text{ф.1}} = 6,2/0,6 = 10,3 \text{ м}^3$. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{сф}} = 10 \text{ м}^3$ та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап.1}} = V_{\text{роб.1}}/V_{\text{сф}} = 6,2/10 \approx 0,62$$

Уточнений коефіцієнт дозволяється для ферментерів з аерацією.

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

$$V_{\text{пс1}} = V_{\text{роб.1}}/(1+X_{\text{ф}}) = 6,2/(1+0,1) \approx 5,6 \text{ м}^3$$

де $X_{\text{ф}}$ – доза посівного матеріалу для ферментера.

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить:

$$V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб.1}} - V_{\text{пс1}} = 6,2 - 5,6 = 0,6 \text{ м}^3$$

Для одержання 0,6 м³ інокуляту в інокуляторі враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря (10 %). Тоді

кількість поживного середовища та посівного матеріалу в інокуляторі становить:

$$V_{\text{роб.2}} = V_{\text{пм1}} / (1 - E_{\text{ф}}) = 0,6 / (1 - 0,1) \approx 0,66 \text{ м}^3$$

Можливий геометричний об'єм інокулятора $V_{\text{ін}} = 0,66 / 0,6 \approx 1,1 \text{ м}^3$.
Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний посівний апарат $V_{\text{сін}} = 1 \text{ м}^3$ та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап.2}} = V_{\text{роб.2}} / V_{\text{сін}} = 0,66 / 1 = 0,66$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у дозволених межах.

Кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{пс2}} = V_{\text{роб.2}} / (1 + X_{\text{ін}}) = 0,66 / (1 + 0,1) \approx 0,6 \text{ м}^3$$

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пс2}} = 0,66 - 0,6 = 0,06 \text{ м}^3 \text{ або } 60 \text{ л}$$

Для одержання 60 л інокуляту в інокуляторі враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря (10 %). Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу в інокуляторі становить:

$$V_{\text{роб.3}} = V_{\text{пм2}} / (1 - E_{\text{ф}}) = 60 / (1 - 0,1) \approx 66 \text{ л}$$

Можливий геометричний об'єм інокулятора $V_{\text{ін}} = 66 / 0,6 \approx 110 \text{ л}$.
Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний посівний апарат $V_{\text{сін}} = 100 \text{ л}$ та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап.3}} = V_{\text{роб.3}} / V_{\text{сін}} = 66 / 100 = 0,66$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у дозволених межах.

Кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{пс3}} = V_{\text{роб.3}} / (1 + X_{\text{ін}}) = 66 / (1 + 0,1) \approx 60 \text{ л}$$

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{\text{пм3}} = V_{\text{роб.3}} - V_{\text{пс3}} = 66 - 60 = 6 \text{ л}$$

Для одержання 6 л інокуляту в посівному апараті враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря (10 %). Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу в інокуляторі становить:

$$V_{\text{роб.4}} = V_{\text{пм3}} / (1 - E_{\text{ф}}) = 6 / (1 - 0,1) \approx 6,6 \text{ л}$$

Можливий геометричний об'єм інокулятору $V_{\text{ін}} = 6,6 / 0,6 \approx 110 \text{ л}$.
Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний посівний апарат $V_{\text{сін}} = 10 \text{ л}$ та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап.4}} = V_{\text{роб.4}} / V_{\text{сін}} = 6,6 / 10 = 0,66$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у дозволених межах.

Кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{пс4}} = V_{\text{роб.4}} / (1 + X_{\text{ін}}) = 6,6 / (1 + 0,1) \approx 6 \text{ л}$$

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{\text{пм4}} = V_{\text{роб.4}} - V_{\text{пс4}} = 6,6 - 6 = 0,6 \text{ л}$$

0,6 л посівного матеріалу ми можемо отримати використовуючи колби об'ємом 750 мл та коефіцієнтом заповнення $K_{\text{зк}} = 0,2$. Кількість колб становитиме:

$$N_{\text{колб}} = V_{\text{пм2}} / (V_{\text{колб}} \times K_{\text{зап}}) = 600 / (750 \times 0,2) = 4 \text{ шт.}$$

Таким чином, для одержання посівного матеріалу необхідно 6 колб.

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого культивування у ферментері об'ємом 10 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,6 буде проходити у 4 етапи.

РОЗДІЛ 5

ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ АЛЬГІНАТУ ТА ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА ЛЗ

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

Бактерії роду *Pseudomonas* виробляє принаймні три різні типи EPS як основні компоненти своєї матриці біоплівки: альгінат, PEL та полісахариди PSL. До комерційних біологічних агентів екзополісахаридів відносять *P. aeruginosa*, які одразу можуть продукувати усі 3 види ЕПС. Однак незрозуміло, як штами цих бактерій регулюють продукцію всіх цих різних екзополісахаридів [138].

Альгінат цього виду бактерій є повторюваним полімером залишків β -D-маннуронату та α -L-гулурунату і є найбільш інтенсивно вивченим екзополісахаридом *P. aeruginosa*. В'язке покриття альгінатів екзополісахаридів відіграє певну роль у стійкості бактерій до антибіотиків, а також уникає захисних механізмів господаря. Хоча альгінат не є важливим для утворення біоплівки немуючими штамми, він впливає на структуру та властивості стійкості біоплівки, утвореної мукоючими штамми. У немуючих штаммах PSL та PEL є двома ключовими екзополісахаридами, які, як відомо, підтримують структуру біоплівки [138].

PEL – багатий глюкозою екзополісахарид, який необхідний для утворення пелікул на межі повітря-середовища або зрілих біоплівок, пов'язаних із твердою поверхнею. Нещодавно дослідження показали, що PEL може виконувати структурну та захисну роль у матриці біоплівки [138].

Екзополісахарид PSL – це повторюваний пентасахарид, що містить D-маннозу, D-глюкозу та L-рамнозу. Цей екзополісахарид є важливим компонентом матриці, який необхідний для формування біоплівки немуккоїдного, а також муккоїдного *P. aeruginosa*. Останні дослідження показали, що PSL також впливає на стійкість до антибіотиків біоплівки *P. aeruginosa* [138].

Вважається, що важливим геном для біологічних агентів роду *Pseudomonas* є AlgC, який кодує ключовий фермент. Даний фермент дозволяє отримати усі можливі види ЕПС псевдомонад. Схему отримання ЕПС показано на рис. 5.1 [138].

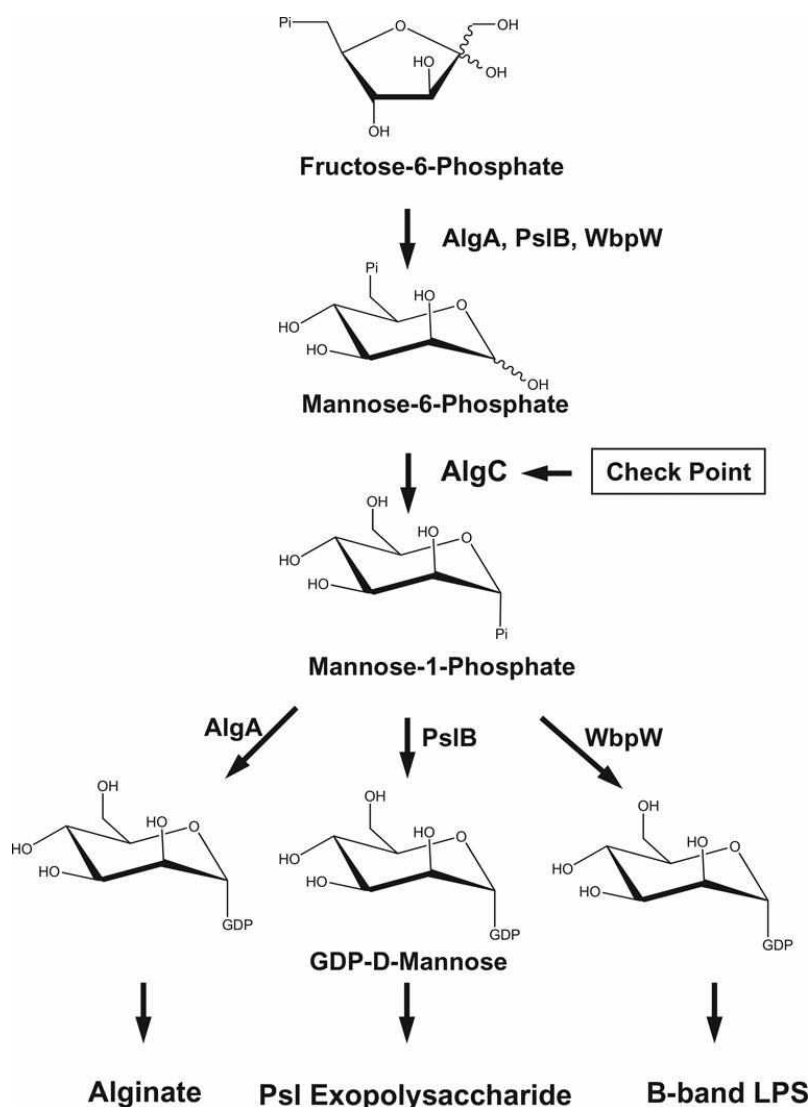


Рис.5.1. Схема отримання ЕПС бактерій роду *Pseudomonas* [138]

Як вже було зазначено вище, псевдомонади синтезують альгінат, який є необхідним при лікуванні ГЕРХ. Тому доречно розглянути різні біологічні

агенти роду *Pseudomonas*, які утворюють цей ЕПС. Порівняння представлено в табл.5.1.

Таблиця 5.1.

Порівняльна характеристика різних біологічних агентів – продуцентів альгінату

Біологічний агент	Склад поживного середовища, г/л	Режим культивування	Концентрація ЕПС, г/л	Література
<i>P. fluorescens</i> SBW25 mucA	Триптон - 10 Дріжджовий екстракт - 5 NaCl – 5 Протеаза – 0,005	48 год 30 °C 225 об/хв pH=7	3	[139]
<i>P. corrugata</i> CFBP 5454	М'ясний екстракт – 1 Дріжджовий екстракт – 2 Пептон – 5 NaCl – 5	40 год, 28 °C pH=7	1,2	[140]
<i>P. mendocina</i> CCT	Глюкоза - 20 Лимона кислота - 0,4 Дріжджовий екстракт - 0,05 (NH ₄) ₂ SO ₄ - 0,7 CaCl ₂ - 0,15 MgCl ₂ ×6H ₂ O - 0,1 Розчин мікроелементів (мг/л): MnSO ₄ ×4H ₂ O - 0,86 ZnSO ₄ ×7H ₂ O - 0,2 CoSO ₄ ×7H ₂ O - 0,28 CuSO ₄ ×5H ₂ O - 0,25 FeSO ₄ ×7H ₂ O - 3,6	22 год, 29 °C 550 об/хв pH=7	8,2	[141]

Як видно з табл. 4.1. найбільшу синтезувальну здатність має *P. mendocina* CCT, але продуцент культивується на багатоконпонентному середовищі, що впливає на вартість поживного середовища, а також на вартість цільового продукту. Тому доречно провести порівняння вартості поживних середовищ, а також порівняти умовну вартість 1 г ЕПС. Розрахунок компонентів та вартість поживного середовища продемонстровано в табл. 5.2.

**Розрахунок та порівняння вартості поживних середовищ для культивування
біологічних агентів**

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації
<i>P. fluorescens</i> SBW25 mscA	Триптон - 10	850	8,5	1
	Дріжджовий екстракт - 5	1100	5,5	2
	NaCl – 5	4,80	0,02	3
	Протеаза – 0,005	560	0,01	4
	Вартість 1 л середовища –14,03 грн			
<i>P. corrugata</i> CFBP 5454	М'ясний екстракт – 1	5223	5,2	5
	Дріжджовий екстракт – 2	1100	2,2	2
	Пептон – 5	850	4,25	1
	NaCl – 5	4,80	0,02	4
	Вартість 1 л середовища – 11,67 грн			
<i>P. mendocina</i> CCT	Глюкоза - 20,	60	1,2	6
	лимона кислота - 0,4	56	0,02	7
	Дріжджовий екстракт - 0,05	1100	0,06	2
	(NH ₄) ₂ SO ₄ - 0,7,	48	0,03	8
	CaCl ₂ - 0,15	40	0,01	9
	MnSO ₄ 4H ₂ O - 0,0009,	60	0,00006	10
	ZnSO ₄ 7H ₂ O - 0,0002,	75	0,00002	11
	CoSO ₄ 7H ₂ O - 0,0003,	810	0,00024	12
	CuSO ₄ 5H ₂ O - 0,0003	189	0,00006	13
	FeSO ₄ 7H ₂ O – 0,004	25	0,0001	14

Узагальнююча характеристика

Табл. 5.3. демонструє, що найкращим продуцентом альгінату є *P. mendocina* ССТ, який за найменший час культивує найбільшу кількість ЕПС, а також має найнижчу собівартість поживного середовища та цільового продукту. Тому, для подальшого вибору умов культивування обираємо саме цей продуцент.

5.2. Обґрунтування вибору способу культивування і типу ферментера

P. mendocina ССТ – це аеробна бактерія, яка для свого розвитку потребує кисень. Тому, обов'язковою умовою культивування є передбачення у конструкції ферментеру барботеру, що буде забезпечувати продування повітря. Ступенева аерація 1,0 об/хв створить необхідні умови для культивування. Для забезпечення диспергування кисню в усьому об'ємі середовища та для інтенсифікації масообміну ферментер треба оснастити мішалкою [142].

ЕПС в процесі синтезу підвищує в'язкість поживного середовища, чим ускладнює підбір мішального пристрою, адже звичайна лопатева мішалка не зможе забезпечити необхідних умов культивування. Культура потребує дуже інтенсивного масообміну, тому технологічним рішенням є використання турбінної мішалки, яка може забезпечити оптимальне культивування, ретельне перемішування (в статті зазначено 550 об/хв) та інтенсифікацію масообмінного процесу [141, 143].

Як спосіб культивування доречно обрати саме глибинний метод. Це пов'язано з локалізацією та концентрацією цільового продукту. Також, слід вказати переваги глибинного методу проти поверхневого, а саме отримання більш високої концентрації біомаси, що пропорційна кількості екзополісахариду.

Максимальна кількість цільового продукту синтезується на стаціонарній фазі, що призводить до вибору періодичного способу культивування. Це

пояснюється тим, що постійне оновлення поживного середовища призведе до різкого спаду синтезу ЕПС, оскільки велика концентрація бактерій дуже швидко буде споживати субстрат та не виділяти необхідну речовину.

Тож, використання безперервного способу є недоцільним, оскільки підтримувати бактерії в експоненційній фазі росту – непотрібно. При такому способі буде накопичуватись біомаса продуцента, а альгінат не буде виділятися, оскільки фаза росту не відповідає її точки синтезу.

P. mendocina - це мезофільна бактерія, яка росте при 25 – 42 °С. Для синтезу альгінату в статті зазначена температура 29 °С, що відповідає оптимальній температурі росту та розвитку біологічного агента [141,144].

Отже, для виробничого біосинтезу альгінату бактеріями *P. mendocina* ССТ використовують глибинний метод культивування періодичним способом, при постійній аерації та регулюванням обертів турбінної мішалки. Процес культивування відбувається в асептичних умовах, адже температура культивування підходить для більшості контамінуючих мікроорганізмів, що можуть сповільнити або ж зовсім зупинити виробничий біосинтез.

Оптимальні умови культивування наступні: рН = 7, тривалість - 22 години, температура культивування - 29 °С, кількість обертів - 550 об/хв, продування киснем.

Культивування *P. mendocina* ССТ відбувається на двох середовищах. Середовище № 1 використовується для накопичення біомаси, та має наступний склад (г/л):

Глюкоза – 20,0;

Пептон – 5,0;

Дріжджовий екстракт – 3,0;

NaCl – 5,0.

Середовище № 2 використовується для отримання ЕПС та має наступний склад:

Глюкоза – 20;

Лимона кислота - 0,4;

Дріжджовий екстракт - 0,05;

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 0,7;

CaCl_2 - 0,15;

Розчин мікроелементів (мг/л)

$\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$ - 0,86;

$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,2;

$\text{CoSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,28;

$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ - 0,25;

$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 3,6;

Поживні середовища попередньо стерилізують. Для цього, компоненти розбиваються на композиції, оскільки мають різний температурний режим та/або небажані реакції, такі як випадання в осад нерозчинних солей.

Для накопичення біомаси використовуються середовище № 1. Дане поживне середовище буде готуватись для інокулятора на 10 л, 100 та 1000 л. Принцип поділу на композиції буде залишатися незмінним, але компоненти будуть збільшуватись в 10 раз на кожній стадії. Склад композицій середовища № 1 наступний:

Композиція А: глюкоза, пептон, дріжджовий екстракт. Режим стерилізації – 112 °С, 0,05 МПа протягом 30 хв.

Композиція Б: NaCl . Режим стерилізації – 131 °С, 0,15 МПа протягом 40 хв.

Для виробничого біосинтезу використовується середовище №2 та має наступний поділ на композиції:

Композиція А: глюкоза, дріжджовий екстракт, лимонна кислота. Режим стерилізації – 112 °С, 0,05 МПа протягом 30 хв.

Композиція Б: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, CaCl_2 , розчин мікроелементів. Режим стерилізації – 131 °С, 0,15 МПа протягом 40 хв.

5.3. Обґрунтування стадій виділення і очищення альгінату для виробництва ЛЗ

Альгінат – це екзополісахарид, який представляє із себе слиз на поверхні бактеріальної клітини. Ця особливість дозволяє не застосовувати дезінтеграцію клітин, а одразу відділяти цільовий продукт від біомаси.

Оскільки альгінат буде використовуватись у складі фармацевтичного препарату, то для виконання вимог для таких субстанцій необхідно розробити ефективну схему очистки. Слід звернути увагу на доволі поширену схему очистки екзополісахаридів. Така схема зображена на рисунку 5.2 [145].

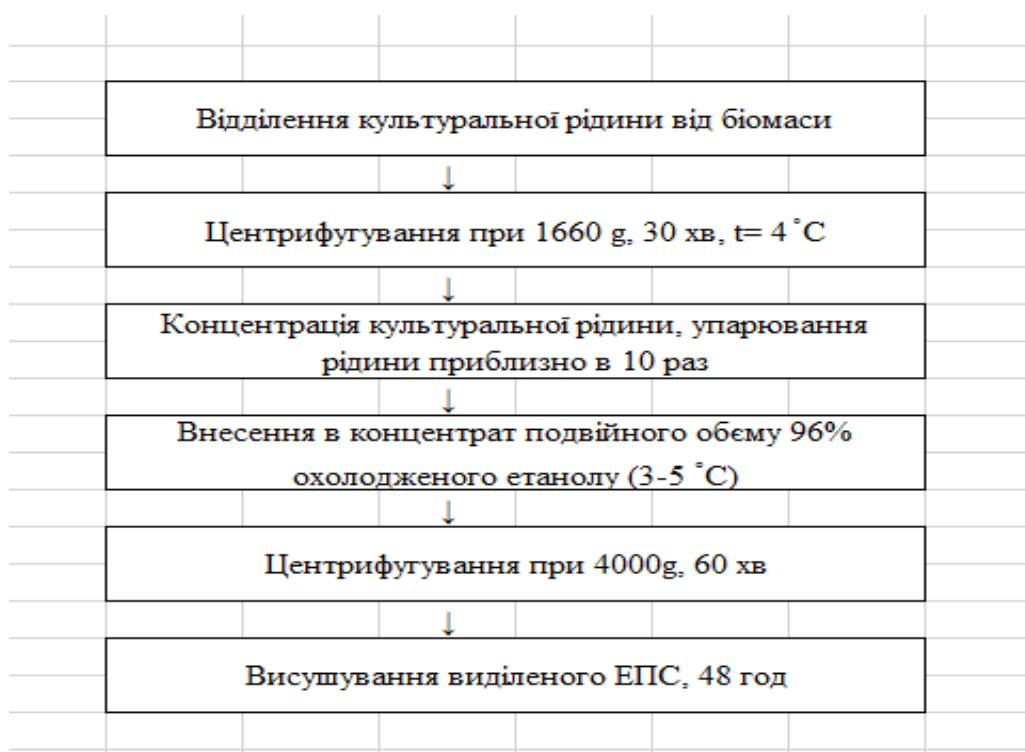


Рис 5.2. Загальна схема виділення та очищення екзополісахаридів

Така схема є доволі простою та дозволяє отримати цільовий продукт без великих втрат. Але, при використанні такої технології залишається певна кількість білків (>5 %), що може напряму впливати як на якість так і на ефективність субстанції [145].

