

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь магістр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

Освітньо-професійна програма «Фармацевтична біотехнологія»

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

Віктор СТАБНІКОВ

“ 30 ” жовтня 2023 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

КАСІЧ Марії Олегівні

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Бактерії роду *Bacillus* як продуценти протеолітичних ферментів медичного призначення

керівник роботи РЕЗНІЧЕНКО Юрій Миколайович, доц., к.т.н.

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від 06 листопада 2023 року № 914-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 05.02.2024

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Bacillus* sp.; цільовий продукт: кератиназа

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

Розділ 1. Біологічні агенти для біосинтезу протеолітичних ферментів та їх застосування в медицині; Розділ 2. Техніко-економічне обґрунтування виробництва кератиназ для лікарського засобу проти оніхомікозу; Розділ 3. Обґрунтування післяферментаційних процесів; Розділ 4. Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях; Розділ 5. Специфікація обладнання для виділення та очищення кератинази; Розділ 6. Опис технологічної схеми післяферментаційного виділення і очищення кератинази для одержання лікарського засобу проти оніхомікозу; Розділ 7. Контроль виробництва кератинази для лікарського засобу проти оніхомікозу; Розділ 8. Обґрунтування вибору технологічної схеми одержання лікарського засобу проти оніхомікозу; Розділ 9. Специфікація обладнання для виробництва лікарського засобу проти оніхомікозу; Розділ 10. Опис технологічної схеми отримання лікарського засобу проти оніхомікозу; Розділ 11. Опис лікарського засобу на основі кератинази проти оніхомікозу згідно АНД

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна та апаратурна схеми виділення та очищення кератинази – по 1 аркушу листа формату А1; Технологічна та апаратурна схеми виробництва лікарського засобу на основі кератинази – по 1 аркушу листа формату А1;

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 30 жовтня 2023 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Розділ 1. Біологічні агенти для біосинтезу протеолітичних ферментів та їх застосування в медицині;	01.11.2023-12.12.2023	
2	Розділ 2. Техніко-економічне обґрунтування виробництва кератиназ для лікарського засобу проти оніхомікозу;	13.12.2023-16.12.2023	
3	Розділ 3. Обґрунтування післяферментаційних процесів;	17.12.2023-22.12.2023	
4	Розділ 4. Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях;	23.12.2023-26.12.2023	
5	Розділ 5. Специфікація обладнання для виділення та очищення кератинази;	27.12.2023-02.01.2024	
6	Розділ 6. Опис технологічної схеми післяферментаційного виділення і очищення кератинази для одержання лікарського засобу проти оніхомікозу;	03.01.2024-05.01.2024	
7	Розділ 7. Контроль виробництва кератинази для лікарського засобу проти оніхомікозу;	06.01.2024-08.01.2024	
8	Розділ 8. Обґрунтування вибору технологічної схеми одержання лікарського засобу проти оніхомікозу;	09.01.2024-12.01.2024	
9	Розділ 9. Специфікація обладнання для виробництва лікарського засобу проти оніхомікозу;	13.01.2024-15.01.2024	
10	Розділ 10. Опис технологічної схеми отримання лікарського засобу проти оніхомікозу;	16.01.2024-17.01.2024	
11	Розділ 11. Опис лікарського засобу на основі кератинази проти оніхомікозу згідно АНД	17.01.2024-18.01.2024	
12	Оформлення пояснювальної записки	03.01.2024-19.01.2024	
13	Оформлення креслень	19.01.2024-20.01.2024	

Здобувач

_____ (підпис)

Керівник роботи

_____ (підпис)

Марія КАСІЧ

_____ (ім'я та прізвище)

Юрій РЕЗНІЧЕНКО

_____ (ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Дана кваліфікаційна робота присвячена розробці виробництва біотехнологічного спрямування для біосинтезу кератинази з метою застосування у лікарському засобі проти оніхомікозу. Кератинази у фармацевтиці використовують з ціллю лікування акне, псоріазу або ж у якості одного з найважливіших складників в препаратах для лікування грибкових захворювань нігтів.

Оніхомікоз – це одне з найпоширеніших грибкових захворювань, які вражають нігті. Близько 10% людей у світі страждають на це захворювання і наразі, воно лише набуває більшого поширення. Для його лікування використовують 2 методи прийому ліків – місцевим нанесенням на ліки та пероральний прийом протигрибкових засобів. Перші менш ефективні, ніж таблетки, через те, що ніготь – малопроникний об'єкт, проте не дають побічних ефектів. Тому, розробка лікарських засобів для локального застосування проти оніхомікозу є нагальною проблемою. Вирішення питання ефективності таких препаратів може стати кератиназа, оскільки вона підвищує проникність крізь ніготь.

Для виробництва нового препарату на основі кератинази, було обрано штам *Bacillus sp. CSK2*, який на гідролізаті курячого пір'я синтезує близько 0,82 г/л ферменту. Використовуючи цю інформацію, було визначено потребу в препараті в Київській області, що становить близько 32 679 л лікарського засобу. Для найкращого ефекту, концентрація кератинази в препараті має становити 1 мг/мл. Таким чином, кількість кератинази на рік становила 32,7 кг.

Зазвичай, ферменти очищають за допомогою високоефективної рідинної хроматографії, але це дуже дороговартісний метод, який важко реалізувати в промислових умовах. Тому, для очистки кератинази було запропоновано інший метод, який передбачає двухстадійне екстрагування ферменту.

Робота складається з вступу, 11 розділів та списку літератури, що містить 162 джерела. В роботі наведено 14 таблиць та 11 рисунків. Графічна частина містить технологічну та апаратурну схему, накреслені на аркушах формату А1.

Ключові слова: протеолітичні ферменти, кератиназа, оніхомікоз, хвороби нігтів, *Bacillus sp. CSK2*.

ABSTRACT

This qualification work is devoted to the development of biotechnological production for the biosynthesis of keratinase for use in a drug against onychomycosis. Keratinases in pharmaceuticals are used to treat acne, psoriasis, or as one of the most important components in drugs for the treatment of fungal nail diseases.

Onychomycosis is one of the most common fungal diseases affecting the nails. About 10% of people in the world suffer from this disease and nowadays, it is only becoming more widespread. To treat it, 2 methods of medication are used - topical application and oral administration of antifungal agents. The former are less effective than tablets because the nail is a low-permeability object, but they do not have side effects. Therefore, the development of medicines for topical use against onychomycosis is an urgent problem. Keratinase may be a solution to the issue of the effectiveness of such drugs, as it increases the permeability of the nail.

To produce a new keratinase-based drug, the strain *Bacillus sp. CSK2* was chosen, which synthesizes about 0.82 g/l of the enzyme on chicken feather hydrolyzate. Using this information, the need for the drug in the Kyiv region was determined to be about 32,679 liters of the drug. For the best effect, the concentration of keratinase in the drug should be 1 mg/ml. Thus, the amount of keratinase per year was 32.7 kg.

Typically, enzymes are purified using high-performance liquid chromatography, but this is a very expensive method that is difficult to implement in an industrial setting. Therefore, a different method was proposed for the purification of keratinase, which involves a two-step extraction of the enzyme.

The work consists of an introduction, 11 chapters and a list of references containing 162 sources. The paper contains 14 tables and 11 figures. The graphic part contains a technological and hardware diagram drawn on A1 sheets.

Key words: proteolytic enzymes, keratinase, onychomycosis, nail diseases, *Bacillus sp. CSK2*.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	7
РОЗДІЛ 1. БІОЛОГІЧНІ АГЕНТИ ДЛЯ БІОСИНТЕЗУ ПРОТЕОЛІТИЧНИХ ФЕРМЕНТІВ ТА ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ В МЕДИЦИНІ	11
1.1. Біологічні агенти, які використовуються для біосинтезу протеолітичних ферментів.....	11
1.1.1. Бацили, як найбільш вживані в промисловості мікроорганізми для синтезу ферментів... ..	12
1.1.2. Інші можливі біологічні агенти для культивування протеолітичних ферментів.....	23
1.1.3. Рекомбінантні технології в біосинтезі протеаз... ..	29
1.2. Застосування різних протеаз в медицині	32
1.2.1. Антагоністична активність протеаз... ..	32
1.2.2. Можливі застосування протеаз	35
1.2.3. Відомі препарати протеолітичних ферментів, що застосовуються в медичній та супутніх до неї сферах... ..	37
ВИСНОВКИ	41
РОЗДІЛ 2. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВА КЕРАТИНАЗИ ДЛЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ПРОТИ ОНІХОМІКОЗУ	42
2.1. Аналіз фармакологічних властивостей цільового лікарського засобу на основі кератинази, галузей використання, потреби у лікарському засобі проти оніхомікозу... ..	42
2.2. Обґрунтування вибору форми випуску лікарського засобу	48
2.2.1. Обґрунтування форми випуску лікарського засобу на основі кератинази проти оніхомікозу	48
2.2.2. Обґрунтування вибору первинної і вторинної упаковки лікарського засобу на основі кератинази проти оніхомікозу	50
2.3. Вибір біологічного агента для біосинтезу кератинази... ..	51
2.4. Розрахунок потреби у кератиназі для випуску лікарського засобу та	

розрахунок річної потреби у культуральній рідині для одержання розрахованої кількості кератинази... ..55

РОЗДІЛ 3. ОБҐРУНТУВАННЯ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ... .. 57

3.1. Обґрунтування стадії відокремлення супернатанту від біомаси... .. 60

3.2. Обґрунтування методу концентрування супернатанту 61

3.3. Обґрунтування екстрагування кератинази... .. 62

3.4. Обґрунтування відокремлення PEG від розчиненої кератинази... ..63

3.5. Обґрунтування методу сушіння... .. 63

РОЗДІЛ 4. ПІДБІР ТЕХНОЛОГІЧНОГО ОБЛАДНАННЯ З ВРАХУВАННЯМ МАТЕРІАЛЬНИХ ПОТОКІВ ПО СТАДІЯХ... .. 65

РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ КЕРАТИНАЗИ..... 67

РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНОГО ВИДІЛЕННЯ І ОЧИЩЕННЯ КЕРАТИНАЗИ ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ПРОТИ ОНІХОМІКОЗУ 70

РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА КЕРАТИНАЗИ ДЛЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ПРОТИ ОНІХОМІКОЗУ... .. 74

7.1. Повірка дозуючого обладнання 74

7.2. Вимірювання рівня фракцій при екстракції..... 74

7.3. Визначення вологості кератинази 75

7.4. Визначення ваги кератинази 75

7.5. Визначення активності кератинази 75

РОЗДІЛ 8. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОДЕРЖАННЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ПРОТИ ОНІХОМІКОЗУ 77

8.1. Розрахунок річної потужності виробництва препарату проти оніхомікозу та кількості серій на рік.....77

8.2. Обґрунтування вибору класів чистоти виробничих приміщень,

підготовки персоналу, дезінфікуючих засобів, вентиляційного повітря	78
8.2.1. Вибір класу чистоти та вентиляційного повітря.....	78
8.2.2. Підготовка персоналу.....	80
8.2.3. Вибір дезінфікуючих засобів	82
8.3. Обґрунтування вибору підготовки первинної упаковки	85
8.4. Обґрунтування вибору підготовки води	86
8.5. Вибір технологічних стадій та операцій, обладнання	87
РОЗДІЛ 9. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ПРОТИ ОНІХОМІКОЗУ.....	91
РОЗДІЛ 10. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОТРИМАННЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ПРОТИ ОНІХОМІКОЗУ.....	94
РОЗДІЛ 11. ОПИС ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ НА ОСНОВІ КЕРАТИНАЗИ ПРОТИ ОНІХОМІКОЗУ ЗГІДНО АНД.....	98
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	103

ВСТУП

Протеази становлять єдину найважливішу групу промислово важливих мікробних ферментів, які здатні гідролізувати пептидні зв'язки в амінокислотах залежно від розміру молекул, які вони можуть атакувати. Це можуть бути протеїнази або пептидази. З пізніх років дев'ятнадцятого століття сирі протеази використовуються для лікування шлунково-кишкових розладів. Мікробні протеази використовуються прямо або опосередковано в медицині для діагностичних або терапевтичних цілей [1].

Мікробні ферменти займають чільне місце в біоекономічному просторі, і на протеази припадає приблизно шістдесят відсотків усього ринку ферментів. Мікробні кератинази — це універсальні протеази, які постійно набирають обертів у біотехнології завдяки їх ефективній біоконверсії неперероблювальних відходів, багатих кератином, і сталому впровадженню екологічного виробництва. Біодеградація кератинових матеріалів за допомогою кератинази відновила перспективи використання економічно ефективних агропромислових відходів як легкодоступних субстратів для виробництва високоцінних продуктів, включаючи амінокислоти та біоактивні пептиди [2].

У косметичному секторі кератинази були включені як активний компонент у приготування місцевих продуктів, які використовуються для видалення волосся. Кератинази продемонстрували потенціал для зміцнення мертвого шару шкіри (гіперкератоз). Таким чином, це цей фермент може замінити традиційно використовувану саліцилову кислоту. У виробництві гідролізатів за допомогою кератиназ використовувалися різні джерела білка, а саме: протеїн пшениці, кератин вовни та колаген, які знайшли застосування у виробництві засобів по догляду за волоссям та шкірою. Як правило, вони покращують відчуття, звожують і зберігають природну цілісність шкіри. Пептиди, отримані за допомогою опосередкованої біодеградації кератиназою кератину, мають низьку

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.03 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Касіч М.О.</i>			<i>ВСТУП</i>	<i>Лім.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Перевір.</i>		<i>Резніченко Ю.М.</i>					7	103
<i>Реценз.</i>								
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						
						<i>Кафедра БТМ</i>		

молекулярну масу. Ці пептиди, як правило, проникають у кутикулу волосся або нігтів, і їх все частіше включають у рецептуру косметичних продуктів, таких як зволожувачі та кондиціонери, порівняно з гідролізатами з інших джерел. На основі кератиназ був розроблений засіб для депіляції з допоміжними речовинами, сумісність і нереактивність функціональних груп яких також були підтверджені. Цікаво, що крем на основі кератинази був ефективнішим у видаленні волосся, ніж аналог на хімічній основі [2].

Також кератинази використовуються в косметичній промисловості для лікування вугрів, мозолів, видалення ороговілої та сухої шкіри, лікування псоріазу. Застосування кератиназ у фармацевтичній промисловості в основному пов'язане з поліпшенням проходження фунгіцидних препаратів через ороговілу поверхню нігтя. Розлади нігтів, в основному пов'язані з грибковими інфекціями, варіюються від відносно нешкідливих (пігментація) до хворобливих станів, таких як дистрофія нігтів. Лікування грибкових інфекцій нігтів (оніхомікозу) є надзвичайно складним і традиційно передбачає тривалий прийом протигрибкових препаратів і повторні щомісячні ін'єкції кортикостероїдів, що викликає багато побічних ефектів, таких як висипання та пошкодження печінки. Альтернативною формою лікування є місцеве нанесення антимікотичних препаратів безпосередньо на уражену ділянку. Головним недоліком цього підходу є непроникність поверхні нігтя, що впливає на проникнення препарату та ефективність лікування. Різноманітні механічні (стирання та відшарування нігтів), фізичні (протравлювання, лазерна обробка, зволоження та швидке змикання нігтів) та хімічні методи (кератинолітичні засоби, такі як сечовина, тіогліколева кислота, саліцилова кислота, N-ацетилцистеїн, меркаптоетанол) використовуються для покращення перенесення ліків до місця дії. Однак ці хімічні речовини ефективні лише у високих концентраціях і можуть мати різкий запах. Кератинази, з іншого боку, можуть бути дуже ефективними у розпушенні нігтьових пластин у дуже низьких концентраціях [3].