Наступна схема виділення є більш дорожчою, адже передбачає використання різних розчинників (етанол, дистильована вода), що здорожчує саму технологію. А також в схемі збільшено кількість технологічних процесів, які також не здешевлюють цільовий продукт. Схему наведено на рис. 5.2 [146].

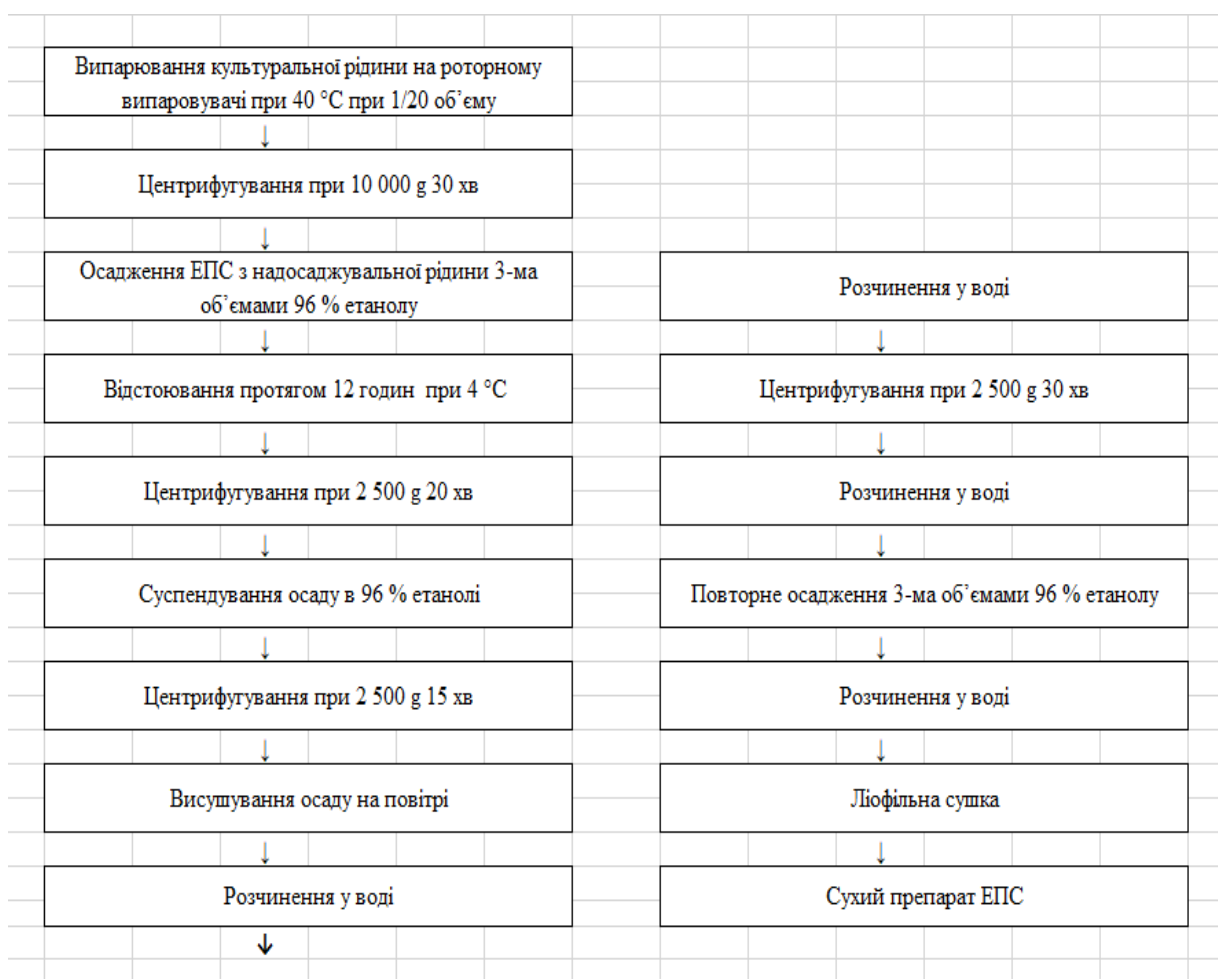


Рис. 5.3. Схема виділення та очищення екзополісахаридів

Незважаючи на вартість даної технології, на виході утворюється чистий порошок лікарської субстанції без вмісту білків, нуклеїнових кислот та клітин продуценту [146].

Також, існує ще одна схема виділення та очищення альгінату, яка можлива для використання при отриманні лікарської субстанції. Для виділення альгінату біомасу штаму-продуцента змішують з розчином 50 мМ ЕДТА в 0,9 % NaCl і ретельно перемішують, після чого проводять центрифугування при 15000 об/хв за 30 хв. Осад відокремлюють і промивають водою. Потім до нього додають 3-кратний обсяг 96% етилового спирту. Осад знову відокремлюють і промивають водою. Після цього проводять очистку отриманого альгінату. Для цього альгінат знову осаджують 3-кратним об'ємом 96 % етилового спирту і проводять діаліз проти 0.5% NaCl протягом 24 годин. Осад знову

відокремлюють і висушують за допомогою ліофільної сушки. Отриманий порошок зберігають при 4 °С не більше 3-х місяців [147].

Закордоном використовується трохи модифікована технологія. Відділяють культуральну рідину від біомаси, після чого центрифугують при 15000 об/хв за 30 хв. Після чого, отриманий осад розчиняють у воді та інтенсивно струшують у суміші хлороформ/бутанол (об'єм 4:1). Процедуру повторюють тричі, і кінцеву суміш центрифугують при 3000 об/хв протягом 20 хв, а органічну фазу викидають. На розчин альгілату діють лугом (рН 8). Додають 10% Na_2CO_3 і альгілат осаджується з цього розчину за допомогою етанолу. Отриману тверду фазу спочатку зберігають при -4 °С протягом ночі, а потім заморожують при -40 °С протягом 72 годин для усунення розчинника. Після чого, альгілат діалізують для усунення солей та домішок, для цього розчин вводять в целюлозну мембрану та діалізують протягом 7 днів, після чого сушать заморожуванням протягом 72 год [148].

Також, використовують різні модифікації методу Лі очистки полісахаридів. Одну з таких схем наведено далі. Культуральну рідину двічі розбавляють дистильованою водою і центрифугують. Зв'язаний з клітинами альгілат видаляють за допомогою 0,25 н. NaOH протягом 2–3 год і змішують з надосадовою рідиною. Отриманий супернатант змішують з двома об'ємами абсолютного етанолу і витримують протягом ночі при 4 °С. Осад збирають, промивають етанолом і сушать у вакуумній сушарці. Після цього висушену фракцію розчиняють у дистильованій воді та осаджують 10 % цетилтриметиламоній бромідом. Цю суміш залишають на ніч при 37 °С. Осад збирають, промивають дистильованою водою, повторно розчиняють у 0,5 М NaCl і знову осаджують з рівним об'ємом етанолу. Осад збирають, промивають 70 % етанолом і розчиняють у 0,25 М розчині NaCl . Осад знову осаджують етанолом, збирають центрифугуванням і розчиняють у дистильованій воді. Фракцію діалізують проти дистильованої води при 4 °С протягом 2 днів і ліофілізують [149].

Тож, будемо спиратися на загальну схему виділення та очищення альгілату, що продемонстровано на рис. 5.2, оскільки за такого методу досягається максимальна очистка цільового продукту, без великого застосування специфічного обладнання, яке також буде збільшувати ціну полісахариду. Загальна технологія виглядає наступним чином:

- Попередня обробка культуральної рідини
- Відокремлення культуральної рідини від біомаси
- Випарювання
- Осадження екзополісахариду
- Висушування

Обґрунтування попередньої обробки культуральної рідини

Попередня обробка культуральної рідини необхідна для зменшення в'язкості, оскільки, як вище було згадано, альгілат представляє із себе слиз, який загущує поживне середовище в процесі біосинтезу. Як було згадано раніше, у технологіях, як попередня обробка, використовувались висушування, розбавлення дистильованою водою та застосування 50 мМ ЕДТА в 0,9% NaCl.

Висушування можна використовувати у випадку, коли об'єм культуральної рідини завеликий, а в'язкість замала (або відсутня). Для нашого цільового продукту даний метод не підходить, адже поживне середовище мало в своєму складі загущувачі (наприклад, дріжджовий екстракт), а також властивості самого полісахариду, дану методику краще не використовувати. Також, при такій обробці вже буде певна кількість втрат цільового продукту, що є небажаною умовою [146].

Розбавляння дистильованою водою є доволі дороговартісним методом, оскільки об'єм отриманої культуральної рідини становить 6,2 м³, а виробництво цього розчиннику потребує додаткового спеціалізованого обладнання та витрат на енергію. Тому, такий спосіб не підходить для промислового використання, а лише для лабораторного. Але, зважаючи на те, що кінцевий продукт буде використовуватись в таблетках (нестерильні ЛЗ), то у промислових масштабах можна застосовувати питну воду, що здешевлює дану технологію.

Використання розчину 50 мМ ЕДТА в 0,9% NaCl звісно призводить до гарної очистки цільового продукту, але й збільшує витрати на реагенти та може призвести до більшої втрати екзополісахариду.

Тому, найкращим варіантом для обробки слід обрати розбавлення питною водою.

Обґрунтування відділення культуральної рідини від біомаси

Для відокремлення біомаси клітин від культуральної рідини використовують різні методи [151]:

- фільтрацію – пропускання суспензії через фільтруючий матеріал, на якому затримуються частинки твердої фази – біомаса;
- осадження (седиментація, відстоювання) – розшарування дисперсних систем під дією гравітаційних сил;
- сепарацію або центрифугування – розподіл неоднорідних систем під дією відцентрових сил;
- мікрофільтрацію – пропускання суспензії через мембрани з дуже малим розміром пор, що забезпечує утримання клітин мікроорганізмів, білкових речовин на мембрані та отримання розчину фільтрату, вільного від колоїдних часток;
- коагуляцію – додавання в суспензію реагентів, що сприяють утворенню і осадження більш великих клітинних агрегатів і відділенню їх від КР шляхом відстоювання;
- флотацію – захоплення біомаси мікроорганізмів бульбашками піни і виділення її з пінної фракції.

Як зазначалося вище, загальновживана технологія екзополісахаридів відокремлення біомаси від культуральної рідини - це центрифугування. Пов'язано це безпосередньо з виходом біомаси біологічного агента, а також із фізико-хімічними властивостями цільового продукту. Тому доречно і надалі застосовувати саме цей метод.

Обґрунтування осаджувальної рідини

Аналізуючи різні технологічні схеми виділення альгінату, очевидне використання 96-% розчину етанолу. При розчиненні у воді альгінати утворюють колоїдні розчини, але є нерозчинними у спирті (і водно-спиртових розчинах із вмістом спирту більше ніж 30 %), органічних розчинниках, кислих середовищах із $\text{pH} < 3$. Тому, саме цю рідину використовують для осадження [150].

Використання інших рідин також дозволяється, але набагато рідше та в лабораторних умовах, оскільки в промислових масштабах інші речовини здорожчують технологію. Також, до переваг використання саме етанолу відноситься і той факт, що його можна регенерувати, чим заощадити кошти.

Обґрунтування сушіння препарату

Термін зберігання сухого альгінату досягає декількох місяців, при зберіганні в сухому прохолодному місці і під час відсутності сонячного світла. При глибокому заморожуванню альгінат можна зберігати кілька років, при цьому не відбувається значного зниження молекулярної маси [152].

У технологічній схемі присутні два моменти випаровування. Один - проміжковий, висушування на повітрі. Інший - висушування готового продукту ліофілізацією. Такий вибір методів сушіння пов'язаний з тим, що альгінати мають гелеутворювальну здатність, і при інших методах сушіння концентрація вологи після висушування може досягати до 20 %, що впливає на термін придатності продукту. Також зважають і на фактор термостійкості. Альгінати не бажано підігрівати до високих температур, адже можлива часткова деполімеризація [153,154].

Наприклад, при конвективному сушінні альгінат розкладають на сухі листи шаром 1,5 - 2 см і поміщають в сушильну шафу. Температура сушіння 45 - 60 °C, час сушіння 8 - 10 годин. При такому методі, вологість альгінату становить 8 - 15% [153].

При ліофільному сушінні показник вологості становить $>5\%$, тому доречно обрати саме цей спосіб сушіння, який не буде впливати на фізико-хімічні властивості цільового продукту.

5.4. Обґрунтування вибору класів чистоти виробничих приміщень виробництва ЛЗ, вибору первинної упаковки

Обґрунтування вибору чистих приміщень

Як лікарська форма обрано таблетки, тобто нестерильний лікарський засіб. Таблетування та виготовлення порошків (їх промивання та сушіння) відбуваються в класі чистоти D. Тому, усі операції будуть відбуватись саме у цьому класі чистоти.

Даний клас також передбачає щотижневий відбір проб повітря. Даний контроль здійснюється для запобігання погіршення показників забруднення лікарських засобів, які виготовляються у певному класі чистоти. Тому, особливо велику увагу приділяють очистці повітря. Даний показник стараються тримати у межах 95-99,9 % чистоти.

Щодо водопідготовки, як було зазначено вище - достатньо використовувати воду питну для всіх операцій, як це передбачено для нестерильних ЛЗ. Вода питна не описана у монографії фармакопеї, але вона має відповідати вимогам щодо якості води, затвердженим компетентним уповноваженим органом. Для підтвердження якості води на виробничій ділянці слід проводити випробування [155].

Обґрунтування вибору миючих та дезінфікуючих засобів

Початкове та заключне промивання обладнання (включаючи СІР) та контейнерів для нестерильних ЛЗ дозволено за допомогою води питної, тому додаткова водопідготовка не потрібна. Але, необхідно підібрати миючі та дезінфікувальні засоби, зважаючи на забруднення та габарити виробництва.

Слід врахувати, що кожні 2-3 місяці необхідно міняти вживані миючі засоби, щоб не виникало резистентності у біологічних агентів, проти яких засоби направлені. Оскільки передбачено виробництво протягом 300 днів, достатнім буде підібрати по 3 мийних та дезінфікуючих засобів.

Аналіз проведено за показником вартості 1 л робочого розчину, а також за ефективністю та іншими перевагами. Порівняльна характеристика різних миючих та дезінфікуючих засобів представлено в таблиці 4.4.

Отже, як видно з таблиці 5.4 з мийних засобів доречно обрати каустичну соду, Ekfil CIP DEZ та Бланидас. З дезінфікуючих – Мікрасепт, SeptPower та Фамідез® Комбі.

Таблиця 5.4

Порівняння різних миючих та дезінфікуючих засобів

Назва мийного/дезінфікувального засобу	Об'єкт миття та/або дезінфекції	Концентрація робочого розчину, %	Вартість 1 л/кг мийного або дезінфікувального засобу, грн	Вартість 1 л робочого розчину, грн	Опис засобу
1	2	3	4	5	6
Каустична сода ¹	Обладнання	1	45	0,45	Їдкий натр, являє собою безбарвну кристалічну речовину. Добре розчиняється у воді. Водні розчини мають лужну реакцію. Гарячі (1-2) % розчини каустичної соди добре обмилюють жири, гідролізують білки, розщеплюють вуглеводи. Засіб належить до високонебезпечних речовин (2 клас небезпеки по ГОСТ 12.1.007). При використанні необхідний спецодяг. Рекомендується використовувати 1-2 % розчини температурою 55 + /- 5 °C для циркуляційного миття технологічного обладнання та комунікацій [156]
Cimclean 50F ²		1	209	2,1	Застосовується для очищення забруднених центрових пристроїв, частин металообробного обладнання та механізмів, виготовлених з чорних металів. Рідина справляється з маслом, брудом і нальотом від води [157]

Продовження табл.5.4

1	2	3	4	5	6
---	---	---	---	---	---

Фамідез® CIP Ac 220 ³	Обладнання	1	89	0,89	Сильнокислотний непінний засіб для видалення комплексних органічних та мінеральних відкладень з поверхні технологічного обладнання з неіржавіючої сталі, алюмінію, полімерних матеріалів (полістирол, поліпропілен, ПВХ) методом циркуляційного миття, розпилення чи замочування. Основні діючі речовини: кислота ортофосфорна 5-15%, кислота гліколева 5-15%. Має низьке піноутворення, хороші мийні властивості, працює у воді будь-якої твердості [158]
Ekfil CIP DEZ ⁴		0,5	29,2	0,15	Володіє високою миючою дією і відбілюючим ефектом, ефективно видаляє стійкі білкові і жирові забруднення. Володіє бактерицидною дією до широкого спектру мікроорганізмів, нейтралізує запахи. Легко змивається з поверхні, не залишає слідів і розводів. Водорозчинний, мало піниться, легко дозується, економічний в застосуванні [159]
Бландас ⁵		0,5	42	0,21	Концентрований миючий засіб з низьким рівнем піноутворення для миття всіх видів поверхонь. Засіб має нейтральний рівень рН. Швидко висихає, добре очищає поверхню від будь-яких забруднень мінімальним дозуванням. Не залишає брудних розводів. Не містить шкідливих речовин [160]

Продовження табл.5.4

1	2	3	4	5	6
Мікрасепт ⁶	Стіни,	0,1	127	0,13	Дезінфікуючий засіб для гігієнічної та

	підлога, вікна, двері				хірургічної обробки рук і шкіри, а також для швидкої дезінфекції поверхонь, некритичних медичних виробів. Містить комплекс догляду за шкірою, захищає шкіру рук від сухості та подразнення, зберігає еластичність і природний водно-жировий баланс шкіри. Має віруліцидну (включаючи гепатит В, С, ВІЛ), бактерицидну, туберкулоцидну, фунгіцидну активність [161]
Бланідас Актив ⁷		0,5	321	1,6	Універсальний безальдегідний нехлорний засіб для знезараження медичних виробів, для дезінфекції і одночасного миття усіх типів поверхонь, для проведення генеральних прибирань. Має миючі властивості. Має бактерицидну, туберкулоцидну, віруліцидну, фунгіцидну, спороцидну дію [162]
Desguard 20 ⁸		2	563	11,3	Високоєфективний концентрований засіб для миття та дезінфекції поверхонь. Знищує бактерії та грибки у зоні обробки харчових продуктів. Засіб володіє одночасно мийними та дезінфікувальними властивостями [162]

Закінчення табл.5.4

1	2	3	4	5	6
---	---	---	---	---	---

SeptPower ⁹	Стіни, підлога, вікна, двері	0,3	65	0,2	Засіб призначений для обробки рук, шкіри і поверхонь. Засіб для зовнішнього застосування! Не застосовувати препарат на ранах, слизових оболонках! Зберігати при температурі від + 5 °С до + 30 °С, подалі від джерел відкритого вогню. Легкозаймистий [163]
Фамідез® Комбі ¹⁰		0,05	552	0,28	Комбінований концентрат з високою миючою здатністю на основі бігуанідину і четвертинної амонієвої. Містить інгібітор корозії, практично без запаху, не має сенсibilізуючої дії [164]

Примітка (ціни наведено станом на 11.09.2021): 1 - <https://prom.ua/p659273745-kausticheskaya-soda-rosiya.html?&primelead=M143Mw>, 2 - <https://wallegro.ru/item/8241961661/BAKTERICIZIDNOE-SREDSTVO-CIMCLEAN-F-UP-L.html>, 3 - <https://prom.ua/p1050652475-famidez-cip-220.html>, 4 - <https://pivden-profit.com.ua/p1171189126-schelochnoe-moyushee-sredstvo.html>, 5 - <https://horeca-service.net/product/blanidas-universalnoe-moyushhee-sredstvo-dlya-vodostojkih-poverhnostej-11/>, 6 - https://profsalon.com.ua/ua/p824951750-mikrasept-dezinfitsiruyushchie-sredstva.html?source=merchant_center&gclid=CjwKCAjwp_GJBhBmEiwALWBQk5lEvXvK_KaL1pLDelt9yh3mbGcYuCA8NsJOrTM_yK3dIDLO_AwIDxoCOjUQAvD_BwE, 7 - https://lysoform.shop/product/blanidas-aktyv-5l/?gclid=CjwKCAjwp_GJBhBmEiwALWBQk0vv6jCPulqw4nK5LwZCiYBl2XSUmsOV_kpgXqIj0EnPYXI-bjSgARoCHi8QAvD_BwE, 8 - https://euromed24.com.ua/p1237273432-desguard-kontsentrovaniy-dezinfikuyuchij.html?source=merchant_center&gclid=CjwKCAjwp_GJBhBmEiwALWBQk29jEqCSVYDsKI2i4FBxbs8I0samLTGTFGvpw4HxxtWCPI05pUDfXxoC9lEQAvD_BwE, 9 - https://sata-group.com.ua/p1367613140-antiseptik-dlya-ruk.html?source=merchant_center&gclid=CjwKCAjwp_GJBhBmEiwALWBQk--8V11wxZ3dSw2BrJMHCEvnSN6iSGsyg1Pf7kF0ew-FUMSWIWdGgxoCZDoQAvD_BwE, 10 - https://hlorka.in.ua/p692317808-famidez-kombi.html?source=merchant_center&gclid=CjwKCAjwp_GJBhBmEiwALWBQk2EnD4426VsRBFBRMKsnaH0lxj-OfFKvSPF_QxAs7KYwPyv3fi8IFhoC5aQQAvD_BwE

Обґрунтування підготовки вентиляційного повітря

Повітря робочих приміщень є потенційним джерелом фармацевтичного забруднення, тому його чистота є одним із ключових питань технічної гігієни. Рівень чистого повітря в приміщенні визначає клас чистоти [165].

Для забезпечення безпильного та стерильного повітря для виробництва використовуються традиційні турбулентні вентиляційні системи, що забезпечують стерильність повітря в приміщеннях, та системи з ламінарним потоком повітря по всьому приміщенню чи певним робочим зонам [165].

При турбулентному потоці очищене повітря містить до 1000 частинок на літр. У разі ламінарної подачі повітря по всьому приміщенню вміст частинок у повітрі зменшується в 100 разів [165].

Приміщення з ламінарним потоком – це приміщення, де повітря подається в робочу зону через фільтр, який займає всю стіну або стелю і видаляється поверхнею, протилежною повітря, що надходить [165].

Існують дві системи: вертикальний ламінарний потік, коли повітря рухається вгору через стелю і виходить через ґратчасту підлогу, і горизонтальний ламінарний потік, коли повітря надходить через одну і виходить через протилежну перфоровану стінку. Ламінарний потік видаляє всі частинки повітря з будь-якого джерела (персонал, обладнання тощо) з приміщення [165].

Ламінарний потік має створюватися в «чистому» приміщенні. Ця система повинна забезпечувати рівномірну швидкість повітря: близько 0,30 м/с для вертикального потоку і 0,45 м/с для горизонтального. Повітря необхідно підготувати і контролювати на наявність механічних включень і мікробного забруднення згідно з нормативними та технічними документами, а також оцінити ефективність повітряних фільтрів [165].

Для забезпечення необхідної чистоти повітря в системах «вертикальний ламінарний потік» і «горизонтальний ламінарний потік» у вітчизняній промисловості використовується система фільтрації, що складається з фільтра

попередньої грубої очистки повітря-вентилятора та стерилізаційного фільтра [165].

Щоб остаточно очистити повітря від частинок і мікроорганізмів, що містяться в повітрі, скористайтесь фільтром типу LKE. В якості фільтруючих матеріалів використовуються ультратонкі волокна перхлоретиленової смоли. Цей матеріал гідрофобний, витримує хімічно агресивні середовища, може працювати при температурах не вище 60 °C і відносній вологості до 100 %. Останнім часом поширеними стали високоефективні повітряні фільтри HEPA [165].

Переважає більшість продуцентів ферментів являються аеробами, і для їх нормального розвитку в процесі культивування необхідно подавати в достатній кількості стерильне повітря. Фільтрування повітря через волокна або фільтрувальні матеріали є найпоширенішим у мікробіологічній промисловості. На ефект очищення повітря впливає ступінь засміченості, оскільки розмір мікроорганізмів коливається від 0,01 до 25 мкм, але вони будуть прилипати до частинок пилу, а отже, ступінь захоплення залежить від розміру цих частинок. Вміст бактеріальних забруднювачів у повітрі в середньому становить 1000-1500 клітин на кубічний метр, але може підвищуватися до 10^4 клітин. Крім мікроорганізмів, загальна кількість органічного та неорганічного пилу, водяної пари та сторонніх частинок у повітрі може досягати 10^9 в 1 м³ [166].

Процес стерилізації повітря для глибокого культивування включає в себе такі операції: очищення повітря від грубих механічних включень; попереднє кондиціонування повітря до певної температури; подача повітря до компресора; тонка очистка від мікроорганізмів у повітрі та остаточно очищення в окремому фільтрі [166].

Підготовка персоналу

Підготовка персоналу передбачає низку дій керівництва для забезпечення якісного та безпечного виробництва. Такий комплекс заходів передбачає ознайомлення зі схемами (періодичністю) проведення навчань (контролю) персоналу, службових обов'язків, які передбачають перебування у

виробничих зонах (в т.ч. чистих зонах) чи контрольних лабораторіях, а також персоналу, діяльність якого може вплинути на якість продукції, підготовку робочого одягу та навчання роботи з обладнанням. Також, працівникам необхідно ознайомитися з програмами забезпечення гігієни праці (методики, що стосуються підтримання гігієнічних норм, підготовки технологічного одягу, приготування дезінфікуючих речовин), адаптованими до різних потреб всередині підприємства [167].

Вибір первинної упаковки ЛЗ

Оскільки як форма ЛЗ обрано таблетки, доречно обрати блістери для їх безпечного та ефективного зберігання та транспортування до остаточного споживача. Оскільки таблетки є нестерильними лікарськими засобами, то додаткової обробки тари не передбачено. Блістери мають зберігатися належним чином на складі для належної роботи з ними.

ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ

6.1. Специфікація обладнання ділянки виробничого біосинтезу

Специфікацію обладнання, зображеного на апаратурній схемі (див. *графічна частина*), наведено у табл. 6.1.

Таблиця 6.1.

Позиція	Найменування	К-ть	Технічна характеристика
1	2	3	4
ПЗ – 1	Повітрозабірник	1	Обладнаний металевою сіткою для видалення механічних забруднень
Ф- 2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтр Maico G4 (507x166x50) – призначений для грубої фільтрації повітря. Вентиляційний фільтр класу G4. Затримує великі частинки забруднень, таких як: пісок, пил, пух, волокнисті речовини та інші видимі частинки розміром від 10 мкм. Виробник: «AlterAir» (Україна) ¹
К- 3	Компресор	1	Компресор повітряний Scherppach HC06. Продуктивність – 192 л/хв. Потужність двигуна – 1,2 кВт. Максимальний тиск – 8 бар. Виробник: «Scherppach» (Германія) ²
Т-4 Т-6	Теплообмінник-охолоджувач Теплообмінник-нагрівач	2	Теплообмінник ST1802400A ОМТ. Матеріал – алюміній. Робочий тиск – 25 бар. Максимальна температура нагрівання – 120 °С. Продуктивність до 180 л/хв. Виробник: ООО «ОМТ» (Італія) ³

Продовження табл. 6.1

1	2	3	4
P-5	Ресивер	1	Ресивер для стисненого повітря P500. Об'єм: 500 літрів. Робочий тиск – 16 бар. Виробник: ООО «ЭНТЕХ УКРАИНА» (Україна) ⁴
Ф-7	Головний фільтр очистки повітря	1	Фільтр ФЯК 592х592х600-8 клас очищення F8 виготовлений з рамки з оцинкованого профілю та фільтруючого матеріалу із синтетики. Ступінь очищення – 95 %. Виробник: «АС ФИЛЬТР» (Україна) ⁵
Ф-8 Ф-11 Ф-16 Ф-21	Індивідуальний фільтр	4	Фільтр ФТОФ клас фільтрації H10. Матеріал на основі ультра та мікротонкого скловолокна. Складні волокна діаметром 0,25...1,0 мкм. Ефективність 99,9995 %. Габарити: (в×д×ш, мм): 610х610х150. Виробник: «ВЕНТ_ФИЛЬТР» (Україна) ⁶
I-9	Інокулятор на 10 л	1	Ферментер BIOSTAT D-DCU об'ємом 10 л. Матеріал – нержавіюча сталь AISI 304 та AISI 316L. Оснащений системою глибинної аерації. Габарити (в×д, мм): 1120×560. Виробник: «Sartorius» (Германія) ⁷
H-10 H-15 H-20	Насос перистальтичний	3	Перистальтичний насос MP-3035.6. Максимальна температура – 60 °С. Потужність двигуна – 0,09 кВт. Робочий тиск – 1,4 бар. Продуктивність 16 л/год. Виробник: «DEBEM» (Італія) ⁸
I-12	Інокулятор на 100 л	1	Ферментер BIOSTAT D-DCU об'ємом 100 л. Матеріал – нержавіюча сталь AISI 304 та AISI 316L. Оснащений системою глибинної аерації. Габарити (в×д, мм): 1800×900. Виробник: «Sartorius» (Германія) ⁷
H-13	Насос перистальтичний	1	Перистальтичний насос MP-3086.9. Максимальна температура – 60 °С. Потужність двигуна – 0,09 кВт. Робочий тиск – 1,4 бар. Продуктивність 78 л/год. Виробник: «DEBEM» (Італія) ⁸

Закінчення табл. 6.1

1	2	3	4
---	---	---	---

З-14	Збірник на 15 л	1	Хімічний реактор на 15 л. Матеріаль – нержавіюча сталь AISI 304 та AISI 316L. Оснащений подвійною сорочкою. Робочий тиск – 4 атм. Може підключатись до СІР мийки. Габарити (в×д, мм): 900×600. Виробник: «ХімМікс» (Україна) ⁹
І-17	Інокулятор на 1 м ³	1	Ферментер BIORUS 1000 L. Матеріаль – нержавіюча сталь AISI 304. Оснащений подвійною сорочкою та барботером. Робочий тиск – 3 бар. Може підключатись до СІР мийки. Габарити (в×д, мм): 1980×900. Виробник: «BIORUS» (Росія) ¹⁰
Н-18	Насос перистальтичний	1	Перистальтичний насос МР-1150-22. Максимальна температура – 80 °С. Потужність двигуна – 0,55 кВт. Робочий тиск – 8 бар. Продуктивність 865 л/год. Виробник: «DEBEM» (Італія) ¹¹
З-19	Збірник на 20 л	1	Реактор-змішувач об'ємом 20 л. Матеріаль – нержавіюча сталь AISI 316L. Оснащений подвійною сорочкою та двома типами мішалок. Робочий тиск – 1+6 атм. Габарити (в×д, мм): 1000×700. Виробник: «Промвіт» (Україна) ¹²
ФР-22	Ферментер на 10 м ³	1	Ферментер на 10 м ³ . Матеріаль – нержавіюча сталь AISI 316L. Оснащений подвійною сорочкою, мішалкою та системою аерації. Габарити (в×д, мм): 2800×1000. Виробник: LLC "DIARTECH" (Росія) ¹³
Н-23	Насос відцентровий	1	Насос відцентровий М-400В. Матеріаль корпусу – чавун. Потужність двигуна – 1,5 кВт. Продуктивність до 10 м ³ /год. Температура рідини, що можна перекачувати – до 50 °С. Виробник: «Saer» (Італія) ¹⁴

Примітка: 1 - <https://shop.alterair.ua/ru/product/smennyi-filtr-maico-g4-507x166x50/#scrollDescription>, 2 - <https://storgom.ua/product/kompressor-vozdushnyy-scheppach-hc06-5906132901.html#properties-tab>, 3 - <https://hydropoint.com.ua/p/745011246-vozdushnyi-teploobmennik-st1802400a.html>, 4 - <https://entech-ukraine.dp.ua/p/1187397428-vozdushosbornik-resiver-dlya.html>, 5 - <https://asfilter.com.ua/catalog/karmannye-filtry/karmannyi-filtr-592kh592kh600-8-f8/>, 6 - <https://ventfilter.kiev.ua/p/249768537-filtr-tonkoy-ochistki-vozduha-ftov-hepa-hepa/>, 7 - https://www.sartogsm.ru/biostat_d50_d100.html, 8 - https://www.debem.com.ua/nasos/peristalticheskie_nasosy/mp-3/, 9 - <https://khimmix.ua/himicheskie-reaktory/laboratoryj-reaktor-15-l>, 10 - <https://bio-rus.ru/primeryi-specifikaczii/promyshlennyj-fermenter->

biorus-1000-l-dlya-veterinari.html, 11 - https://www.debem.com.ua/nasos/peristalticheskie_nasosy/mp-11/, 12 - <https://promvit.com.ua/reaktor-rabochim-obemom-20-l-rasschitannyj-na-rabochee-davlenie-1-6-bar-farmaceuticheskoe-oborudovanie-po-trebovaniyam-gmp/>, 13 - <http://diartech.ru/product/plant-bioreactor-1-35tonn/>, 14 - <https://sdlmarket.com.ua/p1448459971-nasos-tsentrobeznyj-400b.html>

6.2. Опис технологічної схеми виробничого біосинтезу

Технологічна схема синтезу альгінату передбачає допоміжні роботи (підготовка аераційного повітря та приготування та стерилізація поживних середовищ) та технологічний процес (підготовка посівного матеріалу та виробниче культивування).

Технологічна схема виробництва альгінату зазначено в *графічній частині* курсового проекту.

ДР 1. Підготовка аераційного повітря

ДР 1.1. Забір повітря

Необхідний об'єм атмосферного повітря забирають на висоті 15 м.

ДР 1.2. Попереднє грубе очищення повітря

Повітря пропускають через набивний фільтр, де відбувається затримка пилу та інших крупних часточок бруду до ступеня очищення $E = 75 \%$. Фільтруючий матеріал – плетена алюмінієва проволка.

ДР 1.3. Компресування повітря

Відбувається стиснення повітря у компресорі до температури 220-250 °С і тиску 0,4 МПа.

ДР 1.4. Охолодження повітря

У теплообміннику температура повітря знижується до 25-30 °С.

ДР 1.5. Нагрівання повітря

Для унеможливлення конденсації пари на волокнах головного та індивідуальних фільтрів охолоджене повітря у теплообміннику (Т-8) нагрівають до температури 35 °С.

ДР 1.6. Головне тонке очищення повітря

Повітря пропускають через головний фільтр, в якому фільтрувальним матеріалом є нержавіюча стальна сітка. Ступінь очищення становить $E = 95 \%$.

ДР 1.7. Очищення повітря на індивідуальному фільтрі

Перед кожним апаратом встановлюють індивідуальний фільтр. Ступінь очищення становить $E = 99,999 \%$.

ДР 2. Приготування та стерилізація поживних середовищ

ДР 2.1. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках

На цій стадії необхідно приготувати 540 мл поживного середовища (600 з врахуванням інокуляту). Вміст та розрахунок компонентів представлено в табл. 6.2.

Таблиця 6.2.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 540 мл середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 540 мл середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, мл
Глюкоза	20	10,8	А	300
Пептон	5	2,7		
Дріжджовий екстракт	3	1,62		
NaCl	5	2,7	Б	250

ДР 2.1.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 10,8 г глюкози, 2,7 г пептону та 1,62 г дріжджового екстракту. Наважки поміщають у колбу об'ємом 500 мл, додають 285 мл дистильованої води і перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112 °С упродовж 30 хв.

ДР 2.1.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 2,7 г NaCl. Наважку поміщають у колбу об'ємом 0,5 л, додають 247 мл дистильованої води і перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С упродовж 40 хв.

ДР 2.2. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі на 10 л

На цій стадії необхідно приготувати 5,4 л поживного середовища (6 л з врахуванням інокуляту, що надійшов з минулої стадії). Вміст та розрахунок компонентів представлено в табл. 6.3.

Таблиця 6.3.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 5,4 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 5,4 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, мл
Глюкоза	20	108	А	5000 (10 % конденсат)
Пептон	5	27		
Дріжджовий екстракт	3	16,2		
NaCl	5	27	Б	400

ДР 2.2.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 108 г глюкози, 27 г пептону та 16,2 г дріжджового екстракту. Наважки поміщають в інокулятор на 10 л, додають 4,35 л питної води і перемішують. Композицію стерилізують при температурі 112 °С упродовж 30 хв.

ДР 2.2.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 27 г NaCl. Наважку поміщають у колбу об'ємом 1 л, додають 373 мл дистильованої води і перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С упродовж 40 хв.

ДР 2.3. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі на 100 л

На цій стадії необхідно приготувати 54 л поживного середовища (60 л з врахуванням інокуляту, що надійшов з минулої стадії). Вміст та розрахунок компонентів представлено в табл. 6.4

Таблиця 6.4.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 54 л середовища

Компонент	Концентрація,	Вміст	Композиція	Об'єм
------------------	----------------------	--------------	-------------------	--------------

поживного середовища	г/л	компонента у 54 л середовища, г		композиції, л
Глюкоза	20	1080	А	51 (10% конденсат)
Пептон	5	270		
Дріжджовий екстракт	3	162		
NaCl	5	270	Б	3

ДР 2.3.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 1080 г глюкози, 270 г пептону та 162 г дріжджового екстракту. Наважки поміщають в інокулятор на 100 л, додають 44,4 л питної води і перемішують. Композицію стерилізують при температурі 112 °С упродовж 30 хв.

ДР 2.3.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 270 г NaCl. Наважку поміщають у колбу об'ємом 5 л, додають 2730 мл дистильованої води і перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С упродовж 40 хв.

ДР 2.4. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі на 1 м³

На цій стадії необхідно приготувати 540 л поживного середовища (600 л з врахуванням інокуляту, що надійшов з минулої стадії). Вміст та розрахунок компонентів представлено в табл. 6.5.

Таблиця 6.5.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 540 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 540 л середовища, кг	Композиція	Об'єм композиції, л
Глюкоза	20	10,8	А	530 (10%

Пептон	5	2,7		конденсат)
Дріжджовий екстракт	3	1,62		
NaCl	5	2,7	Б	10 (10% конденсат)

ДР 2.4.1. Приготування та стерилізація композиції А

На ваговому дозаторі зважують 10,8 кг глюкози, 2,7 кг пептону та 1,62 кг дріжджового екстракту. Наважки поміщають в інокулятор на 1 м³, додають 462 л питної води і перемішують. Композицію стерилізують при температурі 112 °С упродовж 30 хв.

ДР 2.4.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На ваговому дозаторі зважують 2,7 кг NaCl. Наважку поміщають в збірник, об'ємом 15 л. До солі доливають 6,3 л питної води. Вмикають мішалку та перемішують до повного розчинення. Композицію стерилізують при температурі 131 °С упродовж 40 хв.

ДР 2.5. Приготування і стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу в ферментері на 10 м³

На цій стадії необхідно приготувати 5600 л поживного середовища (6200 л з врахуванням інокуляту, що надійшов з минулої стадії). Вміст та розрахунок компонентів представлено в табл. 6.6.