Онїхомікоз - це захворювання, яке викликається дерматофітами, які представляють собою гіалінові перегородчасті цвілі, які вражають нігтьову пластину. Рівень поширеності онїхомікозу оцінюється на основі віку через поганий

периферичний кровообіг або діабет, клімату, уповільненого росту нігтів, стану імунodefіциту та сучасного способу життя, що призводить до відсутності догляду за нігтями. Відсоток уражених дітей менший порівняно з дорослими або людьми похилого віку. Цією недугою страждає більшість сільського населення. Серед людей, які займаються риболовлю, рівень поширеності дуже високий. Поінформованість про хворобу серед людей невизначена. Таким чином, діагностика хвороби відбувається із запізненням, що призводить до менших шансів на лікування хвороби [4].

Для місцевого лікування оніхомікозу доступно багато типів продуктів, таких як Циклопірокс, Ефінакозол і Таваборол. До засобів для місцевого застосування також додаються фізичні модальності, хімічна обробка, механічна обробка і видалення нігтів як допоміжні засоби. Можна приймати такі продукти та використовувати препарати, що містять кератолітичні властивості. Схвалені засоби для місцевого застосування при оніхомікозі - це циклопірокс 8% лак для нігтів, ефінаконазол 10% розчин і таваборол 5% розчин. Циклопірокс зазвичай використовується в найлегших випадках. Кератиназу можна використовувати як частину лікування оніхомікозу місцевими препаратами через структурну анатомію в місці інфікування. Інфекція виникає під нігтьовою пластиною, вражаючи нігтьове ложе. Отже, щоб лікувати інфекцію, спочатку препарат повинен проникнути через нігтьову пластину, що важко, оскільки нігтьова пластина складається з твердого протеїну кератину [4].

Збудниками оніхомікозу є гриби-дерматофіти – *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* і *Epidermophyton floccosum*, *Candida*, цвілеві гриби, а також змішана грибкова інфекція. Чоловіки схильні до захворювання у 2 рази більше, ніж жінки. Крім того, чим старше стає людина, тим слабкіше імунітет та опірність організму до інфекцій. У віці від 70 та старше нігтьовим грибком страждає кожна друга людина на планеті. У хворих з діагнозом «імунodefіцит» або «цукровий діабет» оніхомікоз діагностують також досить часто. Грибкові захворювання загострюються навесні та восени, що пов'язано з сезонним падінням

імунітету. За статистикою, від оніхомікозу страждає близько 10% населення земної кулі, і з кожним роком ця цифра зростає [5,6].

Пероральна протигрибкова терапія ефективна більш ефективна, ніж місцеве застосування, але значні побічні ефекти обмежують її використання. Хоча місцева протигрибкова терапія має мінімальні побічні ефекти, вона менш ефективна, ніж пероральна протигрибкова терапія, через слабе проникнення в ніготь. Отже, існує потреба у розробці лікарського засобу для місцевого застосування, яке дозволить ефективно проникати протигрибковим агентом під нігтьову пластину [7].

Актуальністю теми є розробка ефективних протигрибкових лікарських засобів місцевої дії для лікування оніхомікозу, як більш безпечної альтернативи пероральній терапії.

Новизною теми є застосування кератинолітичних ферментів, одержаних за допомогою *Bacillus sp. CSK2* на кур'ячому пір'ї [8], у протигрибкових засобах місцевої дії для покращення їх проникнення до нігтьового ложа з метою лікування оніхомікозу.

РОЗДІЛ 1

БІОЛОГІЧНІ АГЕНТИ ДЛЯ БІОСИНТЕЗУ ПРОТЕОЛІТИЧНИХ ФЕРМЕНТІВ ТА ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ В МЕДИЦИНІ

1.1. Біологічні агенти, які використовуються для біосинтезу протеолітичних ферментів

Ферменти є біологічними каталізаторами, які мають широкий спектр застосування. Завдяки високому ступеню субстратної специфічності та суворим, але надійним робочим параметрам, у багатьох ситуаціях їм надають перевагу над хімічним каталізом. Ферменти містяться в усіх живих системах. Поява та поширення технології рекомбінантної ДНК дозволило вченим клонувати та масово виробляти ферменти будь-якого походження в мікробах, щоб відповідати потребам різних галузей промисловості. Поліпшення штаму шляхом мутації є ще однією технологією, яка широко використовується в промисловості для збільшення виходу виробництва ферментів [9].

Незважаючи на відчутний попит, ферменти є відносно дорогими реагентами, і це збільшує експлуатаційні витрати на процеси, які їх використовують. Критичний аналіз економіки процесу виробництва ферментів показує, що майже 50% собівартості продукції пов'язано з капітальними інвестиціями, тоді як вартість сировини становить майже третину таких витрат [9].

Відсутність терапевтичних засобів у таких областях, як серцево-судинна медицина та лікування нейродегенеративних захворювань, залишається основою для пошуку нових терапевтичних (ферментативних) препаратів. Мікробні ферменти використовуються у виробництві бета-лактамних антибіотиків, таких як напівсинтетичні пеніциліни та цефалоспорини. Деякі препарати, що використовуються для зниження рівня холестерину в крові, також засновані на мікробних ферментах [10].

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.03 КР ПЗ</i>		
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>			
<i>Розроб.</i>	<i>Касіч М.О.</i>				<i>РОЗДІЛ 1. БІОЛОГІЧНІ АГЕНТИ ДЛЯ БІОСИНТЕЗУ ПРОТЕОЛІТИЧНИХ ФЕРМЕНТІВ ТА ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ В МЕДИЦИНІ</i>		
<i>Перевір.</i>	<i>Резніченко Ю.М.</i>						
<i>Реценз.</i>						11	103
<i>Н. Контр.</i>					<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Затверд.</i>	<i>Стабніков В.П.</i>						

Мікробні ферменти можна безпосередньо використовувати як ліки. У терапії лізуючі агенти, такі як стрептокінази (*Streptococcus haemolyticus*) і стафілокінази (деякі штами *Staphylococcus aureus*), широко використовуються як фібринолітики при лікуванні тромбозу. Відомо, що терилітини (*Aspergillus tericola*) допомагають при лікуванні ран, трофічних ран і опіків. Крім того, ліпази (*Bacillus*, *Acinetobacter*, *Propionibacterium*, *Chromobacterium* і *Alkaligenes*) гідролізують жири при хронічних шлунково-кишкових захворюваннях [11]. Лужні протеази з *B. subtilis* діють як ефективна трансдермальна система доставки ліків для дерматологічних застосувань. Амілази (*Bacillus*) гідролізують крохмаль, який використовується при недостатності підшлункової залози тощо [10].

В даний час більшість біопрепаратів отримують на основі генетично модифікованих організмів. Основними продуцентами рекомбінантних ферментів є бактерії, такі як *Escherichia coli*, *B. subtilis*, *Lactobacillus lactis*, і дріжджі, включаючи *Pichia pastoris* [10].

1.1.1. Бацили, як найбільш вживані в промисловості мікроорганізми для синтезу ферментів

Bacillus spp. представляють переважаючі ґрунтові та ризосферні бактерії, де вони складають до 95% популяцій грампозитивних бактерій. Крім того, вони є одними з найпоширеніших ендоефітних бактерій [12].

Bacillus - велика і різноманітна група непатогенних і патогенних бактерій. Більшість видів *Bacillus*, а також їх продукти вважаються безпечними для використання за призначенням у навколишньому середовищі. Ці бактерії є кращими для комерціалізації через їх здатність виділяти кілька біоактивних метаболітів, виробляти надзвичайно толерантні ендоспори та швидко рости в різних середовищах. Отже, вони зберігають свою життєздатність і можуть зберігатися протягом тривалого часу. Комерційні препарати на основі *Bacillus* розроблені та розповсюджуються по всьому світу. Препарати містять в собі метаболіти або ж саму біомасу *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. velezensis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis* тощо [12].

Бацили здатні до промислового синтезу протеаз, амілаз, ліпаз, целюлаз та ін. [13,14].

В таблиці 1.1. вказано комерційні препарати ензимів, які синтезуються за допомогою бацил.

Таблиця 1.1.

Комерційні ферменти, які одержують з бацил

Назва продукту	Тип ферменту	Біологічний агент, що його синтезує	Джерело
Dispase I	Протеаза	<i>B. polymyxa</i>	[15]
Dispase II			
Protame		<i>Bacillus sp.</i>	
Proteinase	Субтилізин А	<i>B. licheniformis</i>	
Everlase		<i>Bacillus sp.</i>	
Protex 6L	Субтилізин	<i>B. licheniformis</i>	
Optimase PR	Серинова ендопептидаза	<i>B. subtilis</i>	
Multifect Neutral		<i>B. amyloliquefaciens</i>	
Neutrase	Металопротеаза		
Genencor Protease 899	Метало нейтральна протеаза	<i>B. subtilis</i>	
Zymox	Кератиназа	<i>Bacillus sp.</i>	[3]
Keratoclean Hydra PB			
Keratoclean Sensitive PB			
Keratopeel PB			
Versazyme			
PURE 100 Keratinase			
Valkerase			
Prionzyme			
Bioguard Plus			
Alcalase	Ендопротеаза	<i>B. licheniformis</i>	[16]
Savinase		<i>B. clausii</i>	
Durazym	Субтилізин	<i>Bacillus sp.</i>	
Esperase	Ендопептидаза (переважно субтилізин А)	<i>B. lentus</i>	
Махасал	Субтилізин 309 або савіназа	<i>Bacillus sp.</i>	

Maxatase	Суміш алкалази, есперази та савінзи	<i>Bacillus</i> sp.	[17]
Opticlean	Субтилізин	<i>Bacillus</i> sp.	
Proleather			
Махарем			
Purafect			

Пептидні гідролази або протеази відносяться до великої груп протеолітичних ферментів, які гідролізують пептидні зв'язки в білках і пептидах. Обсяг досліджень протеїназ неухильно зростає завдяки великій кількості інформації про мікробний геном, що відкриває шлях до нових методів, заснованих на генній інженерії, геноміці та протеоміці [10].

Бактерії є найбільш домінуючою групою продуцентів протеаз, причому рід *Bacillus* є найпомітнішим джерелом. Це головним чином пов'язано з високою здатністю до секреції білка, якою володіють кілька видів *Bacillus*. Крім того, різні види роду *Bacillus* виробляють нейтральні та лужні протеази, що цікаво для використання ферментів у промисловості. Інший підхід полягає в генетичній інженерії протеаз із штамів *Bacillus* sp., що призводить до протеаз з диференційованими властивостями. Протеази *Bacillus* мають кілька чудових характеристик для багатьох промислових застосувань, таких як широкий діапазон рН і температурна активність, діапазон стабільності, толерантність до лужних і токсичних сполук, включаючи окислювачі та поверхнево-активні речовини [10].

Лужні протеази становлять 60–65% світового промислового ринку. Ці протеази є єдиним класом ферментів, які широко використовуються в мийних засобах, фармацевтиці, шкіряній промисловості, харчовій промисловості та сільському господарстві. *B. subtilis* є лідером щодо синтезу цього класу протеаз. Проте, для синтезу цих ферментів важливу роль відіграють компоненти середовища. Наприклад, для *B. subtilis* (без штаму), вища протеолітична активність відмічається на середовищі з галактозою, як джерела вуглецю, а пептону – як амонійного джерела. Час та температура культивування також відіграє важливу

роль, для зазначеного організму оптимумом є 36 годин та 40-50 °С. За таких параметрів оптимуму вдається одержати 2,31 г/л ферменту з активністю 476,56 Од/мл [18].

Для пошуку нових лужних протеаз часто звертаються до методів ізоляції. Таким чином, було одержано ізолянт *B. mojavensis* SA. Найвища протеолітична активність відмічається на 23 годині культивування. Оптимальні рН і температура протеолітичної активності становили 12,0 і 60 °С відповідно. Варто зазначити, що даний штам, окрім активної лужної протеази супутньо синтезує й амілазу, що є доволі частим явищем для бацил [19].

Наприклад, штам *B. licheniformis* NRRL 14209 також синтезує одразу і протеазу і уриказу. Культивування тривало всього 8 годин при 25°C та рН 9,5. Максимальне виробництво урикази 0,825 Од/мл і лужної протеази 0,646 Од/мл було отримано, коли ферментаційний бульйон опромінювався (потужністю 60 Вт протягом 15 хв тривалості з 40% робочого циклу) на 6 год стадії росту [20].

Bacillus sp. FW2 це екстремальний термофіл, який було виділено з харчових відходів Південної Кореї. Цей штам був здатний розкласти органічні сполуки при температурах від -6 °С до 75 °С (але слабко при 80 °С) у широкому діапазоні рН (4,5–12) і в умовах високої солоності до 35% NaCl. Максимальна продукція ферменту була отримана при $1200 \pm 23,4$ Од/мл для протеази та $2400 \pm 45,8$ Од/мл для амілази протягом 4 днів при рН 7–7,5, 40–45 °С і 0–10% NaCl [21].

B. licheniformis TD4 також було ізольовано з зразків землі. Дослідження впливу різних джерел вуглецю та азоту показали, що ксиліоза та сечовина посилюють вироблення ферментів за допомогою цього штаму. Важливо відмітити, що дана бактерія є галотолерантною, а отже, витримує високі концентрації солі. При культивуванні з зазначеними джерелами карбону та нітрогену разом з 1 М NaCl відмічається максимальна активність протеолітичного білку (141,46 Од/мг), в то час як при неоптимізованих параметрах даний показник був значно нижчим (89,87 Од/мг) [22].

Галотолерантний штам *B. subtilis* BLK-1.5 було ізольовано з сольових шахт. Максимальна продукція протеази була зареєстрована при рН 10, 37 °С і 7 % NaCl.

При цьому, максимальна концентрація білку становила 37,8 мг/л. Молекулярна маса протеаз оцінювалася як 38 кДа, а її оптимальна активність спостерігалася при рН 10, 50 °С і 2 % (w/v) NaCl. Активність ферменту при цьому становить близько 180 Од/мл [23].

B. cereus S8 хоча й культивується на рідкому середовищі, проте в статичних умовах (без перемішування). Важливо зазначити, що даний штам частково витримує високі концентрації солі. При 0,3 М NaCl відмічається найбільший ступінь активності протеолітичного ферменту, який становить 3200 Од/мг. Початкова концентрація білку в середовищі становить 14,75 г/л, але його активність становить всього 17,6 Од/мг. Після очистки, концентрація очищеного білку становить 0,3 г/л, а його активність – 300 Од/мл відповідно [24].

B. koreensis ВК-Р21А – штам, який було виділено зі водних стоків виробництва миючих засобів. Для одержання протеолітичного ферменту середовищі використовують казеїн та соєву макуху. Для даного штаму максимальна активність ферменту відмічається на 36 годині культивування, як і для *B. subtilis* (без штаму). Оптимальне значення рН для *B. koreensis* ВК-Р21А становить 8,5, а температура культивування – 30 °С. Концентрація неочищеного білку становила 0,968 г/л, а її початкова активність – 380,4 Од/мг. Після очистки, значення активності підвищилося до 1887 Од/мл, порте кількість білку становила 44,6 мг/л. Відмічається, що для більшого синтезу ферменту потрібно використовувати сахарозу та дріжджовий екстракт як основу поживного середовища [25].

B. licheniformis АТСС 21415 для синтезу протеаз використовує цікаве середовище, яке містить 10 г пір'я на 1 л LB бульйону (дріжджовий екстракт – 5 г/л, триптон – 10 г/л, NaCl – 10 г/л). На 168 годині культивування активність ферменту становила 1,7 Од/мл. Хоча активність доволі низька, проте, як відомо, після очистки, вона може збільшитися в декілька разів. Дана технологія є цікавою тим, що це одне з рішень утилізації відходів прахівництва [26].