Таблиця 6.6.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 5600 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 5600 л середовища, кг	Композиція	Об'єм композиції, л
Глюкоза	20	112	А	5585 (10%)

Лимона кислота	0,4	2,24		конденсат)
Дріжджовий екстракт	0,05	0,28		
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,7	3,92	Б	15 (10% конденсат)
CaCl ₂	0,15	0,84		
MnSO ₄ ×4H ₂ O	0,0009	0,005		
ZnSO ₄ ×7H ₂ O	0,0002	0,001		
CoSO ₄ ×7H ₂ O	0,0003	0,002		
CuSO ₄ ×5H ₂ O	0,0003	0,002		
FeSO ₄ ×7H ₂ O	0,004	0,022		

ДР 2.5.1. Приготування та стерилізація композиції А

На ваговому дозаторі зважують 112 кг глюкози, 2,24 лимонної кислоти та 0,280 кг дріжджового екстракту. Наважки поміщають в ферментер на 10 м³, додають 4911,5 л питної води і перемішують. Композицію стерилізують при температурі 112 °С упродовж 30 хв.

ДР 2.5.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На ваговому дозаторі зважують 3,92 кг (NH₄)₂SO₄ та 0,84 кг CaCl₂. Зважені солі поміщають у збірник на 15 л. Потім, на технічних вагах зважують 5 г MnSO₄×4H₂O, 1 г ZnSO₄×7H₂O, 2 г CuSO₄×7H₂O, 2 г CuSO₄×5H₂O та 22 г FeSO₄×7H₂O. Наважки поміщають в збірник, об'ємом 15 л. До солей доливають 8,75 л питної води. Вмикають мішалку та перемішують до повного розчинення. Композицію стерилізують при температурі 131 °С упродовж 40 хв.

ТП 3. Підготовка посівного матеріалу

ТП 3.1. Підтримання колекційної культури

Основними завданнями зберігання культур мікроорганізмів є підтримка їх життєдіяльності, збереження стабільності таксономічно важливих ознак. В лабораторних і промислових умовах необхідно забезпечити виживання штамів при довготривалому зберіганні. Самий поширений метод підтримання

життєдіяльності мікроорганізмів - це періодичні пересівання культур на свіжі живильні середовища. Однак при багаторазових пересіваннях підвищується ймовірність реверсії та втрати активності мікроорганізму, тому штами краще зберігати в консервованому вигляді. При цьому мікроорганізми зберігають життєздатність протягом десятиліть. Перспективним способом зберігання вважається кріоконсервація. За літературними даними відомо, що мікроорганізми, що зберігаються при низьких температурах, ушкоджуються у меншій ступені і мають вищу ступінь виживання, ніж мікроорганізми, що зберігалися в висушеному або ліофілізованому стані. Іншим широко поширеним методом є зберігання культур під шаром мінеральної олії. Олія захищає субстрат від висихання, обмежує доступ кисню повітря. Спороутворюючі мікроорганізми мають більшу стійкість при зберіганні під маслом, тому цей метод часто використовується для зберігання мікромісцетів.

Ми будемо застосовувати метод тривалого зберігання на напіврідких живильних середовищах під вазеліновим маслом. Термін зберігання культури один рік, в холодильнику при температурі 5-8 °С.

ТП 3.2. Одержання робочої культури на агаризованих середовищах

Процедура створення запасів еталонних бактеріальних культур тимчасового зберігання з культур тривалого зберігання під вазеліновим маслом

Виконавець:

- акуратно видаляє піпеткою вазелінове масло з пробірки з бактеріальною культурою тривалого зберігання;
- у пробірку піпеткою вносить по 5 мл Соєво-казеїнового бульйону (далі – СКБ);
- маркує пробірку з бактеріальною культурою і з внесеним в неї СКБ, вказуючи назву внесеного живильного середовища, номер партії живильного середовища і дату відновлення;

– посіви передає на інкубацію при температурі від 30 °С до 35 °С протягом 5-8 годин;

– готує і маркує пробірки для культури з густим живильним середовищем Соєво-казеїновий агар (далі – СКА) зі скошеною поверхнею, вказуючи назву живильного середовища, номер партії живильного середовища, назву тест-штаму *Pseudomonas mendocina* CCT і дату посіву;

– після завершення інкубації проводить пересівання з бульйону на підготовлені скошені середовища, і передає на інкубацію при температурі від 30 °С до 35 °С протягом 18-48 годин.

ТП 3.3. Вирощування культури в колбах на качалках

Для вирощування рідкого посівного матеріалу у попередньо простерилізовану колбу об'ємом 1 л в асептичних умовах вносять 300 мл розчину композиції А (від ДР 2.1.1), 240 мл розчину композиції Б (від ДР 2.1.2). Перемішують і розливають по 135 мл у 4 стерильних качалочних колб об'ємом 750 мл.

У пробірку з робочою культурою *P. mendocina* CCT, вирощену на СКА, асептично вносять 15 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини (змивають культуру), піпеткою відбирають одержану бактеріальну суспензію і переносять у колбу. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою. Для засіву однієї колби використовують бактеріальну суспензію, одержану з однієї пробірки. Бактерії вирощують у колбах на качалці (30 °С, швидкість перемішування 100 об/хв) упродовж 16 годин.

Періодично (кожні 4 год) відбирають пробу культуральної рідини для мікробіологічного контролю відсутності сторонньої мікробіоти.

ТП 3.4. Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 10 л

Інокулятор об'ємом 10 л вже містить 5 л простерилізованого розчину композиції А (від ДР 2.2.1). Потім в інокулятор за допомогою зйомного засівного пристрою, встановленого безпосередньо над реактором, подають 400 мл розчину композиції Б (від ДР 2.2.1) і вмикають перемішуючий пристрій. Посівний матеріал (від ТП 3.3) подають через засівну колбу. Для цього у

попередньо простерилізовану засівну колбу об'ємом 1 л в боксі зливають посівний матеріал з 4 качалочних колб. Засівну колбу під факелом з'єднують з окремим штуцером і самопливом передають вміст колби в інокулятор.

Температура культивування 30 ± 2 °С, швидкість перемішування становить 180 об/хв, витрати повітря 1 л/л·хв. Тривалість культивування становить 16 годин.

Періодично (кожні 4 год) відбирають пробу КР для мікробіологічного контролю відсутності сторонньої мікробіоти. Відпрацьоване повітря передають на стадію знешкодження відходів (до ЗВ 5.1).

ТП 3.5. Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 100 л

В інокуляторі, що вже містить 51 композиції А (від ДР 2.3.1) в асептичних умовах вносять 3 л розчину композиції Б (від ДР 2.3.2) і вмикають перемішуючий пристрій. Посівний матеріал перекачують через трубу перетискування від інокулятора (від ТП 3.4).

Температура культивування 30 ± 2 °С, швидкість перемішування становить 180 об/хв, витрати повітря 1 л/л·хв. Тривалість культивування становить 16 годин.

Періодично (кожні 4 год) відбирають пробу КР для мікробіологічного контролю відсутності сторонньої мікробіоти. Відпрацьоване повітря передають на стадію знешкодження відходів (до ЗВ 5.1).

ТП 3.6. Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 1 м³

В попередньо простерилізований інокулятор об'ємом 4 м³, який вже містить 530 л композиції А (від ДР 2.4.1) за допомогою труби перетискування, від збврника на 15 л передають композицію Б (від ДР 2.4.2) і вмикають перемішуючий пристрій. Посівний матеріал перекачують через трубу перетискування від меншого посівного апарата (від ТП 3.5).

Температура культивування 30 ± 2 °С, швидкість перемішування становить 180 об/хв, витрати повітря 1 л/л·хв. Тривалість культивування становить 16 годин.

Періодично (кожні 4 год) відбирають пробу КР для мікробіологічного контролю відсутності сторонньої мікробіоти. Відпрацьоване повітря передають на стадію знешкодження відходів (до ЗВ 5.1).

ТП 4. Виробничий біосинтез

ТП 4.1. Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 10 м³

В попередньо простерилізований ферментер об'ємом 10 м³, що містить 5585 л простерилізованої композиції А (від ДР 2.5.1) за допомогою перистальтичного насосу подають розчин композиції Б об'ємом 15 л (від ДР 2.5.2) і вмикають перемішуючий пристрій. Посівний матеріал перекачують через трубу перетискування від посівного апарату (від ТП 3.6).

Температура культивування 29 ± 2 °С, швидкість перемішування становить 550 об/хв, витрати повітря 1 л/л·хв. Тривалість культивування становить 22 години.

Періодично (кожні 4 год) відбирають пробу культуральної рідини для мікробіологічного контролю відсутності сторонньої мікробіоти.

Також визначають показники росту і синтезу: концентрацію біомаси, гелану, вмісту джерела вуглецю і азоту. Після закінчення ферментації культуральну рідину за допомогою відцентрового насоса подають у збірник для зберігання КР. Відпрацьоване повітря передають на стадію знешкодження відходів (до ЗВ 5.1).

ЗВ 5. Знешкодження відходів

ЗВ 5.1. Знешкодження повітряних відходів

Відходи, що надійшли з ТП 3.4, ТП 3.5., ТП 3.6. та ТП 4.1. знешкоджуються у системі очистки повітря та виводяться в атмосферу.

6.3. Контроль ділянки біосинтезу

Мікробіологічний контроль

Слід звернути увагу на те, що культивування бактерій *P. mendocina* ССТ з проводиться в асептичних умовах. Тому є необхідність проводити

мікробіологічний контроль на усіх етапах, для того щоб впевнитись у відсутності мікробіологічного забруднення.

Кожні 4 год з інокуляторів і ферментера відбирають зразки культуральної рідини для аналізу.

Мікробіологічний контроль здійснюється двома шляхами: прямий висів на агаризовані поживні середовища і мікроскопіювання.

Культуральну рідину розсівають петлею до ізольованих колоній на чашки Петрі соєво-казеїновим агаром (СКА) для виявлення бактерій, з сабуро-декстрозним агаром (СДА) – для виявлення дріжджів і грибів.

Для мікроскопіювання використовують метод мікроскопіювання з імерсійною системою. Мікроскопіювання проводять у світловому мікроскопі з імерсійною системою.

Для приготування препарату на чисте знежирене предметне скло, в асептичних умовах, за допомогою стерильної петлі наносять невелику краплину культуральної рідини. Краплю, яка містить мікроорганізми, розподіляють по склу за допомогою бактеріальної петлі (діаметр мазка близько 1 см). Мазок висушують без нагрівання, при кімнатній температурі, до повного випаровування вологи. Потім на абсолютно сухий препарат за допомогою скляної палички наносять 1–2 краплини імерсійного масла, фіксують і розглядають з об'єктивом x90. Після роботи ватою, змоченою етиловим спиртом, знімають залишки масла з імерсійного об'єктива [168].

За загальною характеристикою *P. mendocina* ССТ на звичайних агар представляє гладкі колонії, не зморщені і плоскі, які утворюють коричнево-жовтий пігмент. Органічні фактори росту не потрібні. Росте на середовищах: поживний агар, соєво-казеїновий, агар Mac Conkey, агар SS [169,170].

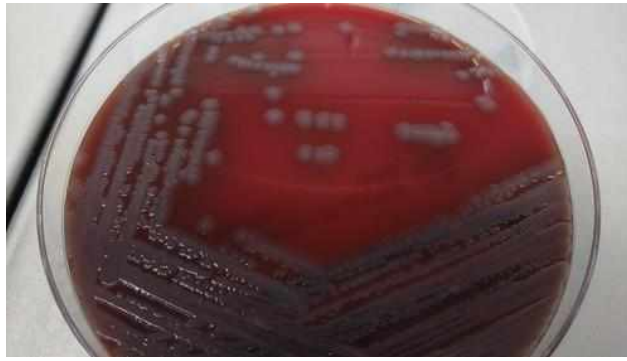


Рис.6.1. Pseudomonas mendocina на кров'яному агарі, виділена з ліквору [171]

Під мікроскопом бактерії виглядають як рухливі палички, розміром 0,7-0,8 x 1,4-2,8 мкм. Бічні джгутики короткої довжини. За забарвленням – грамнегативні [16].

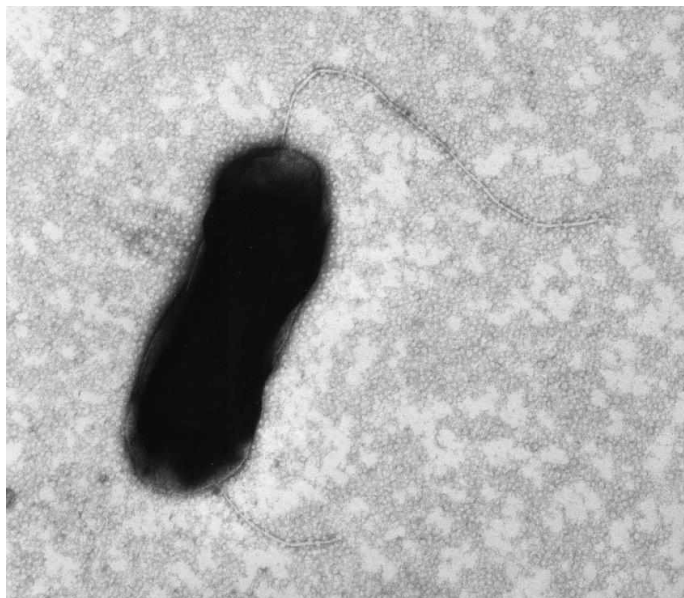


Рис.6.2. Електронна мікроскопія Pseudomonas mendocina. Збільшення у 40000 раз [172]

Показники росту і синтезу альгінату

Визначення концентрації біомаси

На початку, 1 мл культуральної рідини розчиняють в 9 мл дистильованої води. Аналізований зразок заливають у кювету, як контроль беруть дистильовану воду та вимірюють оптичну густину за довжини хвилі 595 нм. Отримані результати переводять по калібрувальному графіку.

Визначення концентрації альгілату

Концентрацію альгілату визначають спектрофотометрично.

Спектрофотометрія — метод аналізу, що базується на визначенні спектра поглинання або вимірюванні світлопоглинання при певній довжині хвилі, яка відповідає максимуму кривої поглинання досліджуваної речовини. Аналіз здійснюють за поглинанням речовинами монохроматичного випромінювання у видимій, УФ- і ІЧ-ділянках спектра [173].

Методі ґрунтується на використанні для визначення концентрацій речовин закону Бугера — Ламберта — Бера [173]:

$$\lg(I_0/I) = \chi \cdot C \cdot l, \text{ де}$$

I_0 — інтенсивність електромагнітного випромінювання, що падає на розчин речовини;

I — інтенсивність електромагнітного випромінювання, яке пройшло через розчин речовини;

l — товщина шару розчину;

C — концентрація розчину, що досліджується;

χ — показник поглинання розчину.

Методика визначення альгілату. Зразок піддають кислотному гідролізу ($\text{pH}=3$, HCl). Отриманий зразок гідролізованого альгілату (10 мл) розчиняють в D_2O (0,4 мл) при нейтральному pH . Зразок фільтрують через шприцевий фільтр Whatman 13 мм (розмір пор 0,45 мкм) в 5-мм NMR-трубку. Фіксується близько 300 сканувань і усереднено за час збору (5 с) після затримки релаксації (2 с) при 90 імпульсах. Результат отримують у вигляді спектрів концентрації альгілату [174].

Визначення концентрації глюкози

Джерелом вуглецевого живлення є глюкоза. Цей компонент визначають за допомогою методу ВЕРХ.

Високоєфективна рідинна хроматографія – найбільш ефективний метод аналізу органічних зразків складної будови. Процес аналізу проби відбувається

у два етапи – розділення проби на складові компоненти та детекція і вимірювання кожного компоненту [175].

Розділення відбувається за рахунок спеціальної хроматографічної колонки, яка являє собою трубку, заповнену сорбентом. При проведенні аналізу через хроматографічну колонку подають рідину (елюент) певного складу з постійною швидкістю. В цей потік додається точно виміряна доза проби. Компоненти проби, завдяки різній спорідненості до сорбенту колонки, рухаються по ній з різною швидкістю і досягають детектору в різні проміжки часу [175].

Метод ВЕРХ визначення глюкози полягає визначенні зміни площі піка глюкози на хроматограмі залежно від її концентрації [175].

Методика визначення глюкози в дослідному зразку. Культуральну рідину центрифугують при 10000 об/хв на 20 хв при 4 °C (Eppendorf 5804-R, Німеччина). Потім, без розведення, супернатант аналізують за допомогою установки HPLC Agilent 1260 Infinity (Agilent Technologies, Waldbronn, Німеччина), оснащеної детектором показника заломлення (RID10A, Shimadzu, Японія) та колоною ICSeP ICE-COREGEL 87H3 (Transgenomic, США). Рухлива фаза становила 0,008 н. H₂SO₄, яку елюють при 0,4 мл/хв при кімнатній температурі. Отримані результати звіряються з калібрувальним графіком стандартного розчину глюкози [176].

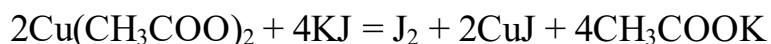
Визначення концентрації амінного азоту

Основним джерелом амінного азоту є дріжджовий екстракт та пептон, а точніше їх амінокислоти та пептиди. Їх вміст визначають методом К'ельдаля у супернатанті.

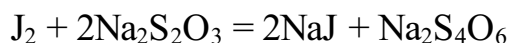
Методу К'ельдаля заснований здатності амінокислот утворювати розчинні з'єднання з міддю, кількість якої визначають йодометричним титруванням. Суть цього методу ґрунтується на тому, що до слабо лужного розчину супернатанту, який містять амінокислоти та/або пептиди, додають надлишок суспензії ортофосфату міді Cu₃(PO₄)₂ у боратному буферному

розчині. У ході реакції утворюються добре розчинні мідні з'єднання синього кольору. Після чого, отриману речовину фільтрують, задля відділення від нерозчинного ортофосфату міді. Після чого, до отриманого фільтрату додають оцтову кислоту, що від'єднує мідь від комплексного з'єднання і перетворюється в ацетат міді [177].

Для визначення кількості міді, яка брала участь в реакції, до розчину добавляють йодид калію:



В результаті реакції виділяється йод в кількості, еквівалентній кількості міді, а відповідно, і азоту амінокислот, який відтитровують розчином тіосульфату натрію:



1 мл 0,01 н розчину тіосульфату натрію відповідає 0,28 мг амінного азоту.

Карту постадійного контролю представлено в табл. 6.7.

Таблиця 6.7.

Карта постадійного контролю

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю та показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та відбору проб	Нормативні значення показника
1	2	3	4	5
Кт 1.2. Груба очистка повітря	Атмосферне повітря, ступінь чистоти повітря на виході з фільтру	Аналіз повітря до і після фільтрації	До та після проходження повітря через фільтр грубого очищення	$E = 80 \%$
Кт 1.3 Компресування повітря	Стиснене повітря, тиск	Манометр	Після компресора	$P = 0,4 \text{ МПа}$
Кт 2.4 Охолодження повітря та видалення зайвої вологи	Охолоджене повітря, температура, вологість	Термометр Психометричний метод	На виході з теплообмінника – охолоджувача та ресивера	$t = 30 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $W = 60 \%$
Кт 2.5 Нагрівання повітря	Нагріте повітря, температура	Термометр	Після нагрівання повітря	$t = 40 \text{ }^{\circ}\text{C}$
Кт 2.6 Очищення повітря в головному фільтрі	Очищене повітря, ступінь чистоти повітря на виході з фільтру, перепад тиску	Перевірка ступеня очищення Манометр	До та після проходження повітря через головний фільтр	$E = 95 \%$ ΔP згідно технічних характеристик

Продовження табл.6.7.

1	2	3	4	5
---	---	---	---	---

Кт 2.7 Очищення повітря в індивідуальному фільтрі	Очищене повітря, ступінь чистоти повітря на виході з фільтру	Перевірка ступеня очищення	До та після проходження повітря через індивідуальний фільтр	E = 99,99998 %
Кт, Км 4.1.1. Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, тиск, температура, час витримки, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t=112 °C P = 0,05 МПа τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1.2. Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, фільтрування, асептика	Фільтр, мікробіологічний контроль	Стерилізація через вакуум фільтр, мікробіологічний контроль після стерилізації	t=131 °C P = 0,15 МПа τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.2.1. Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, тиск, температура, час витримки, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t=112 °C P = 0,05 МПа τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.2.2. Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, фільтрування, асептика	Фільтр, мікробіологічний контроль	Стерилізація через вакуум фільтр, мікробіологічний контроль після стерилізації	t=131 °C P = 0,15 МПа τ = 40 хв, відсутність мікробіоти

Продовження табл.6.7.