Штам *B. tequilensis* CSGAB0139 було ізольовано з зіпсованого сиру. Для даного продуцента оптимальним середовищем є таке, що містить сахарозу та

дріжджовий екстракт (як і для ізоляту *B. koreensis* ВК-Р21А). Використовуючи цю основу, активність неочищеного білку становила 67,03 Од/мл. Оптимальний час культивування – 48 годин, а температура стабільності фермента – 25 °С, рН- 10. При додатковому аналізі, було визначено, що кращим джерелом вуглецю для *B. tequilensis* CSGAB0139 є мальтоза, а амінного азоту – пептон. Також, відмічається, що перекис водню в концентрації 1,5 та 2% підвищує протеолітичні властивості фермента [27].

B. megaterium NRC було ізольовано з ґрунту. Даний штам характеризується тим, що він продукує велику кількість активних протеаз. В дослідженні було визначено 2 протеолітичні протеази, з шифром Р1 та Р1. Дані ферменти мали активність 561,27 та 317,23 Од/мг відповідно (мається на увазі концентрації очищених білків). Для підвищеного синтезу цих ферментів в поживному середовищі обов'язково має міститись желатин. На 1 літр середовища припадає близько 45,6 г/л неочищеного білку, з якого і одержують 2 ферменти. Кінцева концентрація Р1 та Р2 становить 1,02 та 0,65 г/л відповідно. Максимальна активність протеази для обох ферментних фракцій була досягнута при 50 °С, рН 7,5 [28].

B. pumilus МР 27 було ізольовано з води Південного океану. Оскільки для виробництва протеази потрібні дорогі інгредієнти, було розроблено економічно життєздатний процес із використанням дешевого джерела вуглецю, пшеничної соломи з додаванням пептону. Ця протеаза була активною в діапазоні температур 10–70°С при рН 9. Такі умови підвищили активність протеази до 776,5 U/мл. Крім того, фермент був надзвичайно стабільним у широкому діапазоні температур і рН, зберігаючи 69% своєї активності при 50°С і 70% при рН 11. Молекулярне моделювання протеази виявило присутність серинових протеаз, сімейства субтилаз і серинового активного центру [29].

Культивування *B. safensis* RH12 на середовищі з галактозою та дріжджовим екстрактом призводить до синтезу протеази з активністю 9000 Од/мл. Тривалість культивування становить 22 години. Значення рН процесу становить 6,0, а

температура при цьому – 60 °С. Після очистки, активність ферменту збільшилась в 43 рази [30].

B. cereus ABBA1, *B. subtilis* RD7 та *B. subtilis* NRD9 було ізольовано з ґрунту Нігерії. Культивування тривало 24 години при рН 8,5 при 40 °С. Активність протеаз становлять 159,43 Од/мл, 141,28 Од/мл та 138,17 Од/мл відповідно. Як джерело вуглецю за порівнянням найкращим субстратом є мальтоза в концентрації 1,5 г/л. На ній, активність ферменту сягає 600 Од/мл та вище для кожного продуцента. Джерелом нітрогену варто обрати яловичий екстракт в кількості 2 г/л, оскільки активність протеази для кожного агента сягає 700 і вище Од/мл. Після оптимізації, активність ферментів становить 200,56 Од/мл, 176,00 Од/мл та 163,76 Од/мл [31].

B. licheniformis було модифіковано геном *aprE* задля збільшення синтезу протеази. Таким чином, було одержано штам ΔEP. Одержаний штам характеризується високою активністю протеази, на 42 годині культивування активність ферменту досягає 13309 Од/мл. Для одержання такої активності в середовищі використовували 64 г/л кукурудзяного крохмалю та 40 г/л соєвого шроту [32].

Подібне дослідження було проведено трохи раніше. *B. licheniformis* було модифіковано геном *aprE*, тим самим, створено штам *B. licheniformis* ΔsigF. Активність ферменту на 3 день культивування становила 29494 Од/мл. Для біосинтезу також використовували крохмаль та соєву макуху, проте в концентрації 50 та 30 г/л відповідно. Кількість інокуляту становить 5%, а рН 7,3 з температурою 37 °С [33].

B. cereus HP_RZ17 та *Paenibacillus xylanilyticus* HP_RZ19 – це штами, які також було ізольовано з землі. Відзначається, що для даних штамів оптимальними умовами культивування було рН на рівні 4,0, температура в 30 °С, фруктоза як джерело карбону. Щодо кількості інокуляту, для штаму HP_RZ17 оптимум становить 1,5%, а для HP_RZ19 – 0,5%. Щодо джерела нітрогену, найкращим варіантом є дріжджовий екстракт та казеїн відповідно. Після оптимізації, значення активності протеаз вирости до 144,99% та 204,6% для HP_RZ17 та HP_RZ19 [34].

B. stearotherophilus виділено із золів млину для виробництва оливкової олії. Для оцінки умов його культивування, включаючи температуру, рН, джерела вуглецю та азоту та час інкубації. Оптимальні умови культивування для накопичення біомаси (10 г/л) і продукції протеази (5050 Од/мл) були такими: температура 55 °С, рН 10, концентрація клітин для інокуляту 8×10^8 КУО/мл і час інкубації 24 години. Використання 3% дріжджового екстракту як джерела азоту та галактози (7,5 г/л) як джерела вуглецю сприяло як росту клітин, так і виробленню протеази [35].

B. luteus H11 виділено з лужного натронного вапна. Виділена протеаза була надзвичайно стабільною у присутності NaCl до 5 М. Фермент був активним у широкому діапазоні значень рН і температур, з оптимальним рН 10,5 і температурою 45 °С. Він мав молекулярну масу близько 37 кДа і виявляв активність проти азоказеїну та синтетичного субстрату для субтилізиноподібної протеази, N-сукциніл-1-фенілаланін-п-нітроаніліду. Після очистки, активність протеази становила 115,2 Од/мг. Відзначається, що для синтезу ферменту непоганим джерелом амінного живлення є порошок панцирів креветок. Щодо вуглецю – гарні результати притаманні глюкозі та фруктозі [36].

Відомі штами, які синтезують серинові кератинолітичні протеази (коротко кератинази). До них відносяться *B. amyloliquefaciens* MA20 та *B. subtilis* MA21. Для середовища використовували 1% вовни з овець як єдине джерело вуглецю та азоту. Активність ферментів становила 922 та 814 Од/мл. Кератинази знайшли своє застосування у фармації та косметології. Деякі медичні процедури та процедури проти старіння, такі як процедури проти зморшок, лікування акне та гіперкератозу, вимагають деградації надлишку кератину [11,37].

Кератиназу з активність 25,2Од/мл в статичних умовах синтезує штам *B. licheniformis* ALW1. За оптимізації параметри культивування даний показник становить 72,2 Од/мл. Для цього, порівнювали різні кератиназні субстрати, такі як: пір'я, вовна, волосся, нігті та рога. Найкращим за активністю ферменту виявилось пір'я в концентрації 1%. Як джерело азоту найкращим варіантом є кукурудзяний екстракт в кількості 0,919 %. Важливу роль відіграє внесений інокулят,

найоптимальнішою позицією цього параметру є 2,5 %. Щодо рН та температури процесу, найкраща активність відмічається при значенні 6,0 та 42 °C відповідно [38].

B. subtilis PF1 для одержання різних ферментів, у тому числі й кератиназ, використовує різні відходи агрокомплексу. Відмічається, що найвища активність кератинази відмічається на 72 годині культивування. В середовищі для культивування містилися картопляні очистки, пир'я та макуха з насіння ріпаку. При цьому, активність ферменту становила 21,9 Од/мл. Після оптимізації активність підвищилася до 49,14 Од/мл [39].

Штам *B. subtilis* DP1 було ізольовано з курячого пир'я для одержання кератиназ для потенційного використання в косметології. Найвищу продукцію ферменту (379,65 Од/мл) було отримано при рН 10,0, температурі 37 °C і періоді росту 72 години. Позаклітинну кератиназу очищали гель-фільтраційною хроматографією, що призвело до збільшення активності майже в 28 разів. Спектри інфрачервоної спектроскопії з перетворенням Фур'є (FTIR) стеарату натрію, карбонату кальцію та лаурилсульфату натрію не показують реакційної здатності функціональних груп, і, отже, суміш була сумісною для приготування крему для депіляції. Готовий біологічний засіб для депіляції видаляв волосся більше ефективно порівняно з наявними на ринку препаратами [40].

B. subtilis apr-IBL04 це мутантний штам, який одержали шляхом обробки бромиду етидію. Після оптимізації, умови культивування стали наступними: 72 години, №% інокуляту, рН 8, температура 45 °C. При таких умовах, активність ферменту становить 631,09 Од/мл. Для порівняння, вихідний штам міх синтезувати протеазу з активністю 82,32 Од/мл [41].

Відомі випадки твердо-фазного культивування бацил. Ізольований штам *Bacillus* sp. TMF-1 культивували на різноманітних субстратах: соєвий шрот, шрот соняшниковий, висівки пшеничні, макуха оливкова, висівки кукурудзяні та оплодень кукурудзи. Культивування тривало при 30 °C протягом 72 годин. За кінцевим порівнянням субстратів, соєвий шрот характеризується відносно високим вмістом білка (~45%) і вуглеводів (~35-40%) з ~1% залишкової олії. Проте,

найкращі результати щодо активності протеази показав не лише соєвий шрот (14,6 Од/г), а й оплодень кукурудзи (30,36 Од/г). Після очистки протеази з оплодня кукурудзи, його активність збільшилась до 50,51 Од/г [42].

B. subtilis K-1 було ізольовано з компосту. Для одержання протеази з цього біологічного агента, також застосовується твердо-фазне культивування. Загалом 10 різних субстратів, а саме: пшеничні висівки, бавовняна макуха, куряче перо, гірчична макуха, соєвий шрот, кукурудзяні висівки, рисове лушпиння, очеретяний жом, лушпиння та кукурудзяні качани перевіряли для одержання ферменту. Тривалість культивування становила 48 годин при 37 °С. Сільськогосподарські залишки, такі як макуха насіння бавовнику, мали максимальну активність протеази (728 Од/мл), за якою слідували лушпиння (714 Од/мл), гірчична макуха (680 Од/мл) і соєвий шрот (653 Од/мл). Крім того, статистична оптимізація трьох змінних, а саме пептону (1 г/л), вмісту вологи (100%) та температури інкубації (60 °С), призвела до збільшення виробництва протеази на 40% порівняно з неоптимізованими умовами (від початкових 728 до 1020 Од/мл) [43].

Штам *B. licheniformis* ZB-05 було ізольовано від узбережжя озера Ван. Даний агент також культивували твердо-фазно для одержання протеази. Найкращим субстратом за продукцією протеази виявилися рисові лушпиння. Оптимальна тривалість культивування становить 36 годин, кількість внесеного інокуляту – 30%, початкова вологість – 30%. Також, важливо до середовища додавати 2% сульфату амонію, а також 1% мальтози. При оптимізованих параметрах активність протеази становить 478000 Од/г [44].

B. infantis SKS1, штам що продукує лужу протеазу, була виділена з садового ґрунту північної Індії. Частково очищений екстракт *B. infantis* SKS1 був термостабільним і активним у присутності Mg²⁺, ацетилацетону та пральних порошоків, що передбачає його застосування в промисловості. Фруктоза та декстроза є найкращими джерелами вуглецю для виробництва ензиму. Максимальна продукція ферменту спостерігається при 40°C. Початкова активність ферменту становила 21.27 Од/мг [45].

В табл.1.2. показано бацили-продуценти протеаз.

Бацили-продуценти протеаз [15]

Продуцент	Субстрат	Активність протеази, Од/мл (г)	Умови культивування
Глибинне культивування			
<i>B. alkalitelluris</i> TWI3	Лактоза і знежирене молоко	322,8	pH 8,0, 40 °C, 150 об/хв, 42 год
<i>B. subtilis</i> KT004404	Екстракт солоду та глюкоза	55,1	pH 6,0, 55 °C, 150 об/хв, 48 год
<i>B. pumilus</i> MP 27	Пшенична солома і пептон	776,5	pH 9,0, 30 °C, 150 об/хв, 48 год
<i>Bacillus sp.</i> CL33A	Цільні пір'я	248	pH 7,0, 30 °C, 125 об/хв, 216 год
<i>B. subtilis</i> FBL-1	Фруктоза та дріжджовий екстракт	578,5	pH 6,0, 37 °C, 200 об/хв, 35,7 год
<i>Bacillus sp.</i> SB12	Крохмаль, дріжджовий екстракт, пептон	465	pH 7,0, 37 °C, 150 об/хв, 48 год
<i>B. subtilis</i> GA CAS8	Макуха арахісовий і капустяний лист	332,4	pH 9,0, 37 °C, 150 об/хв, 48 год
<i>Bacillus sp.</i> BGS	Меляса	2992,7	pH 11,0, 37 °C, 150 об/хв, 48 год
<i>B. subtilis</i>	Меляса та кукурудзяний екстракт	401	pH 10,0, 37 °C, 150 об/хв, 48 год
<i>B. pantotheneticus</i>	Меляса і пшеничні висівки	285	pH 10,0, 30 °C, 120 об/хв, 48 год
<i>B. subtilis</i> PCSIR-5	Соевий шрот	107	pH 7,5, 37 °C, 120 об/хв, 48 год
Твердо-фазне культивування			
<i>Bacillus sp.</i> BBXS-2	Пшенична солома	12200	45 °C, 48 год
<i>B. cereus</i>	Коров'ячий гній	4813	Вологість 120% 37 °C, 72 год
<i>Bacillus sp.</i> JB-9	Пшеничні висівки та цукрова тростина	7000	Вологість 90-95% 50 °C, 96 год
<i>B. pumilus</i> SG2	Макуха насіння <i>Pongamia pinnata</i>	9840	Вологість 60% 60 °C, 72 год
<i>B. cereus</i>	Червоне лушпиння	58	Вологість 50% 40 °C, 48 год

1.1.2. Інші можливі біологічні агенти для культивування протеолітичних ферментів

Група молочнокислих бактерій складається з видів, які є одними з найкраще вивчених мікроорганізмів. Більше того, протеоліз є однією з особливих фізіологічних властивостей молочнокислих бактерій. Протеолітична система молочнокислих бактерій пов'язана з утилізацією казеїну і постачає клітини незамінними амінокислотами під час їх росту в молоці. Молочнокислі бактерії та їх протеолітична система відіграють вирішальну роль в органолептичних властивостях кисломолочних продуктів. Крім переробки поживних речовин, клітинний протеоліз відповідає за контроль якості поліпептидів і регуляторних механізмів, підтримуючи належний рівень регуляторних білків і, за необхідності, видаляючи їх. Протеолітична система молочнокислих бактерій включає протеїнази, пептидази та специфічні транспортні білки. Протеїнази розщеплюють казеїн на пептиди, потім пептидази (внутрішньоклітинні) розщеплюють пептиди до амінокислот і менших пептидів. Транспортні системи відповідають за перенесення амінокислот і пептидів через цитоплазматичну мембрану [46].

Одним з прикладів молочнокислих, які синтезують протеази, може бути ізолят *Lactobacillus paracasei* CNCM I-5369, який виділено з традиційного алжирського молочного продукту. Протеази надали шифр E20. Відмічається, що найвища активність ферменту спостерігається на 48 годині культивування та становить близько 400 Од/мл. Концентрація неочищеного білку становила 0,8 г/л. Важливо відзначити, що ця фракція володіла антимікробною активністю проти різних штамів *Escherichia coli* [47].