1	2	3	4	5
Кт, Км 4.3.1. Приготування та	Композиція А, тиск, температура, час	Манометр, годинник,	Тиск визначається безперервно під час	t=131 °C P = 0,15 МПа

стерилізація композиції А	витримки, стерильність	мікробіологічний контроль	стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$\tau = 40$ хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.3.2. Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, фільтрування, асептика	Фільтр, мікробіологічний контроль	Стерилізація через вакуум фільтр, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t=131$ °С $P = 0,15$ МПа $\tau = 40$ хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.4.1. Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, тиск, температура, час витримки, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t=112$ °С $P = 0,05$ МПа $\tau = 30$ хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.4.2. Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, фільтрування, асептика	Фільтр, мікробіологічний контроль	Стерилізація через вакуум фільтр, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t=131$ °С $P = 0,15$ МПа $\tau = 40$ хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.5.1. Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, тиск, температура, час витримки, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t=112$ °С $P = 0,05$ МПа $\tau = 30$ хв, відсутність мікробіоти

Продовження табл. 6.7.

1	2	3	4	5
Кт, Км 4.5.2. Приготування та стерилізація	Композиція Б, фільтрування, асептика	Фільтр, мікробіологічний контроль	Стерилізація через вакуум фільтр, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t=131$ °С $P = 0,15$ МПа $\tau = 40$ хв,

композиції Б				відсутність мікробіоти
Кт, Км 5.1. Підтримання колекційної культури	Колекційна культура, температура, частота пересівів, мікробіологічна чистота	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура протягом зберігання. Мікробіологічна чистота після вирощування культури	$t = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$, тересів = 1-3 місяці, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 5.2. Одержання робочої культури <i>P. mendocina</i> ССТ на агаризованому середовищі	Колекційна культура, температура, тривалість вирощування, мікробіологічна чистота	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається під час вирощування. Мікробіологічна чистота після вирощування культури	$t = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 24$ год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 5.3. Вирощування робочої культури <i>P. mendocina</i> ССТ на агаризованому середовищі	Робоча культура, температура, тривалість вирощування, мікробіологічна чистота	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається під час вирощування. Мікробіологічна чистота після вирощування культури	$t = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 24$ год, відсутність сторонньої мікробіоти

Продовження табл. 6.7.

1	2	3	4	5
Кт, Км 5.4. Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, частота обертів качалки,	Годинник, термометр технічний, тахометр, мікробіологічний контроль	Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування. Мікроскопіювання – після вирощування культури в колбах	$t = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 16$ год, $\omega = 180$ об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти

	мікробіологічна чистота культури			
Кх, Кт, Км 5.5. Вирощування культури в інокуляторі на 10 л	Поживне середовище в інокуляторі, рН, посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, частота обертів мішалки, надлишковий тиск, мікробіологічна чистота культури морфологічна відповідність організмів	Датчик рН годинник термометр технічний, тахометр, витратомір, манометр, мікроскоп	рН визначають після змішування всіх компонентів поживного середовища в інокуляторі, Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування Мікроскопіювання – в кінці процесу вирощування культури в інокуляторі	рН=7 t = 30 °С, τ = 16 год, ω= 180 об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти

Продовження табл.6.7.

1	2	3	4	5
Кх, Кт, Км 5.6. Вирощування культури в інокуляторі на 100 л	Поживне середовище в інокуляторі, рН, посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, частота обертів мішалки, надлишковий тиск, мікробіологічна	Датчик рН годинник термометр технічний, тахометр, витратомір, манометр, мікроскоп	рН визначають після змішування всіх компонентів поживного середовища в інокуляторі, Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування	рН=7 t = 30 °С, τ = 16 год, ω= 180 об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти

	чистота культури морфологічна відповідність організмів		Мікроскопіювання – в кінці процесу вирощування культури в інокуляторі	
Кх, Кт, Км 5.7. Вирощування культури в інокуляторі на 1 м ³	Поживне середовище в інокуляторі, рН, посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, частота обертів мішалки, надлишковий тиск, мікробіологічна чистота культури морфологічна відповідність організмів	Датчик рН годинник термометр технічний, тахометр, витратомір, манометр, мікроскоп	рН визначають після змішування всіх компонентів поживного середовища в інокуляторі, Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування Мікроскопіювання – в кінці процесу вирощування культури в інокуляторі	рН=7 t = 30 °С, τ = 16 год, ω= 180 об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти

Закінчення табл.6.7.

1	2	3	4	5
Кх, Кт, Км 6.1. Виробничий біосинтез	Поживне середовище в ферментері, рН, культуральна рідина, температура тривалість культивування, частота обертів	Датчик рН годинник термометр технічний, тахометр, витратомір, манометр, мікроскоп, ВЕРХ	рН визначають і регулюють після змішування всіх компонентів поживного середовища в ферментері. Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування Мікроскопіювання – під час	рН=7 t = 30 °С, τ = 22 год, ω= 550 об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти, кінцева концентрація альгінату = 8,2 г/л

	мішалки, надлишковий тиск, мікробіологічна чистота, концентрація бутанолу		вирощування культури у ферментері. Відбір проб культуральної рідини – кожні 4 год	
--	--	--	--	--

РОЗДІЛ 7

ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ ВИРОБНИЦТВА ЛЗ

7.1. Специфікація обладнання ділянки виробництва ЛЗ

Специфікацію обладнання, зображеного на апаратурній схемі (див. *графічна частина*), наведено у табл. 7.1.

Таблиця 7.1.

Специфікація ділянки післяферментаційних процесів виробництва альгінату

Позиція	Найменування	К-ть	Технічна характеристика
1	2	3	4
ЗБ-1	Збірник культуральної рідини	1	Резервуар для зберігання BBTVI-8000C. Подвійний кожух та сам резервуар виготовлено з нержавіючої сталі AISI 304. Діапазон тиску 0.0 - 4.4 Бар. Габарити (в×d, мм): 5094×1700. Виробник: «Czech brewery system s.r.o.» (Чехія) ¹
Н-2 Н-4	Відцентровий насос	2	Насос відцентровий багатоступінчастий LEO. Продуктивність: 15 м³/год. Корпус виготовлено з чавуна. Виробник: «Leo» (Китай) ²
Р-3	Реактор-змішувач	1	Реактор BBTVI-15000C, оснащений мішалкою. Подвійний кожух та сам резервуар виготовлено з нержавіючої сталі AISI 304. Діапазон тиску 0.0 - 4.4 Бар. Габарити (в×d, мм): 7270×1900. Виробник: «Czech brewery system s.r.o.» (Чехія) ³
Ц-5	Центрифуга	1	Проточна трубчаста центрифуга J1250. Продуктивність: 2200 л/год. Габарити (ш×г×в, мм): 840x450x1600. Матеріал корпусу – нержавіюча сталь. Виробник: «Hanil Scientific» (Південна Корея) ⁴

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.07 КР ПЗ</i>		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Лисенко Л.В.			РОЗДІЛ 6 ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ ВИРОБНИЦТВА ЛЗ	Лім.	Арк.
Перевір.		Резніченко Ю.М.					113
Реценз.						Аркушів	149
Н. Контр.						<i>Кафедра БТМ</i>	
Затверд.		Стабніков В.П.					

Продовження табл. 7.1

1	2	3	4
ЗБ-6	Збірник супернатанту	1	Резервуар для зберігання BBTVI-15000C. Подвійний кожух та сам резервуар виготовлено з нержавіючої сталі AISI 304. Діапазон тиску 0.0 - 4.4 Бар. Габарити (в×д, мм): 7270×1900. Виробник: «Czech brewery system s.r.o.» (Чехія) ³
С-7	Сушарка	1	Промислова сушильна шафа XXL15 на 15000 літрів. Максимальна температура 200 ° С (опційно до 300 ° С). Габарити (ш×в×д,мм): 2900×3607×2855. Виробник: ООО "Лаборатория Сигма" (Росія) ⁵
ЗБ-8 ЗБ-16	Збірник для осадження Збірник для розчинення	2	Резервуар для зберігання BBTVI-12000C. Подвійний кожух та сам резервуар виготовлено з нержавіючої сталі AISI 304. Діапазон тиску 0.0 - 4.4 Бар. Габарити (в×д, мм): 6732×1800. Виробник: «Czech brewery system s.r.o.» (Чехія) ⁶
Н-9 Н-12 Н-17	Насос перистальтичний	3	Перистальтичний насос МР-3 для перекачування рідини при низькому тиску. Продуктивність - 16 - 103 л/год. Напір - до 1,4 Бар. Виробник: «Debem» (Італія) ⁷
Ц-10 Ц-13	Центрифуга	2	Центрифуга ХТС-100. Матеріал нержавіюча сталь AISI 304. Габарити (д×ш×в,мм): 1778×1122×1122. Виробник: «USA Lab» (США) ⁸
ЗБ-11 ЗБ-14	Збірник для суспендування Збірник для зберігання	2	Ємність на 120 л. Робочий тиск 6 Бар. Габарити (в×д, мм): 1155×600. Матеріал нержавіюча сталь. Виробник: «Eldominvest» (Болгарія) ⁹
С-15	Сушарка	1	Сушильна шафа СП-50. Має 4 полиці. Максимальна загрузка 56 кг. Матеріал камери нержавіюча сталь AISI 304. Габарити (ш×в×д,мм): 650×680×605. Виробник: «Алмедика» (Україна) ¹⁰

Продовження табл. 7.1

1	2	3	4
Ц-18	Центрифуга	1	Проточна центрифуга СЕРА Z 61/Z 61 GP. З нержавіючої сталі. Теоретичний об'єм 6 л. Продуктивність 50-1500 л/год. Максимальна швидкість близько 17000 об/хв. Виробник: «БИОТЕХНО» (Росія) ¹¹
ЗБ-19	Збірник для розчинення та осаджування	1	Резервуар для зберігання ВВТ VI-250С. Подвійний кожух та сам резервуар виготовлено з нержавіючої сталі AISI 304. Діапазон тиску 0.0 - 4.4 Бар. Габарити (в×д, мм): 1672×600. Виробник: «Czech brewery system s.r.o.» (Чехія) ¹²
Н-20	Насос перистальтичний	1	Перистальтичний насос МР-6 для перекачування рідини при низькому тиску. Продуктивність - 40 - 226 л/год. Напір - до 1,4 Бар. Виробник: «Debem» (Італія) ¹³
ЗБ-21	Збірник для розчинення	1	Резервуар для зберігання ВВТ VI-100С. Подвійний кожух та сам резервуар виготовлено з нержавіючої сталі AISI 304. Діапазон тиску 0.0 - 4.4 Бар. Габарити (в×д, мм): 872×604. Виробник: «Czech brewery system s.r.o.» (Чехія) ¹⁴
С-22	Сушарка	1	Ліофільна сушарка FD 100. Температурний режим: -35 С° до +60 С°. Габарити (д×ш×в, мм): 3100×2400×1500. Холодоагент: R404А. Кількість полиць: 48. Продуктивність: 100 кг за 24 год. Виробник: «КЕМОЛО» (Китай) ¹⁵
П-23	Подрібнювач	1	Мікрмельниця ПМ-5. Продуктивність: 30 кг/год. Габарити (д×ш×в, мм): 500×400×700. Виробник: ООО «Техническо-торговый дом Цыбко» (Україна) ¹⁶
В-24	Вібросито	1	Вібросито ВВУ1.800.2ВЧ. Кількість деко: 2 шт. Робоча сітка (мм): 0.25, 0.5, 0.7, 1.0, 1.5. Габарити (д×ш×в, мм): 1345×930×1200. Виробник: ООО «КБ Интел» (Україна) ¹⁷

Закінчення табл. 7.1

1	2	3	4
З-25	Змішувач	1	Промислова змішувальна машина ТОП41-5. Габарити (в×д, мм): 1800×650. Потужність: 1,5 кВт. Одна ємність для змішування (кг): 60-100. Виробник: «WUXI TOP MIXER EQUIPMENT CO.,LTD» (Китай) ¹⁸
ТП-26	Таблетпрес	1	Автоматичний роторний таблетковий прес AZP-18D. Кількість станцій: 18. Продуктивність: 32000 таблетки/год. Габарити (д×ш×в, мм): 750×660×1620. Виробник: ООО «АТРОНАС» (Україна) ¹⁹
ПМФ-27	Пакувальна машина	1	Повністю автоматична лінія упаковки ДРН350І-ZН400І. Кількість блістерних упаковок за год 21000. Кількість коробок за годину від 0 до 24000. Потужність: 19 кВт. Габарити (д×ш×в, мм): 8800×1100×1800. Виробник: «Jornen Machinery Co., Ltd.» (Китай) ²⁰

Примітка: 1 - <https://eshop.czechminibreweries.com/uk/product/bbtvi-8000c/>, 2 - <https://engineers.com.ua/nasosy/poverhnostnye-nasosy/nasos-tsentrobegnyj-leo-1-5-kvt-37-5-m-15-m3-chas-775228>, 3 - <https://eshop.czechminibreweries.com/uk/product/bbtvi-15000c/>, 4 - <https://www.skygen.com/katalog/obshchelaboratornoe-oborudovanie/hanil-scientific/tsentrifugi/promyshlennye-tsentrifugi/protochnaya-trubchataya-tsentrifuga-j1250/>, 5 - <https://lab-sigma.ru/catalog/laboratornoe-oborudovanie/promyshlennye-sushilnye-shkafy/promyshlennye-sushilnye-shkafy-france-etuves-frantsiya/xx115/>, 6 - <https://eshop.czechminibreweries.com/uk/product/bbtvi-12000c/>, 7 - <https://www.debem.com.ua/nasos/peristalticheskie-nasosy/mp-3/>, 8 - <https://www.usalab.com/usa-lab-100l-jacketed-stainless-steel-centrifuge-xtc-100/>, 9 - <https://romstal.ua/ru/product/32948-buferna-emnist-120-l-bce-120-r>, 10 - https://almedika.com.ua/p/662647669-shkaf-sushilnyy-sp-50/?gclid=CjwKCAjw-ZCKBhBkEiwAM4qfF-VQqXjwxopVQf92GwC2h3TMVqwh3OUPwGuNWa-1jvTVjNSPLH5sohoCk20QAvD_BwE, 11 - <https://biotechno.ru/catalog/ceparatsiya/pilotnaya-protochnaya-tsentrifuga-cepta-z-61/>, 12 - <https://eshop.czechminibreweries.com/uk/product/bbtvi-250c/>, 13 - <https://www.debem.com.ua/nasos/peristalticheskie-nasosy/mp-6/>, 14 - <https://eshop.czechminibreweries.com/uk/product/bbtvi-100c/>, 15 - <https://www.liofilizador.com/products/%D0%BB%D0%B8%D0%BE%D1%84%D0%B8%D0%BB%D0%B8%D0%B7%D0%B0%D1%82%D0%BE%D1%80%D0%B0-ru.html>, 16 - <https://torgdom.com.ua/product/izmelchitel-pn-10-kolba-nerzhavayushaya-stal/>, 17 - <https://prom.ua/p619214373-vibrosito-krugloe-vysokochastotnoe.html?&primelead=MC42Mg>, 18 - <http://ua.topemulsifier.com/industrial-mixer-blender/industrial-powder-mixer-machine.html>, 19 - <https://prom.ua/p1438043462-avtomaticheskij-rotornyj-tabletochnyj.html?&primelead=MC42>, 20 - <https://www.directindustry.com.ru/prod/jornen-machinery-co-ltd/product-117985-1955885.html>

7.2. Опис технологічного процесу виробництва ЛЗ

До технологічної схеми відносяться допоміжні роботи (санітарна підготовка виробництва та підготовка вентиляційного повітря), а також технологічний процес (попередня обробка культуральної рідини, відокремлення біомаси, осадження етанолом, промивання/розбавлення осаду, сушіння).

Технологічна та апаратурна схеми представлені в *графічній частині* роботи.

7.2.1. Опис допоміжних робіт

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

ДР 1.1 Підготовка мийних та дезінфікувальних засобів

ДР 1.1.1 Приготування мийного розчину Ekfil CIP DEZ.

Для миття обладнання використовують засіб Ekfil CIP DEZ. Для миття всього нашого обладнання достатньо буде приготувати близько 3 м3 робочого розчину. У збірник на 5 м3 додають 1,5 л концентрованого розчину. Після чого, за допомогою вагового дозатора доливають 2998,5 л питної води. Вмикають мішалку та перемішують.

ДР 1.1.2 Приготування робочого розчину Мікрасепт.

Для щоденного прибирання приміщень потрібна кількість робочого розчину 0,1% становить 30 л. Для приготування однієї дози дезінфектору у ємність об'ємом 35 л вносять 30 мл дезрозчину, додають 30 л питної води та перемішують до повного розчинення.

За генерального прибирання приміщень необхідна кількість розчину з концентрацією 0,1% становить 40 л. Для приготування однієї порції мийного розчину у переносну емальовану ємність вносять 40 мл Мікрасепту, додають 40 л питної води та перемішують до повного розчинення.

ДР 1.2 Підготовка виробничих приміщень

ДР 1.2.1 Щоденне прибирання.

Щоденне прибирання приміщень проводиться за допомогою мийно-Мікрасепту - деззасобу (від ДР 1.1.2.) концентрацією 0,1%.

ДР 1.2.2 Генеральне прибирання

Для обробки приміщень при ген.прибиранні застосовують розчин Мікрасепт (від ДР 1.1.2.) концентрацією 0,1%. Окремо перевіряється показник мікробного обнасінення поверхонь, значення КУО має бути меншим за 1000.

ДР 1.3 Підготовка обладнання та комунікацій

ДР 1.3.1 Миття та ополіскування обладнання

Для миття обладнання та комунікацій застосовують мийні розчини (від ДР. 1.1.1), підігріті до температури 55 °С.

Саму СІР-мийку під'єднують до розпилювальної головки, вмонтовану в обладнання через гнучкий шланг, та по закінченню приготування мийних розчинів встановлюють режим миття.

Відповідне обладнання з'єднують трубопроводом з мобільною СІР-мийкою. Далі під'єднують розпилювальну форсунку, закривають всю запірну арматуру, окрім подачі миючого засобу. Робочий розчин подають насосом СІР - мийки на миття обладнання у відповідності з виставленим режимом миття: 15 хв промивання, 30 хв миття розчином, 15 хв ополіскування. Мийний розчин циркулюється, і повторно використовується для миття наступного обладнання. Після декількох циклів миття, відпрацьовані мийні розчини та вода передаються на знешкодження.

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 обладнання на герметичність

Закривають усю запірну арматуру ємнісного обладнання і закачують насосом повітря до рівня надлишкового тиску $P = 0,1-0,2$ МПа. Далі перекривають вентиль подачі повітря і фіксують показання манометра на кришці апарату та час витримки (30-60 хв) в операційному журналі. Апарат вважається герметичним, якщо падіння тиску не перевищує 0,01 МПа. В

іншому випадку здійснюють пошук неущільнень за допомогою галогенових течієпошукачів. В апарат вносять невелику кількість легкої галогенвмісної речовини (чотирихлористий карбон), знову закривають усю запірну арматуру. Апарат нагрівають до температури 80 °С і збільшують тиск до 0,2 МПа. Пари галогенвмісної речовини проникають через неущільнення і виявляються у разі наближення щупа течієпошукача до них. Тривалість операції – 1 год. У разі виявлення неущільнень здійснюють їх ліквідацію, після чого проводять повторну перевірку.

ДР 1.3.4 Стерилізація обладнання

Нагрів апарата. Попередньо в сорочку апарата подають пару і прогрівають обладнання до температури 80-90 °С.