Бактерії *L. fermentum* R6, виділена з Харбінських сухих ковбас, також мають здатність до синтезу протеази. Оптимізовані умови культивування були такими: час становив 48 годин, початковий рН 6 і температура 37 °С. Максимальна активність ферменту становила 26,4 Од/мл. Позаклітинну протеазу 37,7 кДа очищали за допомогою осадження сульфату амонію, системи іонообмінного шару та гель-фільтрації. Протеаза, продукована *L. fermentum* R6, мала найкращу стабільність при рН 6, 40 °С. Активність мікробної протеази може бути інгібована

динатрієвою сіллю етилендіамінтетраоцтової кислоти (EDTA). Концентрація брудного білку становила $17,3 \pm 0,85$ мг/мл відповідно. Протеаза могла гідролізувати міофібрилярні та саркоплазматичні білки, зокрема, важкий ланцюг міозину, параміозин, фосфорилазу та креатинкіназу-М типу [48].

Загалом, молочнокислі бактерії синтезують кислі протеази. Було використано *Lacticaseibacillus casei* (LBC 237) та *Limosilactobacillus fermentum* (LBF 433) для синтезу таких протеаз. Протеази, отримані з LBC 237 (LBC-P) і з LBF433 (LBF-P), показали кращу активність кислотної протеази при температурі $60\text{ }^\circ\text{C}$ і рН 5,5. Для стійкості до температури та рН LBC-P і LBF-P залишалися стабільними при температурі до $60\text{ }^\circ\text{C}$, з активацією між $50\text{ }^\circ\text{C}$ і $60\text{ }^\circ\text{C}$ і рН 4 і 5,5. Активність ферментів при цьому становили 144,6 Од/мл та 135,8 Од/мл відповідно [49].

L. delbrueckii, отриманого з козячого молока, також можуть синтезувати протеази. Найвища активність ферменту відзначається на 24 годині. Оптимальною температурою культивування вважається $37\text{ }^\circ\text{C}$, а рН – 7. Також, важливою є концентрація вуглецевого та амінного живлення. В даному випадку ним виступав казеїн в концентрації 0,8 г/л. Ступінь активності протеази становив 90 Од/мл [50].

L. plantarum SK було виділено з індонезійської ферментованої риби, відомої як бекасам. Оптимальними культуральними умовами для виробництва протеази були глюкоза 6%, пептон 6%, дріжджовий екстракт 7,5%, об'єм інокулянту 3% і рН 6,0. Питома активність протеази в неоптимальних умовах становила 3,615 Од/мг білка. За остаточних оптимізованих умов активність протеази становила 6,393 Од/мг білка, а спостережуване підтверджене експериментальне значення становило 6,503 Од/мг білка [51].

Ферментація кіноа молочнокислими бактеріями є цікавою альтернативою для виробництва нових хлібобулочних виробів, які підходять для хворих на целиакію, оскільки ця псевдо-злакова культура не містить глютену. Ріст і утворення молочної кислоти під час бродіння суспензії *L. plantarum* CRL 778 були вищими в кіноа ($10^{9,8}$ КУО/мл, 23,1 г/л), ніж у пшениці ($10^{8,9}$ КУО/мл, 13,9 г/л). Молочнокисле бродіння опосередковано стимулювало гідроліз білка борошна ендогенними

протеазами обох суспензій. Концентрація білку на кіноа становила 6,32 г/л. Проте гідроліз білка кіноа був швидшим, досягаючи 40–100 % через 8 годин інкубації, тоді як гідроліз білка пшениці становив лише 0–20 % [52].

Продуценти протеаз, крім бацил та молочнокислих бактерій, були виявлені серед *Aspergillus niger*, *A. terricola*, *A. oryzae*, *A. awamori*, *Streptomyces griseus*, *S. chromogenes*, *Actinomyces fradiae* та ін. Останнім часом мікроміцети та актиноміцети отримали широке застосування, оскільки простота їх вирощування і висока продуктивність [53].

S. globisporus 1/68 має високу здатність до деградації білка. Максимальна продукція протеази була показана в середовищі з галактозою як джерелом вуглецю (1,2 Од/мл). Серед перевірених неорганічних джерел азоту дигідрофосфат амонію ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) підтримував помірний ріст і продукцію протеази в *S. globisporus* 1/68 з ферментативною активністю 5,8 У/мл. Додавання органічних джерел азоту не впливало на біосинтез протеази в досліджуваній культурі. Крім того, амінокислоти, додані в середовище з вибраним неорганічним джерелом азоту, не мали істотного впливу на біосинтез протеази у *S. globisporus* 1/68 [53].

Streptomyces sp. Al-Dhabi-82 було ізольовано р ґрунту. Протеазна активність виявилася максимальною через 5 днів інкубації ($129,5 \pm 7,1$ Од/мл) і зменшилася через 6 днів інкубації ($113,8 \pm 4,1$ Од/мл). Виробництво ферментів збільшується зі збільшенням рН до 9,0 ($136,2 \pm 3,6$ Од/мл) і значно знижується при рН 11,0 ($67 \pm 2,9$ Од/мл). Максимальна продукція протеази спостерігалася при 40 °С ($164 \pm 11,1$ Од/мл). Серед досліджуваних джерел вуглецю мальтоза суттєво вплинула на продукцію протеази ($212 \pm 14,8$ Од/мл). Оптимальна кількість протеази ($269 \pm 10,4$ Од/мл), що продукується *Streptomyces* sp. Al-Dhabi-82 спостерігали у середовищі, що містить дріжджовий екстракт. Продукція ферменту була максимальною за присутності 0,15% Ca^{2+} . Питома активність неочищеного ферменту становила 26 Од/мг білка і зросла до 276 Од/мг білка після хроматографічного розділення. Фермент виявляв високу активність при рН 9,0 і втрачав близько 16% активності при рН 10. Оптимальна температура становила 40 °С [54].

Оптимізацію продукції лужної протеази *S. ambofaciens* NRRL 2420 у вільній та іммобілізованій формі досліджували за допомогою методики глибинної ферментації. Оптимальними умовами для максимального виробництва лужної протеази 342 Од/мл у вільних клітинних культурах були 30 °С, рН 8,5, час інкубації 96 годин з використанням крохмалю 20 г/л як джерело вуглецю та дріжджового екстракту 5 г/л як джерело азоту. Час інкубації для найкращого виходу 344 Од/мл іммобілізованими клітинами, адсорбованими на синтетичних бавовняних волокнах становило 72 годин за оптимізованих умов культивування (як і для звичайних культур). Іммобілізація *S. ambofaciens* NRRL 2420 на синтетичному бавовняному волокні дозволяє повторно використовувати клітини в оптимізованих умовах ферментації [55].

Streptomyces sp. штам АН4 продемонстрував високу здатність продукувати дві позаклітинні протеази при культивуванні на середовищі на основі дріжджового солодового екстракту і казеїну. Чисті білки отримували після термічної обробки (30 хв при 70 °С) і фракціонування сульфатом амонію (30–60 %) з наступною хроматографією. Перший фермент, отримав назву SAPS-P1, був оптимально активним при рН 12,0 і 70 °С, а другий, називався SAPS-P2, показав оптимальну активність при рН 10,0 і 60 °С. Обидва ферменти були повністю стабільними в широкому діапазоні температур (45–75 °С) і рН (8,0–11,5). Ці білки повністю інгібуються фенілметансульфонілфторидом і диізопропілфторфосфатами, що підтверджує їх приналежність до сімейства серинових протеаз [56].

Максимальну активність протеази 1193,77 Од/г було отримано після 96 год інкубації з 15% інокулятом штаму актиноміцетів *Brevibacterium luteolum* (МТСС 5982) при твердо-фазній ферментації на 10 г просіяних пшеничних висівок і 0,5 г рисового борошна. Середовище після ферментації використовувалося для видалення волосся без подальшої обробки, щоб уникнути витрат, пов'язаних із екстракцією ферменту. Це також допомогло врегульованому вивільненню ферменту з висівок у технологічний розчин для контрольованого видалення волосся [57].

Загалом 14 протеолітичних актиноміцетів було виділено в суворих умовах Єгипту. З них найбільшу протеолітичну активність виявляв ізолят *Saccharomonospora viridis* Hw G550 (528,9 Од/мл). Протеаза з ізоляту G550 виявила високу нематоцидну активність проти *M. incognita* в лабораторних умовах. Фермент виявляв максимальну активність і стабільність при лужному рН (8) і температурному режимі (50–60 °С) [58].

Нещодавно було виділено стійкий до солі алкаліфільний актиноміцет *Nocardopsis dassonvillei*, штам ОК-18. Він здатний виробляти протеазу з амінокислот як єдиного джерела вуглецю. Синтез позаклітинної лужної протеази пригнічувався концентрацією субстрату. Синтез протеази не був пов'язаний з ростом під час харчового стресу, оскільки виробництво протеази було високим, незважаючи на слабкий ріст. Коли амінокислоти служили єдиним джерелом вуглецю та азоту, виробництво ферменту значною мірою контролювалося їх кількістю. Максимальна продукція протеази була досягнута з використанням проліну (171,19 Од/мл), аспарагіну (105,58 Од/мл), тирозину (143,06 Од/мл), аланіну (148,32 Од/мл), метіоніну (112,8 Од/мл) та валіну (93,71 Од/мл) як єдиного джерела вуглецю та азоту в мінімальному середовищі. Зі збільшенням кількості різних амінокислот у присутності та відсутності глюкози продукція протеази була синергетично нижчою порівняно зі складним середовищем [59].

Aspergillus sp. вважається хорошим джерелом протеази. Штами *A. nidulans* LCJ249 і *A. flavus* LCJ253 культивували глибинно. Серед шести перевірених середовищ, бульйон що містив пептон, дріжджовий екстракт, глюкозу та казеїн виявився найкращим середовищем для максимального виробництва протеази як у *A. nidulans* LCJ249 (1178,0 Од/мл), так і в *A. flavus* LCJ253 (950,6 Од/мл). Також, окремо визначали фактори, які можуть впливати на синтез ферменту та показники його активності. У випадку *A. nidulans* LCJ249 середовище, що містило 20 г/л глюкози, 15 г/л солодового екстракту, 5 г/л казеїну, початковий рН середовища 7 і розмір інокулята 30 мг/л сприяли максимальному утворенню протеази. Подібним чином у *A. flavus* LCJ253 середовище, що містить 20 г/л крохмалю, 20 г/л пептону, 15 г/л казеїну, початковий рН середовища 7 і розмір інокулята 10 мг/л сприяли

максимальному виробленню протеази. В обох культурах продукція протеази була вищою в умовах струшування, ніж у статичних умовах [60].

A. oryzae KS 5 - це ґрунтовий грибковий ізолят, який здатний до синтезу протеаз. Умови синтезу було оптимізовано, та були наступними: рН 6,0, температура 35 °С, кількість інокуляту 4%. При культивуванні штаму за таких умов, активність ферменту становила 1,7 Од/мл [61]. *A. awamori* KGSR 12 також було ізольовано з ґрунту. Для даного штаму критерії оптимальності по рН та температурі є відповідними до *A. oryzae* KS 5. Оптимальна тривалість культивування становить 72 години, а кількість інокуляту – 0,5%. За оптимізованих параметрів активність ферменту становить 4,46 Од/мл [62].

Соевий шрот та пшеничні висівки оцінювали за допомогою твердо-фазної ферментації та за допомогою глибинного культивування в рідке середовище *A. oryzae*. Продукція протеїнази в твердому середовищі (2331 ± 39 Од/г) була приблизно в 4,9 рази вищою, ніж у рідкому (477 ± 13 Од/г). Було доведено, що деякі метаболіти, пов'язані з потоком вуглецю та біосинтезом амінокислот, регулюються продукцією протеїнази [63].

Протеолітична активність виділеного іоляту *A. brasiliensis* BCW2, була виміряна за зоною гідролізу, становила 38 мм. Виробництво протеази твердо-фазним культивуванням було оптимальним за рН 9,0, температури 30 °С, 10% апельсинової шкірки як джерела вуглецю, 2% дріжджів як джерела азоту, 60% вмісту вологи та періоду інкубації 72 години, активність ферменту за цих параметрів становить 2214 Од/мл. Очищена протеаза мала молекулярну масу 68 кДа. Частково очищена протеаза була стабільною при рН 4-6 і температурі 30-40 °С, виявляла підвищену активність з Ca^{2+} та Твін-20 і мала специфічність до желатину як субстрату [64].

A. oryzae SN93 було виділено із зразка ґрунту та досліджено за допомогою молекулярного аналізу. Після культивування *A. oryzae* SN93 протеазу 47,5 кДа очищали за допомогою осадження сульфатом амонію та хроматографії на Q-сефарозі. Оптимальний рН 8 і температура 50 °С отримані для виділеної протеази. Додецилсульфат натрію, цетилтриметиламоній бромід, H_2O_2 , 2-меркаптоетанол иа

EDTA знижували активність, тоді як Triton X-100 і фенілметансульфонілфторид не чинили інгібуючої дії на активність ферменту. Ізоаміловий спирт і ацетон (30%) посилюють активність. Період напіврозпаду ферменту становив 100 хв. Казеїн вважається найкращим субстратом для синтезу протеази, за прорахунками, концентрація ферменту має становити $2,432 \pm 0,266$ мг/л [65].

Alternaria alternata F19 було ізольовано з ґрунту птахоферми. Сільськогосподарські відходи листя цвітної капусти використовували як основний субстрат для виробництва лужної протеази при твердо-фазній ферментації. Відзначається підвищена активність протеази при додаванні 1,2% мальтози, 0,6 % знежиреного молока та 0,05 % $MgSO_4$. При виконанні усіх умов оптимізації активність ферменту становить 931 Од/г субстрату [66].

1.1.3. Рекомбінантні технології в біосинтезі протеаз

Експресія та очищення білків відіграють центральну роль у біохімії. Рекомбінантні білки можна експресувати за допомогою прокаріотичних систем (*E. coli* і *B. subtilis*), еукаріотичних систем (дріжджів, клітин комах і клітин ссавців) або систем *in vitro*. Система *E. coli* є хазяїном першого вибору для початкового скринінгу експресії рекомбінантного білка, оскільки цими клітинами можна легко маніпулювати, вони культивуються недорого і швидко ростуть. В останні роки було розроблено численні нові штами, вектори та мітки для подолання обмежень цієї системи, які включають зміщення кодонів, утворення тілець включення, токсичність, неактивність білка, нестабільність мРНК та відсутність посттрансляційної модифікації [67].

Високолужна протеаза з нової психротолерантної та лужнофільної бактерії *B. lehensis* була клонована та експресована в *E. coli*. Цей фермент має назву BLAP та належить до сімейства субтилаз S8 протеаз. Рекомбінантна лужна протеаза (rBLAP) — це мономерний білок масою $39,0 \pm 1,0$ кДа, який активний у широкому діапазоні рН (8–12) і температури (30–60 °С), з оптимумом при рН 12,8 і 50 °С. rBLAP стимулюється SDS, Co^{2+} , Ca^{2+} , β -меркаптоетанолом та інгібується Hg^{2+} та PMSF. Специфічна активність одержаного ферменту становила 28 Од/мг [68].

Ген лужної протеази *B. lehensis* JO-26 із солоної пустелі був клонований та експресований у *E. coli* BL21 (DE3). Ген був оптимально експресований у розчинній фракції з 0,2 мМ ізопропіл β -D-тіоґалактопіранозиду (IPTG), 2% NaCl при 28°C. Протеаза APrBL - мономер з молекулярною масою 34,6 кДа, була активною при рН 8–11 і 30°C–70°C, оптимально при рН 10 і 50°C. Фермент був високотермостабільним і зберігав 73% залишкової активності при 80°C до 3 год. Початкова активність неочищеного білку становила 430 Од/мг. Після афінної хроматографії, показник очищеного ферменту становив 4912 Од/мл. Це значно стимулювалося додецилсульфатом натрію (SDS), Ca²⁺, хлороформом, толуолом, н-бутанолом і бензолом, тоді як повністю пригнічувалося фенілметилсульфонілфторидом (PMSF) і Hg²⁺. Серинова природа протеази була підтверджена її сильним інгібуванням PMSF [69].