Стерилізація. Відкривають усю запірну арматуру на відкритих трубних закінченнях та підведених до апарата комунікаціях, і подають гостру пару безпосередньо в апарат – через нижній спуск, попередньо відкривши вентиль виходу відпрацьованого повітря для видалення повітря з апарату. При досягненні в апараті температури стерилізації 130-135 °С закривають усю запірну арматуру, крім парової, і витримують 1,5 год (тиск 0,15 МПа).

Охолодження. Закривають усю запірну арматуру подачі пари в апарат. Далі у сорочку подають холодну воду. Процес охолодження здійснюють до досягнення температури 30-40 °С і, внаслідок чого, в апараті створюється розрідження, яке врівноважують відкриттям клапану подачі стерильного повітря.

ДР 1.4 Підготовка персоналу

Проводиться навчання персоналу, та санітарно-гігієнічна підготовка у вигляді навчання правил застосування засобів для миття рук, миття обладнання, приміщень, тощо.

ДР 2. Підготовка вентиляційного повітря

Виробництво таблеток, таблеток, покритих оболонкою, капсул, драже здійснюють в приміщеннях, що контролюється за нормами утримання в повітрі мікроорганізмів і механічних часточок.

Очищення повітря, що подається в виробниче приміщення класу чистоти-D проводять по 2-х ступеневій системі: попередня і тонка.

На першому місці застосовуються фільтри типу ФЯУБ або сухі рулонні фільтри типу ФРП. На другий – фільтри НЕРА.

У повітропроводах встановлені такі фільтри:

1 ступінь - на входах в кондиціонери або приточну камеру;

2 ступінь - безпосередньо перед пристроями, що розділяють повітря по приміщеннях.

У виробничих приміщеннях передбачений десятикратний обмін повітря.

Повітря ззовні, що надходить в приточні установки, попередньо очищається, а потім за допомогою радіальних вентиляторів надходить в виробниче приміщення через фільтри тонкого очищення.

Продуктивність приточних установок від 6,0 до 30,0 тис. м³/год по повітрю, повний тиск ($1,4 \pm 0,4$) кПа.

Попередня очистка повітря від пилу здійснюється в коміркових фільтрах марки ФЯУБ через пружне скловолокно марки ФСВУ. Опір від 40 до 150 Па. Ефективність очищення 80 %.

В якості фільтрів тонкої очистки використовують фільтри НЕРА з фільтруючим матеріалом марки ФПП-15-1.5. В процесі експлуатації фільтри тонкої очистки не піддаються обробці і з часом підлягають заміні на нові. Заміну фільтруючого матеріалу роблять у міру його забруднення відповідно до показників диференційного манометра, яким вимірюють різницю тиску повітря, що надходить на фільтр і виходить після фільтрації. Після установки нових фільтрів НЕРА їх продувають протягом 4-6 годин.

Внутрішні, зовнішні поверхні фільтрокамер і повітропроводів мають покриття, яке дозволяє їх обробляти дезінфікуючим розчином, що складається з 3 % - го розчину перекису водню і 0,5 % - го рідкого миючого засобу.

Поверхні повітропроводів періодично обробляють згідно з робочими інструкціями. Обробку поверхні повітропроводів проводять вкінці зміни або робочого дня дезінфікуючим розчином.

Генеральну обробку проводять після закінчення виробничого циклу (не рідше 1 разу на місяць) шляхом розпилювання дезінфікуючого розчину з подальшим обмиванням водою і сушкою поверхні.

Вентеляційні установки працюють безперервно протягом всього робочого часу персоналу.

Контроль мікробної контамінації повітря у виробничих приміщеннях проводить мікробіолог за допомогою прибору системи Кротова не рідше, ніж один раз на тиждень під час виробничого процесу, і 1 раз на 2 тижні за 1,0-1,5 години до початку роботи. Максимально допустима кількість живих мікроорганізмів становить 200 КУО/м³. Контроль вмісту механічних часточок в повітрі робочої зони під час виробничого процесу не передбачений.

Наявність в повітрі виробничих приміщень спорових мікроорганізмів не допускається.

7.2.2. Опис основних стадій процесу виробництва ЛЗ

ТП 3. Зберігання культуральної рідини

Культуральну рідину зберігають у збірнику при 4-8 °С для подальшого відділення та очищення альгінату.

ТП 4. Попередня обробка культуральної рідини

Культуральну рідину подають у ємність на 15 м³. За допомогою вагового дозатора доливають воду питну у співвідношенні 1:1. Включають мішалку та перемішують 30 хв до повної гомогенізації.

ТП 5. Відокремлення біомаси

Отримана суспензія подається до проточної центрифуги. Вмикається режим 10000 об/хв на 30 хвилин. Близько 102 кг біомаси подається на знежкодження. Отриманий супернатант подається до наступної стадії.

ТП 6. Випаровування

У вакуум-сушильну камеру в ручну подається супернатант. Встановлюється режим випаровування 120 °С. Зменшення об'єму супернатанту має становити в 5 раз. Випаровування триває 12 годин. Після випаровування рідина подається до ємності (12 м³).

ТП 7. Осадження альгінату

До супернатанту додається 96-% етанол у співвідношенні 1:3. Відстоювання на протязі 12 годин при 4 °С.

ТП 8. Відокремлення осаду

Після відстоювання, отриманий осад подається на центрифугування, 2500 об/хв на 20 хв. Розчин на регенерацію, осад подається до наступної ємності (110 л).

ТП 9. Суспендування осаду

Отриманий осад суспендують за допомогою 96-% розчину етанолу у співвідношенні 1:1. Час процесу - 30 хв.

ТП 10. Центрифугування суспензії

Суспензію центрифугують на 2500 об/хв на 15 хв. Отриманий осад піддають подальшій обробці.

ТП 11. Конвективне сушіння

Альгінат подають на конвективну сушарку. Встановлюється режим сушіння: 45 °С на 10 год. Отриманий порошок передають на промивання.

ТП 12. Розчинення порошку

До порошку за допомогою вагового дозатора доливають питну воду у співвідношенні 1:2. Вмикається мішалка для отримання однорідної суспензії.

ТП 13. Повторне центрифугування

Отриману суспензію центрифугують при 2500 об/хв протягом 30 хв. Отриманий осад піддають повторному осадженню.

ТП 14. Повторне осадження

Осад розчиняють у питній воді у співвідношенні 1:1. До суспензії доливають 96-% етанол у співвідношенні 1:3. Осадження триває 12 годин.

ТП 15. Повторне розчинення

Отриманий осад подають до ємності на 100 л. За допомогою вагового дозатора доливають питну воду у співвідношенні 1:1. Вмикається мішалка для отримання гомогенного розчину.

ТП 16. Ліофільне висушування

Отриманий густий розчин передається на ліофільне сушіння. Розчин розподіляється по робочим пластинам сушки. Вмикається режим сушіння: -18 °С, протягом 24 год.

ТП 17. Подрібнення

Оскільки при висушуванні можуть утворюватись грудочки препарату, необхідно подрібнити майже готовий продукт у однорідний пісок. Для цього отриманий порошок додатково пропускають через мікрмельницю. Ступінь подрібнення має становити ≥ 2 мм. Процес триває протягом 1 год.

ТП 18. Просіювання

Просіювання відбувається через вібросито. Подачу сировини на просіювання, при ввімкненому віброситі, здійснюють періодично вручну совком. Окрім порошку альгілату, окремо просіюють додаткові компоненти (бікарбонат натрію та кальцію карбонат). Просіювання триває близько 2 годин.

ТП 19. Змішування компонентів

За допомогою вагового дозатора зважують 19 кг бікарбонату натрію та 11,5 кг кальцію карбонату. Порошок альгілату та наважки подають до бункера-змішувача. Перемішування триває 1 год.

ТП 20. Таблетування

Готовий порошок піддають таблетуванню (прямому пресуванню). Процес відбувається на роторному таблетпресі. Після виготовлення ЛЗ піддається контролю. Процес триває 4 години.

ТП 21. Пакування, маркування, фасування

Пакування таблеток відбувається спочатку у блістери, а потім у вторинну упаковку (коробку) з супутнім інформаційним листком. Процес відбувається за допомогою автоматизованої пакувальної машини. Час пакування – 7 годин.

7.3. Контроль ділянки виробництва ЛЗ

Карта постадійного контролю представлена в таблиці 7.2

Таблиця 7.2.

Карта постадійного контролю виробництва

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. Приготування мийного розчину Ekfil CIP DEZ	Ekfil CIP DEZ, концентрація	Хімічний метод	Після повного перемішування	C=0,5%
Кх 1.1.2. Приготування дезінфікуючого розчину Мікросепт	Мікросепт, концентрація	Хімічний метод	Після повного перемішування	C=0,1%
Кт 1.2.1. Щоденне прибирання	Прибирання, пил, бруд	Візуальний	Після прибирання	Відсутність пилу та бруду
Кт 1.2.2. Генеральне прибирання	Прибирання, пил, бруд, мікробіологічний показник	Візуальний, мікробіологічний метод	Після прибирання	Відсутність пилу та бруду, КУО/см ³ ≤ 1000
Кт 1.3.1. Миття та обполіскування обладнання	Температура, час	Термометр, годинник	Під час миття	τ=60 хв, t= 55 °C

Продовження табл. 7.2

1	2	3	4	5
Кт 1.3.3 Перевірка обладнання на герметичність	Час, тиск	Годинник, манометр	Під час перевірки	$\tau=30-60$ хв, $P=0,1 - 0,2$ МПа
Кт 1.3.4. Стерилізація обладнання	Температура, час, тиск	Термометр, годинник, манометр	Під час стерилізації	$t=130-135$ °С $\tau=1,5$ год, $P=0,15$ МПа
Кт, Км 2.2. Підготовка вентиляційного повітря	Атмосферне повітря, ступінь чистоти повітря на виході з фільтру, кількість життєздатних клітин	Аналіз повітря до і після фільтрації	До та після проходження повітря через фільтр грубого очищення	$E=80$ % $KYO \leq 200$ KYO/м ³ відсутність спорової мікробіоти
Кт 3.1 Зберігання культуральної рідини	Культуральна рідина, температура	Термометр	Під час зберігання КР	$t=4-8$ °С
Кт 4.1 Попередня обробка культуральної рідини	Культуральна рідина, ступінь розведення, час	Годинник	Весь час обробки	$W=1:1$ $\tau=30$ хв
Кт 5.1 Відокремлення біомаси	Культуральна рідина, біомаса, супернатант, час, кількість обертів	Годинник	Весь час роботи центрифуги	$n=10000$ об/хв $\tau=30$ хв
Кт 6.1 Випаровування	Супернатант, температура, час, ступінь випаровування	Термометр, годинник	Весь час роботи вакуум- сушильної камери	$t=120$ °С $\tau=12$ год $K=5$ раз

Продовження табл. 7.2

1	2	3	4	5
---	---	---	---	---

Кт 7.1 Осадження альгілату	Супернатант, температура, час	Термометр, годинник	Весь час осадження	$t = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ $\tau = 12\text{ год}$
Кт 8.1 Відокремлення осаду	Осад, кількість обертів, час	Годинник	Весь час роботи центрифуги	$n = 2500\text{ об/хв}$ $\tau = 20\text{ хв}$
Кт 9.1 Суспендування осаду	Осад, кількість обертів, час	Годинник	Весь час процесу	$n = 500\text{ об/хв}$ $\tau = 30\text{ хв}$
Кт 10.1 Центрифугування суспензії	Осад, кількість обертів, час	Годинник	Весь час роботи центрифуги	$n = 2500\text{ об/хв}$ $\tau = 15\text{ хв}$
Кт 11.1 Конвективне сушіння	Осад, температура, час	Термометр, годинник	Весь час роботи сушарки	$t = 45\text{ }^{\circ}\text{C}$ $\tau = 10\text{ год}$
Кт 12.1 Розчинення порошку	Порошок, ступінь розведення, час	Годинник	Весь час роботи процесу	$W = 1:1$ $\tau = 30\text{ хв}$
Кт 13.1 Повторне центрифугування	Суспензія, кількість обертів, час	Годинник	Весь час роботи центрифуги	$n = 2500\text{ об/хв}$ $\tau = 30\text{ хв}$
Кт 14.1 Повторне осадження	Осад, температура, час	Термометр, годинник	Весь час осадження	$t = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ $\tau = 12\text{ год}$
Кт 15.1 Повторне розчинення	Осад, ступінь розведення, час	Годинник	Весь час роботи процесу	$W = 1:1$ $\tau = 30\text{ хв}$
Кт 16.1 Ліофільне висушування	Суспензія, температура, час, вологість	Термометр, годинник, галогеновий аналізатор	Весь час роботи сушарки, вимірювання вологості після сушіння	$t = -18\text{ }^{\circ}\text{C}$ $\tau = 24\text{ год}$ $\phi \leq 7\%$

Закінчення табл. 7.2

1	2	3	4	5
Кт 17.1	Висушений альгілат,	Годинник,	Кожні 2 години процесу	$\phi \geq 2\text{ мм}$

Подрібнення	час, розмір частинок	мікроскоп		$\tau=1$ год
Кт 18.1 Просіювання	Подрібнений порошок, час, розмір частинок, визначення насипного об'єму	Годинник, мікроскоп, прилад для визначення насипного об'єму	Кожні 2 години процесу	$\varnothing \geq 2$ мм $\tau=2$ год
Кт 19.1 Змішування	Порошок альгілату, бікарбонату натрію, кальцію карбонату, час перемішування	Ваги, годинник, змішувач	Під час процесу	$m_{\text{алгілату}}=30,2$ кг $m_{\text{бікарбонату}}=19$ кг $m_{\text{кальцію}}=11,5$ кг $\tau=1$ год
Кт 20.1 Таблетування	Суміш ЛЗ, розмір таблетки, кількість таблеток, тривалість процесу	Штангельциркуль, годинник	Під час процесу	$d=10$ мм $h=3$ мм К-ть таблеток = 121,4 тис. $\tau=4$ год
Кт 21.1 Пакування, маркування, фасування	Таблетки, блістери, коробки, час пакування	Годинник	Під час процесу	К-ть блістерів = 12 140 К-ть упаковок = 6070 $\tau=7$ год

ВИСНОВКИ

1. Щороку помітно зростання статистики хвороби ГЕРХ та її поширення по всьому світу. Звісно, в залежності від країни та традицій дане захворювання має нерівномірне розповсюдження, але той факт, що кількість людей, яка страждає від нього лише збільшується, призводить до потреби відповідних лікарських засобів.

2. Альгінат, або ж альгінова кислота, екзополісахарид, який доволі часто виступає як компонент, а то й діюча речовина різних лікарських засобів, має високий функціонал, а тому й використовується й до нині. Окрім того, альгінат є основною активною фармацевтичною речовиною лікарського засобу Гавіскон, який застосовується у боротьбі з ГЕРХ.

3. На основі наведених даних, розраховано річну потребу в препараті для Київської області та вирахована необхідна кількість діючої речовини, яку будуть одержувати біотехнологічним шляхом.

4. Як основний продуцент обрано штам *Pseudomonas mendocina* CCT, оскільки він є економічно вигідним серед інших та синтезує 8,2 г/л екзополісахариду.

5. Як лікарська форма обрано таблетки за їх зручність та перевагу поміж іншими лікарськими формами. Випуск препарату передбачає використання блістерів з 8 лунками та подальшою упаковкою по 16 таблеток в пачці.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Гастроезофагеальна рефлюксна хвороба (ГЕРХ). [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://madagaskar.kiev.ua/gastroezofagealna-reflyuksna-xvorobagerx/?gclid=CjwKCAiAzrWOBhBjEiwAq85QZ9Pe9dKV0xwUj_EHLra_KHFu_JyNes7AAwXxIg23kl43NmsxZBhCoRoC9RMQAvD_BwE
2. Бичков М. А. Поширеність неерозивної гастроезофагеальної рефлюксної хвороби та функціональної печії серед пацієнтів ревматологічного профілю. *Сучасна гастроентерологія*. 2011, 3(59): 39-41.
3. Державний експертний центр МОЗ України. Гастроезофагеальна рефлюксна хвороба. Адаптована клінічна настанова, заснована на доказах. 2013.
4. Kırtel O., Avşar G., Erkorkmaz B. A., Öner E. T. Microbial Polysaccharides as Food Ingredients. *Microbial Production of Food Ingredients and Additives*. 2017: 347–383. doi: 10.1016/b978-0-12-811520-6.00012-x
5. Öner E. T., Microbial production of extracellular polysaccharides from biomass. Springer, Berlin, 2013: 35–56.
6. Öner E. T., Hernández L., Combie J., Review of levan polysaccharide: from a century of past experiences to future prospects. *Biotechnol. Adv.* 2016, 34: 827–844.
7. Marius R., Schmid J., Ruhmann B., Schilling M., Volker S. Controlled production of polysaccharides exploiting nutrient supply for levan and heteropolysaccharide formation in *Paenibacillus* Sp. *Carbohydrate Polymers*. 2016, 148: 326–34. doi: 10.1016/j.carbpol.2016.04.074
8. Anderson L. A., Islam M. A., Prather K. L. J. Synthetic biology strategies for improving microbial synthesis of “green” biopolymers. *Journal of Biological Chemistry*. 2018, 293(14): 5053–5061. doi: 10.1074/jbc.tml117.000368
9. Barcelos M. C. S., Vespermann K. A. C., Pelissari F. M., Molina G. Current status of biotechnological production and applications of microbial exopolysaccharides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2019: 1–21. doi: 10.1080/10408398.2019.1575791.

10. Danalache F., Mata P., Moldão-Martins M., Alves V.D.. Novel mango bars using gellan gum as gelling agent: rheological and microstructural studies. *LWT—Food Sci. Technol.* 2015, 62: 576–583. doi: 10.1080/10408398.2019.1575791
11. Moreira M.R., Tomadoni B., Martín-Belloso O., Soliva-Fortuny R. Preservation of fresh-cut apple quality attributes by pulsed light in combination with gellan gum-based prebiotic edible coatings. *LWT—Food Sci. Technol.* 2015, 64: 1130–1137.
12. Xiao M., Feng F., Lu L. Preparation method of levan-contained yoghurt. 2014.
13. Jakob F., Pfaff A., Novoa-Carballal R., Rübsam H., Becker T., Vogel R.F. Structural analysis of fructans produced by acetic acid bacteria reveals a relation to hydrocolloid function. *Carbohydr. Polym.* 2013, 92: 1234– 1242.
14. Vincent S., Brandt M., Cavadini C., Hammes W.P., Neeser J.R., Waldbuesser S. Levan-producing *Lactobacillus* strain and method of preparing human or pet food products using the same. 2005.
15. Bondarenko O.M., Ivask A., Kahru A., Vija H., Titma T., Visnapuu M., Joost U., Pudova K., Adamberg S., Visnapuu T. Bacterial polysaccharide levan as stabilizing, non-toxic and functional coating material for microelement-nanoparticles. *Carbohydr. Polym.* 2016, 136: 710–720.
16. Arrizon J., Hernández-Moedano A., Oner E.T., González-Avila M., In vitro prebiotic activity of fructans with different fructosyl linkage for symbiotics elaboration. *Int. J. Probiotics Prebiotics.* 2014, 9: 69–76.;
17. K. Eddouaouda, S. Mnif, A. Badis, et al. Characterization of a novel biosurfactant produced by *Staphylococcus* sp. strain 1E with potential application on hydrocarbon bioremediation. *J. Basic. Microbiol.* 2012, 52: 408–418. doi: 10.1002/jobm.201100268
18. . Srikanth R., Reddy C. H. S. S., Siddartha G., Ramaiah M. J., Uppuluri K. B. Review on production, characterization and applications of microbial

levan. *Carbohydrate Polymers*. 2015, 120: 102–114. doi: 10.1016/j.carbpol.2014.12.003

19. Nanjani S.G. Diversity and EPS production potential of halotolerant bacteria from Veraval and Dwarka. *IOSR J. Pharm. Biol. Sci.* 2012, 2: 20–25. doi: 10.9790/3008-0222025.

20. . Donot F., Fontana A., Baccou J. C., Schorr-Galindo S. Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. *Carbohydrate Polymers*. 2012, 87 (2): 951–962. doi:10.1016/j.carbpol.2011.08.083.