Повнорозмірна кДНК гена протеази з морського кільчастого черв'яка *Arenicola cristata* була ампліфікована за допомогою техніки швидкої ампліфікації кінців кДНК і секвенована. Протеаза належала до сімейства серинових протеаз. Вона була новою, оскільки показала низьку подібність послідовності амінокислот (< 40%) до інших серинових протеаз. Ген, що кодує активну форму серинової протеази *A. cristata*, був клонований і експресований в *E. coli*. Очищена рекомбінантна протеаза в надосадовій рідині могла розчинити штучну фібринову пластинку, багатим на плазміноген, тоді як фібрин, вільний від плазміногену, не показав чіткої зони, викликаного гідролізом. Цей результат свідчить про те, що рекомбінантна протеаза демонструє непряму фібринолітичну активність щодо розчинення фібрину та, ймовірно, є активатором плазміногену. Була створена модель щура з венозним тромбозом, щоб продемонструвати, що рекомбінантна протеаза також може гідролізувати тромб *in vivo*. Таким чином, цю рекомбінантну протеазу можна використовувати як тромболітичний засіб для лікування тромбозу [70].

Було виділено бактерію *B. licheniformis* ВВЕ11-1, що розкладає кератин, і її ген *ker*, що кодує кератиназу з нативним сигнальним пептидом, клонували та експресували в *B. subtilis* WB600 під промотором *PHpaII* вектора *pMA0911*. У 3-

літровому ферментері рекомбінантна кератиназа секретувалася з 323 Од/мл у неіндукованому стані через 24 години при 37°C. Потім кератиназу концентрували та очищали хроматографією гідрофобної взаємодії. Рекомбінантна кератиназа мала оптимальну температуру і рН при 40 °С і 10,5 відповідно, і була стабільною при 10-50 °С і рН 7-11,5. Було виявлено, що цей фермент може зберігати 80% активності після обробки протягом 5 годин 1М Н2О2. Фермент активують катіони Mg²⁺, Co²⁺ що призводить до гідролізу різних субстратів, такі як руйноване пір'я, бичачий сироватковий альбумін, казеїн, та желатин [17].

Ген *prtB*, що кодує протеїназу *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 92059 було клоновано та секвеновано. Два розчинних секретованих похідних His-мічених на С-кінці були сконструйовані та експресовані в *Lactococcus lactis* за допомогою системи експресії NICE. В обох отриманих похідних *PrtBb* і *PrtB2* С-кінцевий домен зв'язування клітинної стінки був видалений. Крім того, у похідному *PrtB2* С-кінцева частина В-домену була видалена, а сигнальна послідовність була замінена лактококовим експортним сигналом. Порівняння пептидів, утворених з тими, що утворені живим *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 92059 показали, що β-казеїн є фракцією казеїну, найбільш сприйнятливою до гідролізу. Під час тестування на біологічну активність гідролізат, отриманий з *PrtBb*, продемонстрував 50% інгібування ангіотензинперетворювального ферменту в концентрації 0,5 мг/мл та імуномодуляцію/протизапальну дію в аналізі *in vitro* TNF-α індукованої активації NFκB у концентраціях 5 і 2,5 мг/мл відповідно. Отриманий ферментативним шляхом гідролізат не виявляв жодної прозапальної чи цитотоксичної активності [71].

Аспарагінова рекомбінантна протеаза P6281 (rP6281) з *Trichoderma harzianum*, була експресована у *Pichia pastoris*. Фермент показав високу активність 321,8 Од/мл. Максимальна активність спостерігалася при рН 2,5 і 40°C, а фермент був стабільним в діапазоні рН 2,5-6,0. rP6281 значно пригнічував проростання спор і ріст патогенних грибів рослин і тварин, таких як *Botrytis cinerea*, *Mucor circinelloides*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Rhizoctonia solani* та *Candida*

albicans. Трансмисійна електронна мікроскопія виявила, що rP6281 ефективно пошкоджує клітинну стінку *Botrytis cinerea* [72].

Дріжджоподібний гриб *Aureobasidium pullulans* PL5 здатний продукувати гідролази, включаючи глюканази, хітинази та протеази. Ген лужної сериної протеази ALP5 з *A. pullulans* був клонований, вставлений у вектор *pPIC9* для конструювання *pPIC9/PL5*, а потім експресований у штамі KM71 *P. pastoris*. Протеаза ALP5 мала молекулярну масу 42,9 кДа після 5 днів росту з індукцією 1% метанолу при 28 °С. Рекомбінантна протеаза, експресована в *P. pastoris*, показала найвищу активність у лужних умовах (при рН 10) і температурі 50 °С. Найвищий рівень ефективності протеази спостерігався проти *M. fructicola* та *B. cinerea* [73].

Kex2 — це протеаза ~67 кДа, яка синтезується в дріжджах і грибах, яка спеціально розщеплюється за -Лізин-Аргінін- або -Аргінін-Аргінін-. Через те саме місце розщеплення *Kex2* потенційно може бути використаний у білковій інженерії, наприклад, для очищення білка. У недавньому дослідженні ген *KEX2* *Saccharomyces cerevisiae* був розроблений і сконструйований з використанням *pD902*, а потім інтегрований з геномом *P. pastoris* BG10. Під контролем промотора *AOX1* *Kex2* експресувався за допомогою індукції метанолом і був виявлений у позаклітинних фракціях [74].

Ген аспарагінової протеази (*RmpA*) був клонований з термофільного гриба *Rhizomucor miehei* CAU432 і експресований у *P. pastoris*. В кінці культивування було відмічена висока активність протеази - 3480,4 Од/мл. Даний фермент є екзометаболітом, а тому синтезується позаклітинно. Концентрація неочищеного білку становила 6,4 г/л. Очищений фермент був оптимально активним при рН 5,5 і 55 °С відповідно. Найбільш різке зниження активності протеази спостерігалось в присутності Hg^{2+} (залишкова активність 5,0%), SDS (11,0%) і Cu^{2+} (21,3%) [75].

1.2. Застосування різних протеаз в медицині

1.2.1. Антагоністична активність протеаз

Резистентність бактерій залишається основною перешкодою при лікуванні протимікробними засобами. Таким чином, було оцінено покращену антимікробну активність комбінацій левофлоксацину і серратіопептидази у мікробіологічних

дослідженнях *in vitro*. Було проведено фармакодинамічні та фармакокінетичні дослідження на щурах, інфікованих *S. aureus*. Препарат антибіотику та ферменту ліквідував >90% попередньо сформованої біоплівки. Ефективність захоплення у ліпосомах становила >80%. Спостерігалась висока концентрація антибіотику у легенях (3,39 мкг/мл протягом 3 годин). У фармакодинамічному дослідженні необроблені інфіковані легені щурів продемонстрували вищу експресію мРНК для маркерів запалення, рівня цитокінів і мікробного навантаження порівняно з контролем. І навпаки, препарат значно зменшив ці несприятливі наслідки [76].

Протеолітичні ферменти, що виділяються адаптованим до холоду мікроорганізмом *Arsukibacterium ikkense*, мають певні антимікробні властивості. Протеази показали високу антимікробну дію проти *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes* та *C. albicans*. Щодо *S. aureus* – ферменти були мало активними [77].

Helicobacter pylori — це грамнегативні спіралеподібні мікроаерофільні бактерії, які колонізують слизову оболонку шлунка людини, викликаючи хронічні інфекції, гастрит, виразкову хворобу, лімфоми, пов'язані з лімфоїдною тканиною слизової оболонки, і рак шлунка. ВООЗ вважає *H. pylori* канцерогеном 1 типу для людини. За оцінками, інфекція поширена більше ніж у половини населення світу. Лікування інфекції *H. pylori* включає антибіотики та інгібітори протонної помпи, але зростаюча стійкість до антибіотиків сприяє дослідженню нових, більш ефективних і природних антибактеріальних сполук. Для лікування захворювань, що спричинені цією бактерією, пропонується використовувати очищений протеолітичний екстракт плодів *Solanum granuloso-leprosum*, у поєднанні з гранулозаїном I. Антибактеріальну активність гранулозаїну I та екстракту оцінювали як мінімальну інгібіторну концентрацію (МІК) і мінімальну бактерицидну концентрацію (МБС) проти *H. pylori* NCTC 11638 (еталонний штам) і дванадцяти диких штамів *H. pylori*. Усі перевірені штами були чутливі до гранулозаїну I з МІК від 156,25 до 312,5 мкг/мл і МБС від 312,5 до 625 мкг/мл відповідно. Крім того, всі досліджувані штами були чутливі до екстракту з МІК від 312,5 до 625 мкг/мл та МБС від 625 до 1250 мкг/мл відповідно. Гранулозаїн I і

протеолітичний екстракт можна використовувати як безпечні природні харчові добавки та як ад'юванти для традиційної терапії проти *H. pylori* [78].

Відзначається позитивне поєднання серратіопептидази з низькопрофільним антибіотиком неоміцином задля лікування інфекції кишкової палички у курчат. Були проведені дослідження *in vitro* та *in vivo* для оцінки антимікробної активності та ефективності цієї комбінації. Результати показали, що птахи в групі, які одержували щодні препарат серратіопептидази 60 мг/л з неоміцином 30 мг/л продемонстрували значно більшу зону пригнічення, збільшене споживання корму, збільшення ваги та покращений коефіцієнт конверсії корму порівняно з контрольною та іншими групами порівняння. Крім того, у зазначеній групі було виявлено зниження індексу смертності та захворюваності. Патогістологічне дослідження показало, що у цій групі покращився стан тканин і спостерігалися посилені регенеративні зміни [79].

Enterococcus faecalis є частою причиною інфекцій ротової порожнини, таких як пародонтит, інфіковані кореневі канали та навколокореневих абсцеси.

Протеолітичний фермент бромелайн сприяє здоровому травленню, стимулює імунну систему, покращує стан серцево-судинної системи та прискорює загоєння ран. Сполуки бромелайну мають протизапальні та протипухлинні властивості та виявляють антибактеріальну дію. Питома активність бромелайну в сирому екстракті становила 62,89 Од/мг. Крім того, активність бромелайну за допомогою фракціонування сульфатом амонію становила 50,99 Од/мг, діалізу — 54,59 Од/мг, а іонообмінної хроматографії — 152,38 Од/мг. Екстракт бромелайну продемонстрував ефективну інгібіторну та бактерицидну дію проти *E. faecalis*. Результати тесту на інгібування з використанням екстракту бромелайну, очищеного за допомогою іонообмінної хроматографії, продемонстрували, що концентрація всього 12,5% була ефективною для інгібування росту *E. faecalis* [80].

Було також визначено антимікробну активність протеолітичних ферментів, що розм'якшують м'ясо (папаїну та бромелайну) проти *E. coli* та *L. monocytogenes* за трьох різних температур (5, 25 та 35°C). Дві нічні культури *E. coli* JM109 і *L. monocytogenes* були окремо суспендовані в 1% пептонній воді та піддані дії

протеолітичного ферменту (папаїну або бромелайну) при трьох різних температурах. Концентрації бромелайну (4 мг/мл) та (1 мг/мл), протестовані при 25°C проти *E. coli* та *L. monocytogenes* відповідно, були найефективнішими перевіреними концентраціями, що зменшували популяції на $10^{3,37}$ та $10^{5,7}$ КУО/мл через 48 год, відповідно. Рівні папаїну (0,0625 мг/мл) та (0,5 мг/мл) були найефективнішими концентраціями, протестованими при 25°C проти *E. coli* та *L. monocytogenes* відповідно, зменшуючи популяції на $10^{4,94}$ та $10^{6,58}$ КУО/мл через 48 годин, відповідно. Цікаво, що протестована нижча концентрація папаїну (0,0625 мг/мл) була більш ефективною, ніж вища концентрація (0,5 мг/мл) проти *E. coli* за всіх трьох температур [81].

1.2.2. Можливі застосування протеаз

Функціональна різноманітність протеаз супроводжується широким діапазоном структурної різноманітності, яку можна широко згрупувати залежно від того, чи знаходяться вони позаклітинно чи внутрішньоклітинно. Позаклітинні протеази, як правило, мономерні з високою субстратною специфічністю для одного білка або сімейства білків. Вони часто синтезуються як неактивні зимогени, захищаючи клітину від нерегульованої активності перед секрецією. Навпаки, внутрішньоклітинні протеази є мультимерними комплексами з невеликою субстратною специфічністю, але чия активність і вибір субстрату суворо регулюються. Щоб досягти такого рівня регуляції, каталітичні сайти приховані в бочкоподібних структурах, і отримання доступу вимагає вибору та розгортання субстрату. Таким чином, протеаза здатна специфічно націлюватися на широкий спектр субстратів, включаючи не тільки пошкоджені або неправильно згорнуті білки, але також і фактори транскрипції та сигнальні білки, необхідні для координації складних клітинних відповідей [82].

У ссавців протеази виконують різноманітні, клінічно значущі ролі та є мішенню для приблизно 5–10% усіх ліків, що розробляються. Позаклітинні секретовані протеази беруть участь у різноманітних ролях, починаючи від регуляції артеріального тиску (АПФ і ренін), згортання крові (тромбін) і регуляції рівня глюкози в крові (дипептидилпептидаза 4). Ці протеази є мішенню терапевтичних

препаратів, таких як препарати для лікування артеріального тиску каптоприл (Capoten; Bristol-Myers Squibb) і аліскіпен (Tekturna/Rasilez; Novartis/Speedel), і антикоагулянти дестирудин (Revasc/Iprivask; Novartis) і ривароксабан (Xarelto; Bayer) [82].

Внутрішньоклітинні протеази також є популярними терапевтичними мішенями в системах ссавців через їх участь у вірусних інфекціях, раку та нейродегенерації. Наприклад, типранавір (Aptivus; Pfizer/Boehringer Ingelheim) діє на протеазу ВІЛ, боцепревір (Videx/Teva) діє на протеазу NS5A вірусу гепатиту С, а бортезомід (Velcade; Millennium) є інгібітором протеасом, який використовується для лікування множинної мієломи. і мантийно-клітинна лімфома [82].

Цистеїнові протеази відіграють ключову роль у гідролізі гемоглобіну, інвазії клітин крові, виході та процесингу поверхневих білків. Катепсини та інші цистеїнові протеази можуть стати хорошими мішенями для основних захворювань, таких як артрит, остеопороз, СНІД, захворювання, пов'язані з імунною системою, атеросклероз, рак, а також для широкого спектру паразитарних захворювань, таких як малярія, амебіаз, чага хвороба, лейшманіоз або африканська сонна хвороба [83].

При паразитарних захворюваннях, таких як малярія, цистеїнові протеази (фальципаїни) *Plasmodium falciparum* особливо беруть участь у деградації гемоглобіну, виході паразита, процесингу поверхневих білків, отже, функціонують як багатообіцяючі нові лікарські мішені. *P. falciparum* експресує чотири папаїноподібні цистеїнові протеази, названі фальципаїном-1, 2, 2' і 3. Фальципаїн-2 і -3 є основними цистеїновими протеазами *P. falciparum*, які беруть участь у гідролізі гемоглобіну [83].

Бромелайн - це цистеїнова протеаза, виділена з ананаса, яка має ряд біологічних властивостей, включаючи інгібування агрегації тромбоцитів і протизапальну дію. Недавні дослідження оцінювали клінічні наслідки бромелайну для зменшення післяопераційних запальних ускладнень після операції на третьому молярі, але результати контрастні. Відзначається значний вплив бромелайну на поліпшення зовнішнього вигляду, соціальну ізоляцію і якість сну протягом

першого післяопераційного тижня. Відмінності в інтенсивності болю були виявлені протягом перших 24 годин і через 7 днів після операції. Не було знайдено доказів того, що бромелайн був ефективним у зменшенні тризму та набряку обличчя [84].

Двома найпоширенішими захворюваннями, що вражають нігтьову одиницю, є оніхомікоз (грибкові інфекції нігтьової пластини та/або нігтьового ложа) і псоріаз (імуноопосередковане захворювання, що спричиняє в'ядання нігтя та оніхолітичний відрив нігтя від нігтьового ложа). Щоб забезпечити ефективне місцеве лікування захворювань нігтів, необхідно, щоб твердий кератин нігтьової пластини був ослаблений або порушений. Кератинази підвищують проникність, коефіцієнт розподілу та рефлюкс мембрани. Визначено, що кератиназа з *P. marquandii* покращує доставку ліків шляхом часткового гідролізу нігтьових пластин. Кератинази є ефективними інструментами для гідролізу нігтьових кератинів, оскільки вони розщеплюють дисульфідний зв'язок, щоб збільшити доступ до медикаментозного лікування [85].

Здатність кератиназ гідролізувати кератин також може бути використана для загоєння ран. При опіках третього ступеня безсудинний характер ранового струпа може перешкоджати ефективній дифузії системних протимікробних агентів у рану, де кількість мікроорганізмів зазвичай дуже велика. Ферментативна обробка рани посилить проникнення місцево застосовуваних антибіотиків і сприятиме загоєнню рани. Також, оскільки дерматофіти є продуктивними продуцентами кератиназ, ряд дослідників запропонували рекомбінантні кератинази як потенційних кандидатів для виробництва вакцин проти дематофітів [85].

1.2.3. Відомі препарати протеолітичних ферментів, що застосовуються в медичній та супутніх до неї сферах

Мікроби вважаються очевидним лідером у виробництві корисних природних продуктів, таких як антибіотики, імунодепресанти, протиракові засоби, інгібітори ферментів, вакцини та антигельмінтики. Ферменти використовуються як терапевтичні препарати для лікування ферментативної недостатності та розладів травлення, а також для видалення мертвої шкіри. Крім того, ферменти відіграють вирішальну роль у клінічних діагностичних процедурах, таких як ELISA

(імуноферментний аналіз) і набори для діагностики діабету. Мікробні ферменти займають чільне місце серед біокаталізаторів і мають широкий спектр застосування в біотехнологічній промисловості та фармацевтиці. Підвищена стабільність, біохімічне різноманіття та потенційна сприйнятливість ферментів, отриманих з мікробних джерел, дозволили їм бути одними з найкращих груп кандидатів у розробці нових біологічно активних сполук, олійних хімікатів та ліків [86].

Протеолітичні ферменти використовуються для лікування опіків, а їх фібринолітичні похідні використовуються для руйнування тромбів і в лікуванні серцево-судинних захворювань, таких як атеросклероз, інсульт, стенокардія та захворювання периферичних судин. Наприклад, наттокіназа є сприятливим засобом для терапії тромбозу. Роданаза, декстраназа і кислотна протеаза досліджуються при лікуванні отруєння ціанідами, карієсу та аліментарної диспепсії. Холестеролоксидаза має потенційне застосування для тестування та контролю рівня холестерину. Подібним чином путресцинооксидаза допомагає визначати біогенні аміни, такі як путресцин, добре відомий маркер псування їжі. Тирозиназа використовується у виробництві L-дигідроксифенілаланіну (l-DOPA), попередника для виробництва дофаміну. Дофамін є ефективним препаратом для контролю нейрогенного ураження міокарда, а також для лікування хвороби Паркінсона. Уриказа використовується для лікування подагри [86].

Найсуттєвіша властивість дії протеаз полягає в їх здатності контролювати та обмежувати розщеплення до призначених субстратів без деградації функціональних білків. Крім того, 2 % функціональних генів, знайдених у геномі людини, кодують протеолітичні ферменти, тому вони стали важливими терапевтичними мішенями, а також використовуються в діагностиці [87].

Dispase - це пептидаза, яка комерційно виробляється *B. polymyxa*. Препарат випускається у вигляді стерильного ліофілізованого порошку. Диспаза гідролізує N-кінцевий пептидний зв'язок у неполярних амінокислотах. Така послідовність зустрічається в колагені з високою частотою. Диспаза має слабку протеолітичну активність, тому її широко використовують у процесах виділення та пасажування первинних клітинних ліній. Використання диспази призводить до поділу дерми та

епідермісу, що є вирішальним для створення *in vitro* культури кератиноцитів і фібробластів [88]. Властивості даного ферменту дозволяють його використовувати в комбінативному лікуванні ветиліго [89].

Комерційний фермент Elastoterase синтезується з *B. subtilis* 316М та використовується як терапевтичний засіб для лікування опіків і гнійних ран, карбункулів, фурункулів і глибоких абсцесів [90]. Ряд комерційних протеаз успішно використовується для виробництва протипухлинних білкових гідролізатів або пептидів, включаючи пепсин, трипсин, алкалазу, панкреатин, нейтразу, хімотрипсин, проназу, протеазу N, термоазу, кріотин і папаїн [91].

Комерційні продукти з використанням кератиназ для лікування захворювань нігтів включають FixaFungus™ від FixaFungus і Kernail-Soft PB від Proteos Biotech (Purchase, 2016). Ферментний препарат ZYMOX® Plus Otic (ZYMOX-P) (містить мутаназу і декстраназу) показав гарні результати у лікуванні зовнішнього отиту собак. Індивідуальні показники індекс отиту, еритема, набряк, ерозії/виразки, ексудат і свербіж продемонстрували значне зниження (85,7%, 95,7%, 83,3%, 80,0% і 89,3% відповідно) [92]. Prionzyme – це комерційний фермент, який використовується для розкладання пріонів на медичних інструментах [93].

Також, протеази медичного призначення нерідко виділяють з рослин (наприклад, вищезгаданий бромелайн). Такі приклади показано в табл.1.3.

Таблиця 1.3.

Рослинні протеази медичного призначення [94]

Протеаза	Джерело виділення	Призначення
Актинідин	Ківи (<i>Actinidia deliciosa</i>)	Загоєння нейропатичної діабетичної виразки стопи, підвищення перетравлення білка та полегшення запорів у тварин
Бромелайн	Ананас (<i>Ananas comosus</i>)	Лікування тромбозу, ревматоїдного артрити, ран, раку, астми, стенокардії, бронхіту, синуситу, остеоартрити, хірургічних травм, пієлонефриту, порушення всмоктування ліків, знімає біль і набряки, розлади кровоносних судин і серця, запальні захворювання в цілому
Кукумізин	Диня (<i>Cucumis melo</i>)	Лізіс згортання фібрину при тромботичних розладах

Фіцин	Інжир (рід <i>Ficus</i>)	Верміфуга; синтез біоактивних пептидів і розщеплення імуноглобуліну G.
Папаїн	Папая (<i>Carica papaya</i>)	Лікування набряків, синуситів, непереносимості глютену, гіпохлоргідрії, розладів травлення, видалення карієсу, загоєння опікової рани, інфекцій, раку, синтез фрагментів антитіл, модифікація матеріалу, багатого білком, для зменшення алергії.
Зінгепаїн	Зінгер (<i>Zingiber officinale</i>)	Антипроліферативний агент у тваринній моделі раку

Протеази використовуються в кремах (папаїн, бромелайн і субтилізин) для шкіри для очищення та розгладження шкіри шляхом відлущування мертвої або пошкодженої шкіри. Папаїн часто можна знайти в зубній пасті та рідині для полоскання рота, які використовуються для відбілювання зубів, видалення зубного нальоту та видалення відкладень, що викликають запах, на зубах і тканинах ясен [95].

ВИСНОВКИ

1. Для одержання комерційних протеолітичних препаратів дуже часто використовують бактерії роду *Bacillus*. Таке рішення може бути пояснено тим, що дані бактерії синтезують ферменти з високою активністю. До переваг цих агентів також варто віднести їх можливість культивування як на рідкому, так і на твердому середовищі.
2. Існують й інші продуценти протеолітичних ферментів, проте доволі часто вони мають суттєві недоліки в порівнянні з бактеріями роду *Bacillus*. Найчастіша причина, це вихідна активність одержаного ферменту. Через це, зараз існує дуже багато досліджень стосовно рекомбінантного синтезу протеолітичних ферментів.
3. Дуже важливим аспектом одержання якісного ферменту є стадія очистки ферменту. Саме методи виділення на пряму впливає на кінцеву активність, а також кількість ензиму.
4. Протеолітичні ферменти можуть володіти антимікробною активністю. Але, найчастіше за все, ці білки застосовують в комбінації з іншими антимікробними агентами, як каталізатори процесу протимікробно дії. Такі поєднання частково допомагають вирішити питання антибіотикорезистентності, відтермінуючи стійкість патогенів на певний час.
5. Протеолітичні ферменти вже використовуються в фармацевтиці та медицині в цілому. Дані білкові продукти можна зустріти також в косметичних продуктах, а також в зубних пастах та ополіскувачах ротової порожнини.

РОЗДІЛ 2

ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВА КЕРАТИНАЗИ ДЛЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ПРОТИ ОНІХОМІКОЗУ

2.1. Аналіз фармакологічних властивостей цільового лікарського засобу на основі кератинази, галузей використання, потреби у лікарському засобі проти оніхомікозу

Кілька препаратів на основі кератинази були доступні для комерційного використання. Ці продукти були складені з кератиназами переважно зі штамів *B. licheniformis*. PROTEOS Biotech має на ринку чотири фірмові формули, які включають Keratoclean® sensitive PB, Keratoclean® HYDRA PB, Keratoclean® BP і PURE100 KERATINASE. Вони спеціально використовуються як місцеві засоби для лікування проблем шкіри та пов'язаних із ними станів. Valkerase® і Versazyme® є продуктами BioResource International, Inc.. Продукти CIBENZA® DP100 та FEED-0001 були представлені на ринку кормів Novus International, Inc. та Creative Enzymes® відповідно. Ці продукти на основі кератинази корисні для покращення поживних цінностей кормів для тварин [96]. Отже, можна зробити висновок, що кератиназа наразі використовується у сфері косметології, тісно пов'язаною з фармакологією, а також як добавка до кормів для тварин.

Гіперкератоз можна визначити як аномальне потовщення зовнішнього шару шкіри, яке називається натоптишами та мозолями. Вони викликають тривожні симптоми через розвиток інтенсивного омертвіння шкіри, яка зазвичай з'являється на тильній поверхні пальців. Провідним компонентом цих утворених матеріалів є кератин, тому дерматологи призначають різні препарати на основі кератиназ для гідролізу таких складних речовин. Наприклад, Keratoclean®Hydra PB та Pure100 Keratinase були вироблені компанією PROTEOS Biotech для лікування ділянок шкіри, які страждають від гіперкератозу [97].

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.03 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>РОЗДІЛ 2. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВА КЕРАТИНАЗИ ДЛЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ПРОТИ ОНІХОМІКОЗУ</i>	<i>Лім.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розроб.</i>	<i>Касіч М.О.</i>						42	103
<i>Перевір.</i>	<i>Резніченко Ю.М.</i>							
<i>Реценз.</i>								
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>	<i>Стабніков В.П.</i>				<i>Кафедра БТМ</i>			

Медичні засоби на основі кератиназ показали високу ефективність для лікування вугрів, які зазвичай матеріалізуються у вигляді інфікованих сальних залоз шкіри. Зокрема, це може характеризуватися червоними прищами на обличчі, які поширені переважно серед підлітків. Основною причиною таких випадків є утворення надмірної кількості кератину, який блокує роботу сальних залоз. Деякі препарати, такі як Keratoclean Sensitive PB і Keratopeel PB, були запущені або для м'якого ферментативного пілінгу, або для активних ад'ювантів у деяких методах лікування акне [97].

Пріони є одним із найважливіших інфекційних білків, які спричиняють заразні та смертельні захворювання мозку. Кератинази від розкладання пера мають спорідненість розщеплювати структуру β -кератину. Таким чином, вони можуть руйнувати пріонний білок (PrPSc), який має велику щільність β -складчастих листів. Першою відкритою кератиназою для деградації PrPSc була KerA з *B. licheniformis* PWD-1. Крім того, кератиназа з термофільних *Thermococcus* sp. був застосований для отримання тваринного борошна без пріонів. Препарат Pure100 Keratinase була створена для гідролізу пріонів з хірургічних інструментів. З іншого боку, активність ферменту кератинази повинна посилюватися іншими речовинами, наприклад лугом, або високими температурами, щоб повністю знищити ці інфекційні матеріали. Як наслідок, деякі небезпечні матеріали можуть потрапити в навколишнє середовище [97].

Дослідження останніх років показали можливість використання нативної кератинази з *B. subtilis* RSE163 і рекомбінантної кератинази з *Escherichia coli* для лікування псоріазу шляхом оцінки зв'язування кератинази з фармацевтичними препаратами. Нещодавно гідролізати осяччої шерсті, отримані в результаті обробки волосся металокератиназою з *B. thuringiensis* MT1, індукували вироблення комплексу вітамінів групи B в *Saccharomyces cerevisiae*, що також можна використовувати у фармацевтиці [97].

Одним з найпоширеніших захворювань, при якому використовується кератиназа, є оніхомікоз. Нігтьова пластина на 80% складається з «твердого» кератину і на 20% з м'якого кератину. Для ефективного місцевого лікування нігтів

необхідно розслабити кератин твердої нігтьової пластини. Наприклад, кератиназа *P. marquandii* збільшує доставку препаратів шляхом часткового гідролізу нігтьових пластин. FixaFungus і Preteos Biotech виробляють FixaFungus™ і Kernail-Soft PB, які використовуються для лікування нігтів [98].

Кератиназа, будучи кератинолітичним ферментом, руйнує бар'єрні властивості нігтьової пластини і тим самим діє як покращувач нігтя. Кератиназа проявляє гідролітичну дію кератинових ниток і тканин нігтьової пластини. Деградація кератину включає протеоліз, сульфітоліз з наступним дезамінуванням. Кератиназа розщеплює пептидний зв'язок β -складчастого білка, що призводить до дезамінування (амінокислоти). Це зменшення дисульфідного містка відповідає за жорсткість, оскільки дисульфідредуктаза викликає конформаційні зміни в структурі білка, перетворюючи гідролітичні сайти для атаки кератинази. Нігтьова пластина складається як з твердого, так і з м'якого кератинового шару. Використання кератинази, яка руйнує м'який кератиновий шар, призводить до утворення дрібних пор на нігтьовій пластині, що покращує проникнення ліків, що призводить до ефективного лікування [4].

Грибок нігтів, або оніхомікоз – третє за частотою інфекційне захворювання нігтьової пластини. Воно приносить значний фізіологічний і психологічний дискомфорт хворому, а при несвоєчасному зверненні до лікаря загрожує деформацією або втратою нігтьової пластини. Саме тому лікування грибка нігтя необхідно починати при перших ознаках хвороби [99].

Збудниками оніхомікозу є патогенні гриби-дерматофіти і цвілеві грибки. При сприятливих умовах, збудники зберігають життєздатність в приміщеннях протягом багатьох місяців. Найчастіше інфікування відбувається в місцях загального користування: лазнях, саунах, басейнах, фітнес-центрах, роздягальнях. Тобто, в місцях з підвищеною вологістю і там, де здорові і хворі люди (які не почали або ще не завершили лікування оніхомікозу) контактують голими стопами з поверхнею підлоги. Заразитися можна і приміряючи взуття на босу ногу в магазині, а також скориставшись послугами манікюру або педикюру у недобросовісного майстра [99].

Не всі люди в однаковій мірі схильні до зараження грибковою інфекцією.