21. Osmałek T., Froelich A., Tasarek S., Application of gellan gum in pharmacy and medicine. *Int. J. Pharm.* 2014, 466: 328–340 doi: 10.1016/J.IJPHARM.2014.03.038.

22. Osmałek T., Froelich A., Tasarek S., Application of gellan gum in pharmacy and medicine. *Int. J. Pharm.* 2014, 466: 328–340 doi: 10.1016/J.IJPHARM.2014.03.038.

23. BakryA.M., FangZ., N.I.FY., ChengH., ChenY.Q., LiangL., Stability of tuna oil and tuna oil/ peppermint oil blend microencapsulated using whey protein isolate in combination with carboxymethyl cellulose or pullulan. *Food Hydrocoll.* 2016, 60: 559–571.

24. Pattanayaifying R., Aran H., Cutter C.N. Incorporation of nisin Z and lauric arginate into pullulan films to inhibit foodborne pathogens associated with fresh and ready-to-eat muscle foods. *Int. J. Food Microbiol.* 2015. 207: 77–82

25. Trinetta V., Cutter C.N. Pullulan: a suitable biopolymer for antimicrobial food packaging applications A2. In: Barros-Velázquez, J. (Ed.), *Antimicrobial Food Packaging*. Academic Press, San Diego. 2016.

26. Wu S., Lu M., Wang S. Effect of oligosaccharides derived from *Laminaria japonica*-incorporated pullulan coatings on preservation of cherry tomatoes. *Food Chem.* 2016, 199: 296–300.

27. Trinetta, V. The Application of Edible and Active Pullulan Coatings on Foods. *Reference Module in Food Science*. 2017. doi: 10.1016/b978-0-08-100596-5.21129-3.

28. Tomulescu C., Stoica R., Sevcenco, C., Cășărică A., Moscovici M., Vamanu A. Levan-a mini review. *Sci. Bull. Ser. F. Biotechnol.* 2016, 20: 309-317.
29. Sezer A. D., Kazak H., Öner E. T., Akbuğa J. Levan-based nanocarrier system for peptide and protein drug delivery: Optimization and influence of experimental parameters on the nanoparticle characteristics. *Carbohydrate Polymers.* 2011, 84: 358-363.
30. Ates O. Systems biology of microbial exopolysaccharides production. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology.* 2015, 3: 200, doi: 10.3389/fbioe.2015.00200).
31. Abou-Taleb K. A., Abdel-Monem M. O., Yassin M. H., Draz A. A., Nutritional factors affecting levan production by *Bacillus* sp. V8 strain isolated from rhizosphere bean (*Viceafaba*) plant. *Journal of Agricultural Technology.* 2014, 10 (4): 899-914.
32. Srikanth R., Reddy C. H. S. S. S., Siddartha G., Ramaiah M. J., Uppuluri K. B. Review on production, characterization and applications of microbial levan. *Carbohydrate Polymers.* 2015, 120: 102–114. doi:10.1016/j.carbpol.2014.12.003
33. Moosavi-Nasab M., Layegh B., Aminlary L., Hashemi M. B., Microbial production of levan using date syrup and investigation of its properties, *International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering.* 2010, 4(8): 603-609.
34. Dahech I., Harrabi B., Hamden K., Feki A., Mejdoub H., Belghith H., Belghith K. S. *International Journal of Biological Macromolecules.* 2013, 58: 281-286;
35. Dahech I., Belghith K. S., Hamden K., Feki A., Belghith H., Mejdoub H. Antidiabetic activity of levan polysaccharide all oxan-induced diabetic rats. *International Journal of Biological Macromolecules.* 2011, 49: 742-746;
36. Sarilmiser H. K., Öner E. T.. Investigation of anti-cancer activity of linear and aldehyde-activated levan from *Halomonas smyrnensis* AAD6T. *Biochemical Engineering Journal.* 92, 28-34;

37. Dahech I., Harrabi B., Hamden K., Feki A., Mejdoub H., Belghith H., Belghith K.S. Antioxidant effect of nondigestible levan and its impact on cardiovascular disease and atherosclerosis. *Int. J. Biol. Macromol.* 2013, 58: 281–286.
38. Belghith K. S., Dahech I., Hamden K., Feki A., Mejdoub H., Belghith H. Hypolipidimic effect of diet supplementation with bacterial levan in cholesterol-fed rats. *International Journal of Biological Macromolecules.* 2012, 50: 1070-1074.
39. Abdel-Fattah A. M., Gamal-Eldeen A. M., Helmy W. A., Esawy M. A. Antitumor and antioxidant activities of levan and its derivative from the isolate *Bacillus subtilis* NRC1aza. *Carbohydrate polymers.* 2012, 89(2), 314-32.
40. Esawy M. A., Ahmed E. F., Helmy W. A., Mansour N. M., El-Senousy W. M., El-Safty M. M. Production of levansucrase from novel honey *Bacillus subtilis* isolates capable of producing antiviral levans. *Carbohydrate Polymers.* 2011, 86, 823-830.
41. Abou-Taleb K. A., Abdel-Monem M. O., Yassin M. H., Draz A. A. Nutritional factors affecting levan production by *Bacillus* sp. V8 strain isolated from rhizosphere bean (*Viceafaba*) plant. *Journal of Agricultural Technology.* 2014. 10(4): 899-914.
42. . Divya J. M., Sugumaran K. R. Fermentation parameters and condition affecting levan production and its applications. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research.* 2015, 7(2): 861-865).
43. Moscovici M. Present and future medical applications of microbial exopolysaccharides. *Frontiers in microbiology.* 2015: 1012.
44. Rana, S., Upadhyay L. S. B. Microbial exopolysaccharides: Synthesis pathways, types and their commercial applications. *International Journal of Biological Macromolecules.* 2020. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.04.084.
45. Saldías C., Velásquez L., Quezada C., Leiva A., Physicochemical assessment of dextrang-poly(ϵ -caprolactone) micellar nano aggregates as drug nano

carriers. *Carbohydr.Polym.* 2015, 117: 458–467 doi: 10.1016/J.CARBPOL.2014.09.035.

46. Freikowski D., Winter J., Gallert C., Hydrogen formation by an arsenate reducing *Pseudomonas putida*, isolated from arsenic-contaminated ground water in West Bengal, India. *Appl.Microbiol.Biotechnol.*2010, 88: 1363–1371.

47. Prezotti B.S.F., Cury R.C. Evangelista. Mucoadhesive beads of gellan gum/pectinint ended to controlled delivery of drugs. *Carbohydr.Polym.* 2014, 113: 286–295 .doi:10.1016/J.CARBPOL.2014.07.021.

48. T.H. Tran, J.Y. Choi, T. Ramasamy, et al. Hyaluronicacid-coated solid lipid nanoparticles for targeted delivery of vorinostatto CD44 overexpressing cancer cells. *CarbohydrPolym.*2014, 114:407–415. doi: 10.1016/J.CARBPOL.2014.08.026.

49. SinghR. S., KaurN., RanaV., KennedyJ. F. Pullulan: A novel molecule for biomedical applications. *Carbohydrate Polymers.* 2017,171:102-121. doi:10.1016/j.carbpol.2017.04.089].

50. C.Delattre, G. Pierre, C. Gardarin, et al., Antioxidant activities of a polyglucuronic acid sodium salt obtained from TEMPO-mediated oxidation of xanthan, *Carbohydr. Polym.* 2015. 116: 34–41. doi: 10.1016/J.CARBPOL.2014.04.054.

51. Zhang T., Li R., Qian H., Mu W., Miao M., Jiang B., 2014. Biosynthesis of levan by levansucrase from *Bacillus methylotrophicus* SK 21.002, *CarbohydratePolymers.* 101: 975-981.

52. Gupta S. K., Das P., Singh S. K., Akhtar M. S., Meena D. K., Mandal S. C. Microbial levan, an ideal prebiotic and immunonutrient in aquaculture, *World Aquaculture.* 2011: 61-66. doi: 10.1142/9789814360807-0004.

53. Merve E. "Bioactivity of levan based surfaces." (2014).

54. Pirog T., Ivakhniuk M., Comparative characteristics of ethapolan and xanthan exopolysaccharides as agents for the increasing secondary oil extraction. *Ukrainian journal of food science.* 2018, 6 (1) : 62-71.

55. M. Taran, S. Etemadi, M. Mohsen. Microbial levan biopolymer production and its use for the synthesis of an antibacterial iron (II,III) oxide–levan nano composite. 2017, 134 (12). doi: 10.1002/app.44613
56. Feng J, Gu Y, Han L, Bi K, Quan Y, Yang C, et al. Construction of a *Bacillus amyloliquefaciens* strain for high purity levan production. *FEMS Microbiol. Lett.* 2015; 362. 10.1093/femsle/fnv079.
57. Gu Y, Zheng J, Feng J, Cao M, Gao W, Quan Y, Dang Y, Wang Y, Wang S, Song C. Improvement of levan production in *Bacillus amyloliquefaciens* through metabolic optimization of regulatory elements. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2017, 101: 4163-4174. doi. 10.1007/s00253-017-8171-2
58. Sun P., Wang J. Q., Zhang H. T. "Effects of *Bacillus subtilis* natto on performance and immune function of preweaning calves." *Journal of Dairy Science.* 2010: 5851-5855.
59. Wu F.C, Chou S.Z, Shih L. Factors affecting the production and molecular weight of levan of *Bacillus subtilis* natto in batch and fed-batch culture in fermenter. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 2013, 44, 846-853. doi: 10.1016/j.jtice.2013.03.009
60. Gojgic-Cvijovic G. D., Jakovljevic D. M., Loncarevic B. D., Todorovic N. M., Pergal M. V., Ciric J., Vrvic M. M. Production of levan by *Bacillus licheniformis* NS032 in sugar beet molasses-based medium. *International journal of biological macromolecules*, 121, 142-151. doi: 10.1016/j.jbiomac.2018.10.019
61. Ko H., Bae J. H., Sung B. H., Kim M. J., Kim C. H., Oh B. R., Sohn J. H. Efficient production of levan using a recombinant yeast *Saccharomyces cerevisiae* hypersecreting a bacterial levansucrase. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology.* 2019, 46 (11): 1611-1620. doi: 10.1007/s10295-019-02206-1
62. Kikuchi H, Sakurai H, Nagura T, Aritsuka T, Tomita F, Yokota A. One-pot conversion of levan prepared from *Serratia levanicum* NN to difructose

anhydride IV by *Arthrobacter nicotinovorans* levan fructotransferase. *J. Biosci. Bioeng.* 2010, 109: 240-243. doi: 10.1016/j.jbiosc.2009.09.041

63. Ferreira J., Santos V. A. Q., Calegari G. C., Cruz C. H. G.). Assessment of levan production from sucrose by *Zymomonas mobilis* CCT 4494. *Orbital: The Electronic Journal of Chemistry.* 2019, 11(6): 394-398. doi: 10.17807/orbital.v11i6.1229

64. Falconer D. J, Mukerjea R., Robyt J. F. Biosynthesis of dextrans with different molecular weights by selecting the concentration of *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMC dextransucrase, the sucrose concentration, and the temperature. *Carbohydr. Res.* 2011, 346 (2): 280-284. doi: 10.1016/j.carres.2010.10.024

65. Kanimozhi J., Moorthy I. G., Sivashankar R., Sivasubramanian V. Optimization of dextran production by *Weissella cibaria* NITCSK4 using Response Surface Methodology-Genetic Algorithm based technology. *Carbohydr. Polym.* 2017, 174: 103-110. doi: 10.1016/j.carbpol.2017.06.021.

66. Aman A., Siddiqui N. N., Qader S. A. U. Characterization and potential applications of high molecular weight dextran produced by *Leuconostoc mesenteroides* AA1. *Carbohydrate Polymers.* 2012.87(1),P. 910–915. doi: 10.1016/j.carbpol.2011.08.094

67. Kirtel O., Avşar G., Erkorkmaz B. A., ÖnerE. T. Microbial Polysaccharides as Food Ingredients. *Microbial Production of Food Ingredients and Additives.* 2017: 347–383. doi: 10.1016/b978-0-12-8111520-6.00012-x

68. Zhou Q., Feng F., Yang Y., Zhao F., Du R., Zhou Z., Han Y. Characterization of a dextran produced by *Leuconostoc pseudomesenteroides* XG5 from homemade wine. *International Journal of Biological Macromolecules.* 2018., 107: 2234–2241. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.10.098

69. Yang, Y., Peng, Q., Guo, Y., Han, Y., Xiao, H., Zhou, Z. Isolation and characterization of dextran produced by *Leuconostoc citreum* NM105 from manchurian sauerkraut. *Carbohydrate Polymers,* 2015, 133, 365–372. doi:10.1016/j.carbpol.2015.07.061.

70. Han J., Hang F., Guo B., Liu, Z., You C., & Wu, Z. (). Dextran synthesized by *Leuconostoc mesenteroides* BD1710 in tomato juice supplemented with sucrose. *Carbohydrate Polymers*. 2015, 112, 556–562. doi: 10.1016/j.carbpol.2014.06.035
71. Kirtel O., Avşar G., Erkorkmaz B. A., Öner E. T. Microbial Polysaccharides as Food Ingredients. *Microbial Production of Food Ingredients and Additives*. 2017: 347–383. doi: 10.1016/b978-0-12-811520-6.00012-x
72. Choudhury A. R., Sharma N., Prasad G. S. Deoiledjatropha seed cake is a useful nutrient for pullulan production. *Microbial Cell Factories*. 2012, 11: 39.
73. Sharma N., Prasad G. S., Choudhury A. R. Utilization of corn steep liquor for biosynthesis of pullulan, an important exopolysaccharide. *Carbohydrate Polymers*. 2013, 93: 95–101.
74. Wang D., Ju X., Zhou D., Wei G. Efficient production of pullulan using rice hull hydrolysate by adaptive laboratory evolution of *Aureobasidium pullulans*. *Bioresource Technology*. 2014, 164: 12–19
75. Sheoran S. K., Dubey K. K., Tiwari D. P., Singh B. P. Directive Production of Pullulan by Altering Cheap Source of Carbons and Nitrogen at 5 L Bioreactor. 2012. doi: 10.5402/2012/867198.
76. Chen G., Zhu Y., Zhang G., Liu H., Wei Y., Wang P. et al. Optimization and characterization of pullulan production by a newly isolated high-yielding strain *Aureobasidium melanogenum*. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*. 2019: 1–10. doi: 10.1080/10826068.2019.1591988
77. Zhang J., Dong Y. C., Fan L. L., Jiao Z. H., Chen Q. H. Optimization of culture medium compositions for gellan gum production by a halobacterium *Sphingomonas paucimobilis*. *Carbohydrate polymers*. 2015, 115: 694–700. doi: 10.1016/j.carbpol.2014.09.029
78. Huang J., Zhu S., Li C., Zhang, C., Ji, Y. Cost-effective optimization of gellan gum production by *Sphingomonas paucimobilis* using corn steep liquor. *Preparative biochemistry & biotechnology*. 2020, 50(2): 191–197.

79. Kivılcımdan Moral, Ç., Yıldız M. Alginate production from alternative carbon sources and use of polymer based adsorbent in heavy metal removal. *International Journal of Polymer Science*. 2016. doi: 10.1155/2016/7109825.
80. Hendawy W. S., El Kanani Y. M., El Batawy O. I., OI El Mongy T. M. Optimization the alginate production conditions in sweet whey medium by *Azotobacter chroococcum*. *Arab. Universities Journal of Agricultural Sciences*. 2019, 27(1): 479-489.doi: 10.21608/AJS.2019.43586
81. Bouchotroch S, Quesada E, del Moral A, et al. Halomonasmaurasp. nov., a novel moderately halophilic, exopolysaccharide-producing bacterium. *International J SystEvolMicrobiol*. 2001;51:1625–1632.
82. Mata J. A., Bejar V., Llamas I., et al. EPS produced by the recently described halophilic bacteria *Halomonas ventosae* and *Halomonas anticariensis*. *Res. Microbiol*. 2006, 157(9):827–83.
83. Amjres H, Bejar V, Quesada E, et al. Characterization of haloglycan, an exopolysaccharide produced by *Halomonas stenophila* HK30. *Int. J. Biol. Macromols*. 2015, 72: 117–124.
84. Кичемазова Н.В. Экзополисахариды бактерий родов *Xanthobacter* и *Ancylobacter*: характеристика и их биологические свойства. Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Спец. 03.02.03 – микробиология. 2019.
85. Esmailnejad-Moghadam B., Mokarram R. R., Hejazi M. A., Khiyabani M. S., Keivaninahr F. Low molecular weight dextran production by *Leuconostoc mesenteroides* strains: Optimization of a new culture medium and the rheological assessments. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*. 2019:100181. doi:10.1016/j.bcdf.2019.100181.
86. Lule K. V., Singh R., Pophaly D. S., Poonam K. S. Production and structural characterisation of dextran from an indigenous strain of *Leuconostoc mesenteroides* BA08 in Whey. *International Journal of Dairy Technology*. 2016, 69: 1–12.

87. Sawale S., Lele S. S. Statistical optimization of media for dextran production by *Leuconostoc* sp., isolated from fermented idli batter. *Food Science and Biotechnology*. 2010, 19(2): 471–478. doi: 10.1007/s10068-010-0066-2.
88. Pirog T. P., Voronenko A. A., Ivakhniuk M. O. Intensification of microbial exopolysaccharide ethapolan biosynthesis on mixture of molasses and sunflower oil. *Biotechnologia Acta*. 2017, 10(4).
89. Sharma N, Prasad GS, Choudhury AR. Utilization of corn steep liquor for biosynthesis of pullulan, an important exopolysaccharide. *Carbohydr Polym*. 2013, 93:95–101
90. Cheng K. C. Enhanced production of microbial extracellular polysaccharides and materials property analysis. Dissertation for the Degree of Doctor of Philosophy. 2010.
91. Gupta P., Gupta H., Poluri K. M. Biomedical applications of polysaccharide-based nanocomposites from fungal origin. In *Microbial and Natural Macromolecules*. Academic Press, 2021.pp. 233-272.
92. Jiang L., Wu S. Effect of different nitrogen sources on activities of UDPG-pyrophosphorylase involved in pullulan synthesis and pullulan production by *Aureobasidium pullulans*. *Carbohydrate polymers*. 2011, 86 (2): 1085-1088.
93. Sugumaran K. R., Ponnusami V. Statistical modeling of pullulan production and its application in pullulan acetate nanoparticles synthesis. *International journal of biological macromolecules*. 2015. 81: 867-876.
94. Özcan E., Öner E. T. Microbial production of extracellular polysaccharides from biomass sources. *Polysaccharides: Bioactivity and Biotechnology*. 2015: 161-184.
95. Göksungur Y., Uzunoğulları P., Dağbağlı S. Optimization of pullulan production from hydrolysed potato starch waste by response surface methodology. *Carbohydrate polymers*. 2011, 83(3): 1330-1337.
96. Ponnusami V., Gunasekar V. Production of pullulan by microbial fermentation. *Polysaccharides: Bioactivity and Biotechnology*. Springer Cham Heidelberg New York Dordrecht London, 2014: 1-13.