Виділено ряд факторів, що сприяють розвитку захворювання [99]:

- зниження імунних сил організму;
- цукровий діабет, псоріаз, екзема, полінейропатії, онкологія, дисфункція ендокринної системи та інші хвороби в анамнезі;
- порушення кровопостачання кінцівок;
- носіння незручного тісного взуття і білизни з синтетичних матеріалів;
- порушення правил особистої гігієни, особливо при підвищеній пітливості;
- механічні пошкодження нігтьової пластини;
- регулярний вплив побутовими хімічними засобами;
- прийом деяких лікарських препаратів.

Найбільш схильні до інфекції люди похилого віку, лікування нігтьового грибка у яких викликає труднощі через супутні захворювання і загальне зниження захисних функцій організму [99].

Оніхомікози класифікуються як дистальний латеральний піднігтьовий оніхомікоз, проксимальний білий піднігтьовий оніхомікоз, білий поверхневий оніхомікоз і кандидозний оніхомікоз залежно від типу ураження нігтя. Клінічна діагностика цієї інфекції проводиться за результатами лабораторного підтвердження. Лікування таких захворювань проводиться залежно від виду грибка і кількості уражених нігтів. Спочатку вважалося, що інфекція спричинена забрудненнями, але є повідомлення, що дріжджі також можуть бути частиною інфекції [4].

Види оніхомікозу [4]:

- Дистально-латеральний піднігтьовий оніхомікоз (DLSO) – це хворобливий стан, спричинений дерматофітною інфекцією. При цьому захворюванні уражається нігтьове ложе, що призводить до піднігтьового гіперкератозу та оніхолізису. Не впливає на нігтьову пластину. Він вражає або одну сторону нігтя, або поширюється по всьому нігтьовому ложу і досягає задніх

нігтьових складок. Це прогресування робить нігтьову пластину розсіпчастою і призводить до руйнування нігтя. Руйнування нігтя спричинене проникненням у нігтьову пластину дерматофітів, які мають кератолітичні властивості.

- Проксимальний білий піднігтьовий оніхомікоз (PWSO). Цей тип дерматофітної інфекції відноситься до інтеркурентних захворювань. Це трапляється у пацієнтів, які страждають на різні імунодепресовані захворювання, такі як ВІЛ-синдром.

- Білий поверхневий онікомікоз (WSO). Має менший ступінь тяжкості, ніж DLSO, оскільки ця інфекція вражає нігтьову пластину, а не нігтьове ложе. Поверхня нігтьової пластини лущиться з наступним білуватим відтінком.

- Кандидозний оніхомікоз - цю інфекцію спричинюють дріжджові гриби *Candida*.

Очікується, що глобальний ринок продажів кератинази зросте на 5,5% з 2022 по 2030 рік. Зростання ринку пояснюється зростанням попиту на кератиназу в кормах, косметиці, медицині та інших сферах застосування. Північна Америка домінує на світовому ринку продажу кератинази, за нею йдуть Європа та Азіатсько-Тихоокеанський регіон [100].

Нещодавні епідеміологічні дослідження показали, що кожна четверта доросла людина в Україні є носієм грибкової інфекції. Важливо відзначити, що за останні роки захворюваність серед населення зросла в 1,5 рази. І це не дивно, адже заразитися грибком досить легко, при цьому з віком ймовірність його появи значно зростає. У 25% випадків зараження відбувається в родині від близької людини. Тож, така статистика показує лише зростаючу загрозу грибкових захворювань, до яких відноситься оніхомікоз. На основі цього, маємо підставу для розробки нового препарату [101].

В Україні є велика кількість препаратів для лікування оніхомікозу. Пропонується зосередитись на рідких формах, а саме краплях, оскільки ця форма є однією з найзручніших. Аналіз ринку рідких препаратів для лікування оніхомікозу у вигляді крапель показано в табл.2.1.

З табл.2.1. можна сказати про малу кількість препаратів у вигляді крапель, що дає підставу на можливу розробку нового лікарського засобу.

Таблиця 2.1.

Аналіз ринку протигрибкових препаратів, які випускаються у вигляді крапель та використовуються проти оніхомікозу

Назва	Виробник	Кератинолітик	Ціна, грн	Курс лікування	Джерело
NanoDermix протигрибковий розчин для нігтів, 10 мл	ТОВ Артмік Груп, Україна	Саліцилова кислота	від 111,50 до 197,00 грн за 10 мл	2 рази на добу до 6 місяців	[102]
АнтиГрибок краплі для нігтів по 15 мл у флак.-кап.	ТОВ Еліксир, Україна		від 87,82 до 118,00 грн за 15 мл	2 рази на добу не менше 8 тижнів	[103]
Екзодерил розчин н/ш 1 % по 10 мл у флак.	Лек Фармацевтична компанія д.д., Словенія	Пропіленгліколь	від 242,38 до 299,92 грн за 10 мл	1 раз на добу від 2 тижнів до 6 місяців	[104]
Екзік розчин н/ш по 1 % по 20 мл у флак.	ТОВ «ДКП «Фармацевтична фабрика», Україна		від 184,20 до 313,60 грн за 20 мл		[105]

Тепер, пропонується виконати аналіз виробників кератинолітичних ферментів, основувшись в першу чергу на вартості ферменту. Такий аналіз показано в табл.2.2.

Таблиця 2.2.

Аналіз виробників кератинолітичних ферментів

Бренд	Країна	Вартість	Джерело
EnzymesBio	США	116 \$/кг	[106]
ENZIM Biotech	Україна	120 \$/ кг	[107]
Infinita Biotech Private Limited	Індія	42,58 \$/кг	[108]
Xi'an Multihealth Biotech Co., Ltd.	Китай	50 \$/кг	[109]

Спираючись на табл.2.2., в Україні існує одне підприємство, яке комерційно реалізовує кератиназу. Точно невідомо, чи це їх власне біотехнологічне виробництво, чи дана фірма займається перепродажем сировини, яку можна закупити дешевше в тому ж самому Китаї чи Індії. Як би там не було, в Україні щодо компанії ENZIM Biotech немає інших конкурентів, а отже наразі вони є монополістами. Враховуючи, що рівень конкуренції доволі низький, а також вартість ферменту, маємо підстави на створення власного біотехнологічного виробництва даного ферменту.

2.2. Обґрунтування вибору форми випуску лікарського засобу

2.2.1. Обґрунтування форми випуску лікарського засобу на основі кератинази проти оніхомікозу

Схема лікування оніхомікозу включає місцеве застосування, шляхом нанесення препарату на ніготь і пероральне застосування. Вибір лікування залежить від тяжкості захворювання. Незважаючи на те, що для лікування використовуються обидва шляхи, найбільш ефективний шлях і швидке одужання спостерігається при пероральному способі введення. Недоліком системного лікування є менша біодоступність препарату в місці дії порівняно з пероральним шляхом. Недоліком перорального лікування є повторне застосування препарату з дуже коротким інтервалом часу, що призводить до різних небажаних побічних ефектів [4].

Тому, кератиназу пропонують використовувати для препаратів місцевої дії для кращої проникності основної діючої речовини до нігтів. Для лікування грибка нігтів застосовують місцеві протигрибкові засоби — мазі, креми і розчини. Препарати від оніхомікозу є сильнодіючими і мають ряд протипоказань, тому використовувати їх потрібно тільки після консультації з лікарем [110]. Лікування оніхомікозу залежить від ступеня ураженості нігтів грибком. Хвороба лікується від двох місяців до року [111].

При місцевому застосуванні гелів, крапель, розчинів від грибка на поверхні нігтя вдається досягти високої концентрації лікарського засобу в ураженій ділянці. При цьому відсутні системні (що стосуються всього організму) побічні ефекти.

Найвдаліша лікарська форма для місцевого лікування грибка нігтя – лак. Лікувальні лаки для нігтів добре проникають крізь нігтьову пластину до ложа та створюють плівку на поверхні нігтя, яка перешкоджає випаровуванню препарату. Такі лаки виробляють на основі аморолфіну (Лоцерил, Екзодерил) або циклопіроксу (Цикложен, Батрафен). Обробку достатньо проводити один раз на тиждень. Існують і мазі від грибка нігтя з комбінованим складом (Пімафукорт, Тридерм). Вони мають протигрибковий, протизапальний та антибактеріальний ефекти і показані у разі приєднання бактеріальної інфекції. Препарати при оніхомікозі з високою ефективністю (до 90%) – це тербінафін (Ламізил), ітраконазол (Ітракон, Орунгал). Ітраконазол має широкий спектр дії та активний проти всіх збудників оніхомікозів [112].

Проблемою усіх цих засобів залишається незмінною – проникнення лікарського засобу до нігтьового ложа. Тому, застосування кератинолітичних ферментів є гарним рішенням для покращення ефективності таких препаратів[112].

Мазі та креми— м'яка лікарська форма, призначена для нанесення на шкіру, рани або слизові оболонки. Мазі з кремами складаються з основи та лікарських речовин, рівномірно розподілених у ній. До мазей також можуть входити консерванти, ПАР та інші допоміжні речовини, дозволені до медичного застосування. На сьогодні мазі застосовуються у медичній практиці з лікувальною, профілактичною, діагностичною метою, а також як косметичний засіб. Мазі та креми повинні мати певні консистентні властивості, які характеризуються реологічними показниками: пластичністю, в'язкістю, періодом релаксації, від яких значною мірою залежить ступінь фармакодинаміки. Мазі з кремами повинні мати оптимальну дисперсність лікарських речовин та їх рівномірний розподіл, що гарантує максимальний терапевтичний ефект і незмінність складу при зберіганні. Разом з тим вони повинні бути стабільними, без сторонніх домішок і з точною концентрацією лікарських речовин. Недоліком цієї форми є довге проникнення крізь ніготь, але перевагою – пролонгованість дії [113].

Розчини— однорідні (справжні, гомогенні) лікарські системи з рідким дисперсійним середовищем, що складаються з двох або більше компонентів, відносна кількість яких може змінюватися у широких межах без порушення вільно-дисперсного стану (однорідності). Найважливішою особливістю розчинів є самочинний (спонтанний) процес їх утворення. Розчинена речовина може бути твердою, рідиною або газом і знаходитися у вигляді окремих гідратованих іонів або молекул. З біофармацевтичної точки зору, розчини мають багато позитивних властивостей: більш фізіологічні й ефективні порівняно з іншими ліками, мають високу біологічну доступність (швидко й повно всмоктуються), швидше виявляють лікувальну дію, а в окремих випадках виключається подразнювальна дія на слизові оболонки деяких лікарських речовин [114].

Тому, з врахуванням всіх переваг та недоліків пропонується виготовляти лікарський препарат у вигляді розчину.

2.2.2. Обґрунтування вибору первинної і вторинної упаковки лікарського засобу на основі кератинази проти оніхомікозу

Розчини як лікарську форму продають у різній первинній упаковці. Це може бути просто флакон з рідиною без дозатору, або скляний флакончик з пластиковим дозатором або зі скляною піпеткою, тобто препарати у вигляді крапель [115].

Оскільки звичайний флакон не дуже зручно дозувати, дану форму препарату не розглядаємо. Залишаються флакончики з пластиковою крапельною насадкою та зі скляною піпеткою. Пластиковий дозатор зменшує габаритність самої первинної упаковки, але, їм не дуже зручно дозувати, оскільки споживач може лише перевернути флакон, з якого будуть литись крапельки з відповідною швидкістю, що може призвести до передозування препарату. В загальному це не буде мати негативних наслідків, але може вплинути на перерозхід самого препарату, що буде викликати потребу у додатковій його закупівлі. Крапельний скляний піпет-дозатор дозволяє уникнути цього перерозходу, що дозволяє зробити вибір натомість такої крапельної форми.

Тому, як первинну форму обираємо саме форму флакончику зі скляним крапельним піпет-дозатором.

Як вторинна упаковка буде виступати коробка з картону. Це екологічно, просто та дешево. На такі коробці дуже легко висвітлити усю необхідну інформацію, яка буде ознайомлювати споживача з діючою речовиною, формою препарату, його назвою та серією, дату виготовлення а також способом застосування та виробником.



Рис.2.1. Приклад первинної упаковки лікарського препарату [116]

На первинній упаковці варто передбачити назву препарату, діючу речовину, форму, серію, дату виготовлення та логотип фірми.

2.3. Вибір біологічного агента для біосинтезу кератинази

З попереднього огляду можна стверджувати про широкий спектр протеолітичних ферментів, які застосовуються в медицині. Пропонується для наших цілей обрати ферменти кератинази за їх цікаве використання у медицині. Вже існують препарати на основі цього ензиму. Кератиназа PURE100 — це комерційний препарат, рекомбінантна кератиназа, продана Zurko Bioresearch разом із Proteos Biotech у 2008 році для біомедичних, фармацевтичних і косметичних застосувань. Стверджується, що він має застосування для усунення кератину при псоріазі вугрів, усунення людської мозолі та деградації ороговілої шкіри, депіляції, приготування вакцини для терапії дерматофітозів, фармацевтичного покращення лікування нігтів і лікування шрамів, а також регенерації епітелію [117].

Бактерія *Bacillus sp.* MTS синтезу близько 0,16 г/л неочищеного ферменту. Проте, активність такої кератинази є дуже низькою, до 0,46 U/мг. Для даного ферменту застосовується ультраочистка, яка сильно знижує кінцеву концентрацію ензиму. Після очиски на перерахунок до середовища залишається всього 8 мкг/л кератинази з активністю в 33,5 U/мг [118].

При використанні рекомбінатного штаму *B. subtilis* WB600. Як вектор використовували рМА0911. Після культивування максимальна концентрація кератинази в супернатанті на перерахунок становить близько 0,066 г/л, а активність – 1181,54 U/мг. Після очищення кератинази залишається близько 0,022 г/л з активністю 7089,35 U/мг [119].

Штам *B. subtilis* RSE16 також є типовим продуцентом кератинази. При цьому, кінцева концентрація в супернатанті перед очисткою приблизно становить 6,6 г/л білку. Активність до очистки – 392,24 U/мг, а після - 3303 U/мг. При цьому, поживне середовище представляло з себе гідролізат курячого пір'я [120].

Використовуючи штам *Bacillus* sp. CSK2 вдалося одержати близько 0,82 г/л ферментного препарату. Активність при цьому становила 1539,09 U/мг. Культивування тривало 48 годин [8].

Таблиця 2.3.

Порівняння різних продуцентів кератинази

Біологічний агент	Склад поживного середовища, г/л	Режим культивування	Концентрація пептиду, г/л	Література
<i>Bacillus</i> sp. MTS	Порошок курячого пера – 10 K ₂ HPO ₄ – 0,3 MgCl ₂ ×6H ₂ O – 0,1 NaCl – 0,5 NH ₄ Cl – 0,5	48 год 37 °C рН 7,5 100 об/хв	0,16	[118]
<i>B. subtilis</i> WB600 трансформований плазмідом рМА0911	Триптон – 10 Дріжджовий екстракт – 5 NaCl – 5 Глюкоза – 10 MgSO ₄ – 0,1 Канаміцин – 0,02	24 год 37 °C рН 10,5	0,066	[119]
<i>Bacillus</i> sp. CSK2	Порошок курячого пера – 7,5 Мальтоза – 2 K ₂ HPO ₄ – 0,3 KH ₂ PO ₄ – 0,4 MgCl ₂ – 0,2 CaCl ₂ – 0,22	48 год 30 °C рН 5 200 об/хв	0,82	[8]

За таблицею 2.3. можна визначити найпродуктивнішого біологічного агента, а саме *Bacillus* sp. CSK2. Його синтезувальна здатність дає можливість

одержати близько 0,82 г/л неочищеного ферментного препарату. Варто зауважити, що середовище для культивування *Bacillus sp.* MTS є подібним до зазначеного біологічного агента, але різниця виходу ферменту відрізняється кардинально.