97. Kirtel O., Avşar G., Erkorkmaz B. A., Öner E. T. Microbial Polysaccharides as Food Ingredients. *Microbial Production of Food Ingredients and Additives*. 2017: 347–383. doi: 10.1016/b978-0-12-811520-6.00012-x
98. Ananya M., Prasad G. S. Choudhury A. R. Cost effective production of pullulan from agri-industrial residues using response surface methodology. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2014, 64: 252-256.
99. Cheng K. C., Demirci A., Catchmark J.M. Continuous pullulan fermentation in a biofilm reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2011, 90: 921–7.
100. Abou-taleb K. A., Abdel-Monem M. O., Yassin M. H., Draz A. A. Production, purification and characterization of levan polymer from *Bacillus lentus* V8 strain. *Microbiology Research Journal International*. 2015: 22-32.
101. Moosavi-Nasab M., Layegh B., Aminlari L., Hashemi M. B. Microbial production of levan using date syrup and investigation of its properties. *World Academy of Sciences, Engineering and Technology*. 2010, 44: 1248-54.
102. de Oliveira R. A., Daros E., Zambon J. L. C., Weber H., Ido O. T., Bessalho-Filho J. C., da Silva D. K. T. Área foliar em três cultivares de cana-de-açúcar e sua correlação com a produção de biomassa. *Pesquisa Agropecuária Tropical*. 2007, 37 (2): 71-76.
103. Santos-Moriano P., Fernandez-Arrojo L., Poveda A., Jimenez-Barbero J., Ballesteros A. O., Plou F. J. Levan versus fructooligosaccharide synthesis using the levansucrase from *Zymomonas mobilis*: effect of reaction conditions. *Journal of molecular catalysis B: Enzymatic*. 2015, 119, 18-25.
104. Abbamondi G. R., Suner S., Cutignano A., Grauso L., Nicolaus B., Öner E. T., Tommonaro G. Identification of N-Hexadecanoyl-L-homoserine lactone (C16-AHL) as signal molecule in halophilic bacterium *Halomonas smyrnensis* AAD6. *Annals of Microbiology*. 2016, 66 (3): 1329-1333.
105. Ürküt, Z., Dağbaşı, S., & Göksungur, Y. Optimization of pullulan production using Ca-alginate-immobilized *Aureobasidium pullulans* by response surface methodology. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*:

International Research in Process, Environmental & Clean Technology. 2007, 82(9): 837-846.

106. Silbir S., Dagbagli S., Yegin S., Baysal T., Goksungur Y. Levan production by *Zymomonas mobilis* in batch and continuous fermentation systems. *Carbohydrate polymers*. 2014, 99: 454-461.

107. F. Pardelha, M. G. E. Albuquerque, M. A. M. Reis, J. M. L. Dias, R. Oliveira. Flux balance analysis of mixed microbial cultures: application to the production of polyhydroxyalkanoates from complex mixtures of volatile fatty acids. *Journal of Biotechnology*. 2012, 162, (2-3): 336–345.

108. J.-H. Lin, W.-P. Sung, T.-Y. Chen, Y.-J. Lin, J.-C. Kuo. Applying the Taguchi method in improving the production of bacterial cellulose. *Journal of Biobased Materials and Bioenergy*. 2012, 6 (6): 610–613.

109. S. Kalogiannis, G. Iakovidou, M. Liakopoulou-Kyriakides, D. A. Kyriakidis, G. N. Skaracis. Optimization of xanthan gum production by *Xanthomonas campestris* grown in molasses. *Process Biochemistry*. 2013, 39 (2): 249–256.

110. I. Muhammadi, M. Afzal. Optimization of water absorbing exopolysaccharide production on local cheap substrates by *Bacillus* strain CMG1403 using one variable at a time approach. *Journal of Microbiology*. 2014. 52 (1): 44–52.

111. Y. O. Loginov, G. G. Khudaigulov, S. P. Chetverikov, A. I. Melent'ev, O. N. Loginov. Biopolymer of alginate nature with a predominance of L-guluronic acid. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2011, 47 (3): 311–314.

112. G. S. Kiran, A. N. Lipton, S. Priyadarshini et al. Antiadhesive activity of poly-hydroxy butyrate biopolymer from a marine *Brevibacterium casei* MSI04 against shrimp pathogenic vibrios. *Microbial Cell Factories*. 2014, 13 (114).

113. S. K. Bhatia, N. Kumar, R. K. Bhatia. Stepwise bioprocess for exopolysaccharide production using potato starch as carbon source. *3 Biotech*. 2015. 5(5):735–739.

114. Neera, K. V. Ramana, H. V. Batra. Occurrence of cellulose-producing *Gluconacetobacter* spp. In fruit sample sand kombucha tea, and

production of the biopolymer. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2015, 176(4): 1162–1173.

115. Pirog T.P., Korzh Yu.V., Ethapolan–microbial exopolysaccharide multifunctional assignment. *Biopolimers and Cell*. 2006, 22(3): 171-185.

116. Pirog T. P., Kuzminskaya Yu. V., Influence of the producer cultivation conditions on synthesis, physical and chemical properties of exopolysaccharides. *Biopolimers and Cell*. 2003, 19(5): 393-413.

117. Pirog T.P., Korzh Yu.V., Lashchuk N.V., Zborovska B.M., Synthesis of microbial exopolysaccharide ethapolan on ethanol and molasses mix. *Mikrobiol Z*. May-Jun 2006, 68(3):3-15.

118. Pirog T.P., Kovalenko M.O., Utilization of the mix of growth and nongrowth substrates by microorganisms. *Mikrobiol Z*. Nov-Dec 2004, 66(6):80-100.

119. Voronenko A.A., Ivakhniuk M.O., Pirog T.P., Exopolysaccharide ethapolan synthesis on molasses and waste oil. *Food industry*. 2016, 20:49-54.

120. Voronenko A.A., Ivakhniuk M.O., Pirog T.P., Features of polysaccharide ethapolan synthesis on molasses and sunflower oil mixture. *Scientific works of University of Food Technologies*. 2016, 22(6):45-51.

121. Альгинаты в медицине и косметологии. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://eldancosmetics.ru/training/article/alginyaty-v-meditsine-i-kosmetologii/>

122. Суходуб Л. Ф., Рошупкін А. О., Суходуб Л. Б., Глущенко Н. В. Наноструктуровані матеріали на основі гідроксиапатиту та альгілату для медицини. *Журнал нано- та електронної фізики*. 2017, 9(4): 04017. doi: 10.21272/jnep.9(4).04017.

123. Бордин Д. С., Машарова А. А., Фирсова Л. Д., Кожурина Т. С., Сафонова О. В. Оценка эффективности альгинат-рафтового барьера в лечении гастроэзофагеальной рефлюксной болезни. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2008, (6): 3-5.

124. Передерій В. Г., Чичула Ю. В. Гастрозофагеальна рефлюксна хвороба і підліток. *Ліки України*. 2015, (8): 20-23.

125. Бордин, Д. С. Валитова Э. Р., Эмбутниекс Ю. В., Березина О., Кононова А., Колбасников С., Бор С. Альгинаты в лечении гастроэзофагеальной рефлюксной болезни. *Эффективная фармакотерапия*. 2020, 16(1): 12-19.

126. Бичков М. А., Яхницька М. М. Поширеність гастрозофагеальної рефлюксної хвороби за даними ендоскопічних досліджень. *Здобутки клінічної і експериментальної медицини*. 2017, (2): 38-43.

127. Гавискон двойного действия табл. жев. блистер №24. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://apteka1.net/catalog/medikamenty/gaviskon_dvojnogo_dejstvija_tabl

128. Гавискон мятная суспензия 150 мл. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://doc.ua/apteka/gaviskon-myatnaya-suspenziya-oralnaya-flakon-150-ml>

129. Таблетки как лекарственная форма. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://www.lisyz.ru/tehnologii-proizvodstva/tabletki-kak-lekarstvennaya-forma.html>

130. Гавіскон® м'ятні таблетки. [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://likicontrol.com.ua/%D1%96%D0%BD%D1%81%D1%82%D1%80%D1%83%D0%BA%D1%86%D1%96%D1%8F/?\[8592\]](https://likicontrol.com.ua/%D1%96%D0%BD%D1%81%D1%82%D1%80%D1%83%D0%BA%D1%86%D1%96%D1%8F/?[8592])

131. Державна фармакопея України. Видання 1. Харків, 2001.

132. Розпадання таблеток і капсул. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/1137/rozpadannya-tabletok-i-kapsul>

133. Тест «Розчинення» з використанням апаратів 1, 2, 5, 6. Розпадання таблеток і капсул. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://dlu.com.ua/%D0%A2%D0%B5%D1%81%D1%82-%D0%AB%D0%A0%D0%BE%D0%B7%D1%87%D0%B8%D0%BD%D0%B5%D>

[0%BD%D0%BD%D1%8F%C2%BB-%D0%B7-%D0%B2%D0%B8%D0%BA%D0%BE%D1%80%D0%B8%D1%81%D1%82%D0%B0%D0%BD%D0%BD%D1%8F%D0%BC-%D0%B0%D0%BF%D0%B0%D1%80%D0%B0%D1%82%D1%96%D0%B2-1-2-5-6](#)

134. Методичні вказівки до практичних занять з дисципліни «Нові технології виробництва антибіотиків та лікарських препаратів» освітньо-професійної програми другого (магістерського) рівня вищої освіти зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» усіх форм навчання / Укладач: Головей О.П. – Кам'янське: ДДТУ, 2017. – 18 с.

135. Патент RU2194525C1 РФ. Способ получения биологически активных веществ из ламинарии для медицинских целей / Компанцев В.А., Кайшева Н.Ш., Самокиш И.И., Компанцева Е.В. Опубл. 20.12.2002, Бюл. № 4.

136. Прилад для визначення стираності таблеток EF-2 фірми ELECTROLAB. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.unilab.kiev.ua/catalog/Specialnoe-oborudovanie/PribordlyaopredeleniyaistiraemostitabletokeF2firmyELECTROLAB/>

137. Классификация таблеток. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://transmedteh.com/information/tablets/>

138. Ma L., Wang J., Wang S., Anderson E. M., Lam J. S., Parsek M. R., Wozniak, D. J. Synthesis of multiple *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix exopolysaccharides is post-transcriptionally regulated. *Environmental microbiology*. 2012,14(8): 1995-2005. doi: 10.1111/j.1462-2920.2012.02753.x.

139. Maleki S., Almaas E., Zotchev S., Valla S., & Ertesvåg, H. (2016). Alginate biosynthesis factories in *Pseudomonas fluorescens*: localization and correlation with alginate production level. *Applied and environmental microbiology*. 2016, 82(4): 1227. doi: 10.1128/AEM.03114-15

140. Licciardello G., Caruso A., Bella P., Gheleri R., Strano C. P., Anzalone A., et al. The LuxR regulators PcoR and RfiA co-regulate antimicrobial

peptide and alginate production in *Pseudomonas corrugata*. *Frontiers in microbiology*. 2018, 9: 521. doi: 10.3389/fmicb.2018.00521

141. Müller J. M., Alegre R. M. Alginate production by *Pseudomonas mendocina* in a stirred draft fermenter. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2007, 23(5): 691-695. doi:10.1007/s11274-006-9285-3

142. Ioannou P., Vougiouklakis G. A Systematic Review of Human Infections by *Pseudomonas mendocina*. *Tropical medicine and infectious disease*. 2020, 5(2): 71. doi: 10.3390/tropicalmed5020071

143. Bajaj I.B., Survase S.A., Saudagar P.S., Singhal R.S. Gellan Gum: Fermentative Production, Downstream Processing and Applications. *Adv. Food Technol. Biotechnol.* 2007, 45(4): 341 – 354.

144. Gani M., Rao S., Miller M., Scoular S. *Pseudomonas mendocina* bacteremia: A case study and review of literature. *The American journal of case reports*. 2019, 20: 453-458. doi: 10.12659/AJCR.914360.

145. Худякова Л. И., Ютрина О. И., Асташкина А. П. Получение экзополисахаридов совместным культивированием бактерий родов *Xanthomonas campestris* и *Bacillus Amyloliquefacience*. Материалы XVI Международной научно-практической конференция имени профессора Л.П. Кулёва. (ТПУ, г. Томск, 25-29 мая 2015). С. 312-313.

146. Кичемазова Н. В. Экзополисахариды бактерий родов *Xanthobacter* и *Ancylobacter*: характеристика и их биологические свойства: Автореф. дис. канд. био. наук. С30. Методи відділення біомаси від культуральної рідини [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://ukrbukva.net/page,6,120721-Metody-otdeleniya-biomassy-ot-kul-tural-noiy-zhidkosti.html> аратов, 2019. 40 с.

147. Патент RU 2740086 РФ. Полимерный материал (гидрогель) на основе бактериального альгината для размещения пробиотических бактерий и способ его получения / Бонарцева Г. А., Бонарцев А. П., Воинова В. В. Опубл. 21.10.2020, Бюл. № 4.

148. Torres M. L., Fernandez J. M., Dellatorre F. G., Cortizo A. M., Oberti T. G. Purification of alginate improves its biocompatibility and eliminates cytotoxicity in matrix for bone tissue engineering. *Algal Research*. 2019, 40: 101499. doi: 10.1016/j.algal.2019.101499
149. Raza W., Yang W., Jun Y., Shakoор F., Huang Q., Shen Q. Optimization and characterization of a polysaccharide produced by *Pseudomonas fluorescens* WR-1 and its antioxidant activity. *Carbohydrate Polymers*. 2012, 90(2): 921-929.
150. Детальніше про альгінат. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://www.harchovyk.com/content/detail/550>
151. Методи відділення біомаси від культуральної рідини. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://ukrbukva.net/page,6,120721-Metody-otdeleniya-biomassy-ot-kul-tural-noiy-zhidkosti.html>
152. Ишевский А. Л., Успенская М. В., Гунькова П. И., Давыдов И. А., Василевская И. А. Направления использования альгинатов в пищевой промышленности. *Известия Санкт-Петербургского государственного технологического института (технического университета)*. 2019, 51(77): 61-69.
153. Патент України № 21491. Спосіб одержання альгината натрію / Усс Ю. А., Поздняков Ю. І. Опубл. 16.12.1997, Бюл. № 4.
154. Кислота альгінова. Альгінати. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/3488/kislota-alginova-alginati>
155. СТ-Н МОЗУ 42-3.7:2013 Лікарські засоби. Якість води для застосування у фармації
156. Засєкін Д., Пушкова А., Димко Р. Сучасні вимоги до мийно-дезінфікуючих засобів для санітарної обробки доїльного обладнання та молочного інвентаря. Матеріали III Міжнародної науково-практичної конференції пам'яті професора Петра Столярчука «Управління якістю в освіті

та промисловості: досвід, проблеми та перспективи» (Львів, НУЛП, лютий 2017 р.). С. 74.

157. Технічні миючі засоби Cimclean 50F. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.starki.com.ua/tehnichni-miyuchi-zasobi-cimclean-50f/>

158. Фамідез® CIP Ас 220. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://desomark.com.ua/index.php?option=com_virtuemart&view=category&virtuemart_category_id=80

159. Щелочное моющее средство с хлором Ekfil CIP DEZ (кан. 22 кг). [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://pivden-profit.com.ua/p1171189126-schelochnoe-moyuschee-sredstvo.html>

160. Бланидас — Универсальное моющее средство для водостойких поверхностей, 1л. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://horeca-service.net/product/blanidas-universalnoe-moyushhee-sredstvo-dlya-vodostojkih-poverhnostej-1l/>

161. Мікрасепт 5 л - дезінфікуючі засоби, для швидкої обробки рук і шкіри, очищення поверхонь. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://profsalon.com.ua/ua/p824951750-mikrasept-dezinfitsiruyuschie-sredstva.html?source=merchant_center&gclid=CjwKCAjwp_GJBhBmEiwALWBQk5lEvXvK_KaL1pLDelt9yh3mbGcYuCA8NsJOrTM_yK3dIDLO_AwIDxoCOjUQAvD_BwE

162. Desguard 20 концентрований дезінфікуючий засіб для поверхонь 1л. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://euromed24.com.ua/p1237273432-desguard-kontsentrovani-dezinfikuyuchij.html?source=merchant_center&gclid=CjwKCAjwp_GJBhBmEiwALWBQk29jEqCSVYDsKI2i4FBxbs8I0samLTGTfGvpw4HxxtWCPlO5pUDfXxoC9IEQAvD_BwE

163. Дезинфицирующее средство (антисептик) для рук, кожи и поверхностей ТМ SeptPower. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://sata-group.com.ua/p1367613140-antiseptik-dlya-ruk.html?source=merchant_center&gclid=CjwKCAjwp_GJBhBmEiwALWBQk--

[8V11wxZ3dSw2BrJMHCEvnSN6iSGsyg1Pf7kF0ew-FUMSWIWdGgxoCZDoQAvD_BwE](https://medrynok.com.ua/goods/view/14018198/all/famidez-kombi/)

164. Фамідез Комбі. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://medrynok.com.ua/goods/view/14018198/all/famidez-kombi/>

165. Основи проектування біотехнологічних виробництв: метод. рекомендації до викон. курс. проекту для студ. напряму підготовки 6.051401 «Біотехнологія» ден. форми навч. / уклад. Т.П. Пирог, Ю.В. Карлаш, В.О. Красінько. – К.: НУХТ, 2015. – 92 с.

166. Конспект лекцій з дисципліни «Асептика біотехнологічних виробництв» освітньо-професійної програми другого (магістерського) рівня вищої освіти зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» усіх форм навчання / Укл.: Головей О.П., Гуляєв В.М. – Кам'янське, ДДТУ, 2017 р., 140 с.

167. Програма технологічної практики студ. III курсу напряму підготовки 6.051401 «Біотехнологія» ден. форми навчання / Уклад.: С.М. Тетеріна, А.П. Софілканич, С.В. Ігнатенко. – К.: НУХТ, 2012. – 20 с.

168. Гринберг Т.А., Пирог Т.П., Малащенко Ю.Р., Пинчук Г.Э. Микробный синтез экзополисахаридов на C1–C2-соединениях. — К.: Наук. думка, 1992. — 212 с.

169. Identification of *Pseudomonas* species and other NonGlucose Fermenters. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/422699/ID_17i3.pdf

170. *Pseudomonas mendocina*. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://tgw1916.net/Pseudomonas/mendocina.html>

171. *Pseudomonas mendocina* isolated from CSF (cerebrospinal fluid). [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.flickrriver.com/photos/7cius/>

172. Casellas M., Grifoll M., Sabaté J., Solanas A. M. Isolation and characterization of a 9-fluorenone-degrading bacterial strain and its role in synergistic degradation of fluorene by a consortium. *Canadian journal of microbiology*. 1998, 44(8): 734-742. doi: 10.1139/w98-066

173. Спектрофотометрія. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/596/spektrofotometriya>

174. Salomonsen T., Jensen H. M., Stenbæk D., Engelsen S. B. Chemometric prediction of alginate monomer composition: A comparative spectroscopic study using IR, Raman, NIR and NMR. *Carbohydrate Polymers*. 2008, 72(4): 730-739. doi: 10.1016/j.carbpol.2007.10.022

175. 12. Високоєфективна рідинна хроматографія. [Електронний ресурс]. Режим доступу:

https://tdmuv.com/kafedra/internal/pharma_2/classes_stud/uk/pharm/prov_pharm/ptn/%D0%B0%D0%BD%D0%B0%D0%BB%D1%96%D1%82%D0%B8%D1%87%D0%BD%D0%B0%20%D1%85%D1%96%D0%BC%D1%96%D1%8F/2%20%D0%BA%D1%83%D1%80%D1%81/25%20%D0%92%D0%B8%D1%81%D0%BE%D0%BA%D0%BE%D0%B5%D1%84%D0%B5%D0%BA%D1%82%D0%B8%D0%B2%D0%BD%D0%B0%20%D1%80%D1%96%D0%B4%D0%B8%D0%BD%D0%BD%D0%B0%20%D1%85%D1%80%D0%BE%D0%BC%D0%B0%D1%82%D0%BE%D1%80%D0%B3%D0%B0%D1%84%D1%96%D1%8F.htm

176. Chen C. Y., Lu I. C., Nagarajan D., Chang C. H., Ng I. S., Lee D. J., Chang J. S. A highly efficient two-stage cultivation strategy for lutein production using heterotrophic culture of *Chlorella sorokiniana* MB-1-M12. *Bioresource technology*. 2018, 253: 141-147. doi: 10.1016/j.biortech.2018.01.027

177. Загальні технології харчової промисловості: Метод. вказівки до вик. лаб. практикуму студ. заоч. форми навчання напряму підготовки 6.051701 «Харчові технології та інженерія» спец. «Технологія продуктів бродіння і виноробства» / Укл.: А.М. Куц, М.В. Бондар, Ю.В. Булій. — К.: НУХТ, 2011. — 53 с.