Проте, через різність поживних середовищ остаточний вибір зробити неможливу. Тому, пропонується порахувати вартість поживного середовища для кращої обгрунтованості вибору та додаткової порівняльної характеристики продуцентів кератинази.

Таблиця 2.4

Порівняння цін поживних середовищ

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації
<i>Bacillus sp.</i> MTS	Порошок курячого пера* - 10	1,75	0,0175	1
	K ₂ HPO ₄ – 0,3	123	0,0369	2
	MgCl ₂ ×6H ₂ O – 0,1	15	0,0015	3
	NaCl – 0,5	14	0,007	4
	NH ₄ Cl – 0,5	45	0,0225	5
	Ціна ≈ 0,09 грн			
<i>B. subtilis</i> WB600 трансформований плазмідом рМА0911	Триптон – 10	570	5,7	6
	Дріжджовий екстракт – 5	1100	5,5	7
	NaCl – 5	14	0,07	4
	Глюкоза – 10	56	0,56	8
	MgSO ₄ – 0,1	20	0,002	9
	Канаміцин – 0,02	80000	1,6	10
Ціна ≈ 13,42 грн				
<i>Bacillus sp.</i> CSK2	Порошок курячого пера* – 7,5	1,75	0,013125	1
	Мальтоза – 2	74	0,148	11
	K ₂ HPO ₄ – 0,3	123	0,0369	2
	КН ₂ РО ₄ – 0,4	92	0,0368	12
	MgCl ₂ – 0,2	15	0,003	3
	CaCl ₂ – 0,22	19	0,00418	13
Ціна ≈ 0,24 грн				

Примітка (ціни наведено станом на грудень 2023 року): 1 - <https://www.olx.ua/d/uk/obyavlenie/pr-ya-blizko-25-kg-dlya-podushok-ta-puhovikv-IDOerBA.html>, 2 - <https://prom.ua/p1514436596-ammonij-fosfornokislyj-zameschennyj.html?&primelead=M14wOA>, 3 - <https://prom.ua/p818430521-magnij-hlorid-indiya.html>, 4 - <https://prom.ua/p873314293-sol-pischevaya.html?&primelead=MC43>, 5 - <https://prom.ua/p1700644665-amonij-hloristij.html?&primelead=MC44>, 6 - <https://prom.ua/p505591948-pepton-fermentativnyj.html>, 7 - <https://prom.ua/ua/p1086437845-ekstrakt-drozhzhej.html>, 8 - <https://prom.ua/p818429907-dekstroza-glyukoza.html>, 9 - <https://prom.ua/p1629836398-sulfat-magniya-vodnyj.html?&primelead=M14wOA>, 10 - <https://us.vwr.com/store/product/7422506/kanamycin-sulfate-usp>, 11 - <https://prom.ua/p1701491568-maltodekstrin-harchovij.html?&primelead=MC44>, 12 -

*- оскільки порошку курячого пір'я не представлено на ринку, ціну вказано за 1 кг курячого пір'я, з якого можна зробити цей самий порошок. Варто врахувати, що пір'я – це у будь якого випадку відходи птахопромислового комплексу.

Найдешевше середовище виявилось у штаму *Bacillus sp.* MTS, але це знову не дає можливості ґрунтовно обрати біологічний агент, оскільки даний продуцент за таблицею 2.3. синтезує середню кількість ферменту. Отже, в таблицю 2.5. виводимо узагальнені дані з пропахунком умовних вартості ферменту, а також оцінюємо швидкість синтезу цільового метаболіту.

Таблиця 2.5

Порівняння біологічних агентів за економічно важливими показниками

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища, грн	Концентрація кератинази, г/л	Умовна вартість 1 г білку, грн/г	Тривалість культивування, год	Кількість утвореного ензиму за годину, г/год
<i>Bacillus sp.</i> MTS	0,09	0,16	0,56	48	0,003
<i>B. subtilis</i> WB600 трансформований плазмідом <i>pMA0911</i>	13,42	0,066	203,3	24	0,0027
<i>Bacillus sp.</i> CSK2	0,24	0,82	0,29	48	0,017

За всіма показниками з таблиці 4 очевидна перевага *Bacillus sp.* CSK2 як основного продуцента кератинази. Він має найвищу концентрацію ферменту, найменшу умовну вартість, а також швидше за всіх синтезує ензим. За останнім показником *Bacillus sp.* MTS та *B. subtilis* WB600 є дуже подібними, проте рекомбінантний штам культивує дороговартісний фермент, що робить його використання в промислових масштабах банально не рентабельним.

Тоді, беручи до уваги всі вищенаведені факти, робимо вибір в бік *Bacillus sp.* CSK2.

2.4. Розрахунок потреби у кератиназі для випуску лікарського засобу та розрахунок річної потреби у культуральній рідині для одержання розрахованої кількості кератинази

Для розробки нового лікарського засобу для лікування оніхомікозу пропонується спиратися на препарат NanoDermix, при цьому замінити азелаїнову та саліцилову кислоти на кератиназу. Даний препарат використовується 2 рази на день по 1-2 краплі на кожен палець протягом 8 тижнів – 6 місяців [102].

За статистикою, від оніхомікозу страждає близько 10% населення земної кулі, і з кожним роком ця цифра зростає [6]. Кількість населення Київської області станом на 2022 рік становила 1 795 542 осіб. З них, кількість випадків оніхомікозу становить:

$$1\,795\,542 \times 0,1 = 179\,554 \text{ випадків}$$

Забезпечувати від цієї кількості пропонується 25%. Отже, кількість населення, що будемо забезпечувати становить:

$$179\,554 \times 0,25 \approx 44\,889 \text{ випадків}$$

Враховуючи тенденцію нашого народу звертатися до лікарів в останній момент, будемо вважати, що дані випадки є запущені, а отже потребують довготривалого лікування на 6 місяців. Зазвичай оніхомікоз локалізується або на нігтях ніг, або рік. Дуже рідко дане захворювання може вражати одночасно руки та ноги. Тому в середньому будемо робити прорахунок на 10 нігтів. Курс лікування є наступни: двічі на день наносити по 1-2 краплі на нігті протягом всього періоду лікування. В 1 мл знаходиться близько 20 крапель [102,121]. Беремо за значення умовно 1 краплю на 1 ніготь. Тоді, кількість препарату для лікування 1 людини становить:

$$\frac{10 \times 1 \times 2 \times 182}{20} = 182 \text{ мл}$$

Кількість препарату, яка необхідна на всю Київську область:

$$44\,889 \times 182 = 8\,169\,798 \text{ мл} \approx 8\,170 \text{ л}$$

Оптимальною концентрацією кератинази для препарату є 1 мг/мл (на цю

концентрацію припадає 1539,09 U/мг, в той час як оптимальна активність для

розм'якшення нігтя становить від 1500 до 1800 U/мг) [122]. Цього буде достатньо для ефективної роботи лікарського засобу. Тоді, необхідна кількість ферменту на забезпечення населення Київської області становить:

$$8\,170 \times 1 = 8\,170 \text{ г} = 8,17 \text{ кг}$$

Концентрація кератинази в поживному середовищі становить 0,82 г/л [8].

Тоді, кількість культуральної рідини становить:

$$\frac{8,17}{0,82} \approx 10 \text{ м}^3$$

З врахуванням втрат, які складають близько 30%, кількість культуральної рідини на рік становитиме:

$$\frac{10}{1 - 0,3} = 14,3 \text{ м}^3$$

Приймаємо, що для отримання 14,3 м³ культуральної рідини необхідно 75 робочих трудоднів (Т_{рд}). Відповідно кількість культуральної рідини на добу (V_д) становитиме:

$$V_{\text{д}} = V_{\text{кр}} / T_{\text{рд}} = 14,3 / 75 \approx 191 \text{ л}$$
 Розрахуємо

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

$$V_{\text{крц}} = K_1 \cdot V_{\text{д}} \cdot T_{\text{цф}} / 24 = 1,1 \cdot 191 \cdot 55 / 24 \approx 481,5 \text{ л},$$

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 – 48 год, та вивантаження – 0,5 год, і становить 55 години. K₁ – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій (K₁ = 1,1).

РОЗДІЛ 3

ОБГРУНТУВАННЯ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ

Очищення кератинази необхідне для подальшого промислового застосування, щоб прискорити ефективність дії цього ферменту. Очищені ферменти, включаючи кератинази, можна отримати за допомогою різних методологій. Найпоширенішою стратегією є очищення ферментів шляхом осадження з подальшою колонковою хроматографією. Наприклад, кератиназу з молекулярною масою 35 kDa очищали від бактерії, що руйнує пір'я, за допомогою осадження сульфатом амонію з подальшим іонообміном (DEAE-Sepharose) і гель-фільтрацією (Sephadex G-75). Використовуючи подібну стратегію, очищали лужну кератиназу з видів *Bacillus* і ідентифікували її розмір (27 kDa) за допомогою MALDI-TOF-MS. Виходячи з природи адаптації рН кератинази, матриця колонки та метод очищення можуть бути бажаними при зміні профілю елюції. Крім того, очищення кератинази також може бути здійснено з більшою ефективністю шляхом імунопреципітації, коли доступне відповідне антитіло проти кератинази. Подібним чином метод імунохроматографії може бути реалізований з використанням антитіл проти кератинази для ефективного очищення кератинази [123].

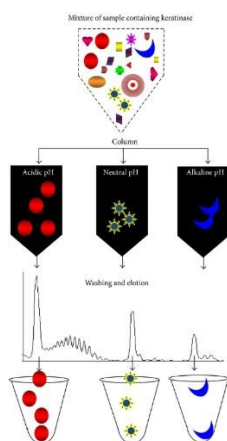


Рис.3.1. Стратегія хроматографічного очищення від кератиназ [123]

					НУХТ БТЕК 02.02.03 КР ПЗ									
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 3. ОБГРУНТУВАННЯ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ									
Розроб.	Касіч М.О.									Лім.	Арк.	Аркушів		
Перевір.	Резніченко Ю.М.										57	103		
Реценз.										Кафедра БТМ				
Н. Контр.														
Затверд.	Стабніков В.П.													

Часткове очищення кератиназ може бути досягнуто шляхом осадження ацетоном. Супернатант, що містить кератиназу, осаджують попередньо охолодженим ацетоном (30-80%). Ацетон додають до супернатанту у співвідношенні 3:1 та інкубують протягом 60 хв при 20°C. Суміш центрифугують при 10000 об/хв протягом 10 хв. Супернатант обережно відкидають, а осад розчиняють у 50 мМ Трис-ацетатному буфері, рН 7. Молекулярну масу частково очищеної кератинази можна визначити шляхом проведення відомих маркерів молекулярної маси в електрофорезі в додецилсульфат-поліакриламідному гелі натрію (SDS-PAGE). Осадження ацетоном використовували для очищення кератинази з *Aspergillus oryzae* NRRL-447, яка показала 258,8 Од/мг питомої активності з 2,3-кратним і 52,5% виходом. Так само, кератиназа з *B. licheniformis* FK 14 після очищення показала питому активність 218 Од/мг з 86-кратним очищенням і 25% відновленням. Одним із недоліків осадження ацетоном є те, що білок може бути денатурованим, і осад важко повторно розчинити [117].

Кератиназу також можна очистити осадженням сульфатом амонію. Повідомлялося про очищені кератинази з молекулярною масою в діапазоні 27-200 кДа з різних мікробних і грибкових джерел. Фермент у супернатанті осаджують додаванням твердого сульфату амонію з різними діапазонами насичення: 0-20, 20-40, 40-60, 60-80 і 80-100%. Осад збирають центрифугуванням при 8000g протягом 30 хв при 4°C. Осад ферменту розчиняють у мінімальному об'ємі 50 мМ Tris-HCl буфера, рН 7,5-8. Розчин ферменту потім знесолюється шляхом діалізу проти того самого буфера [117].

Проте, всі ці зазначені методи мають певні недоліки. Хроматографія (гель та іонна) можлива у промисловому виробництві, але дуже дорога та потребує великої кількості часу для її реалізації. Щодо очищення ацетоном та сульфатом амонію, білок має низький ступінь очищення, що недопустимо у розрізі виробництва фармацевтичного препарату [117].

Тому, для промислового виробництва з врахуванням очистки ферменту була запропонована технологія ATPS (aqueous two-phase system). ATPS є селективним методом очищення біомолекул, утворених шляхом змішування двох несумісних

водних розчинів, таких як поліетиленгліколь (PEG) і декстран або PEG і сіль з водою. ATPS було запропоновано як корисну техніку для розділення великої кількості біопродуктів, включаючи клавуланову кислоту, ферменти, ДНК і барвники. ATPS сприяє м'якому середовищу для біомолекул і низькому міжфазному натягу, який не денатурує ці сполуки. Коли розчин, що містить біомолекули, змішується з ATPS, він зазвичай має тенденцію до нерівномірного розподілу між фазами. Фермент, який цікавить, мігрує в одну фазу, тоді як частина забруднень мігрує в протилежну фазу, тим самим полегшуючи очищення. Додавання солей, які не входять до вихідного складу ATPS на основі полімер-сольових систем, є одним із факторів, що сильно впливає на розподіл білків. Серед цих солей хлорид натрію (NaCl) є найбільш часто доданою сіллю в ATPS у концентраціях до 8,8% [124].

ATPS технологія це не хроматографічний метод одержання важливих речовин білкового та небілкового походження, що дозволяє здешевити виробництво та процес очистки в цілому, що дозволяє його впроваджувати на великий промисловий комплекс. По факту технологія заснована на принципах екстракції. Автори зазначають про можливість застосування технології у великих масштабах, що робить її дуже привабливою. Тому, для одержання кератинази пропонується ґрунтуватись саме на цій технології [124,125].

Тому, маємо передбачити наступні стадії виділення:

- Відокремлення супернатанту від біомаси – оскільки кератиназа є екзометаболітом, її дислокація буде саме поза клітиною, а отже, в рідкій частину культурального середовища;
- Зменшення об'єму супернатанту – робочий об'єм за одну серію на цій стадії буде близько 480 л, що буде потребувати на себе в подальшому більш габаритного обладнання, а також додаткового використання реагентів. Для здешевлення, варто передбачити цю стадію;
- Перша стадія екстрагування – ця стадія передбачає первинну екстракцію кератинази за допомогою відповідних речовин, які на себе будуть

відтягувати запропонований фермент і відокремлювати інші залишки метаболітів;

- Друга стадія екстрагування – вона необхідна для відокремлення першої речовини, яка відтягнула на себе всю кератиназу, оскільки інакше подальші стадії очистки не матимуть сенсу;
- Дефільтрація – це додаткова стадія для видалення першої речовини, а також відокремлення ферменту від інших залишкових метаболітів за допомогою розмірних пор у фільтрі, які будуть відповідати розмірам кератинази, яку ми виділяємо;
- Сушіння – для отримання готового лікарського препарату маємо отримати порошок сухої кератинази, що зумовлює до її висушування.

3.1. Обґрунтування стадії відокремлення супернатанту від біомаси

Відділення біомаси від рідини включає багато технологій, що використовуються залежно від завдання. До них відносяться [126]:

- Осадження - відділення під дією сили тяжіння (при очищенні стічних вод);
- Фільтрація - пропускання суспензії в фільтруючий матеріал, де уловлюються частинки твердої фази-біомаса (виробництво антибіотиків);
- Сепарація, центрифугування - відокремлення під дією відцентрової сили (виробництво кормової біомаси - дріжджів, бактерій).
- мікрофільтрація для пропускання суспензії через мембрану з невеликим діаметром пор для забезпечення вмісту мікробних клітин, ультрафільтрація; ультрафільтрація дозволяє утримувати великі молекули розчинних речовин;
- Коагуляція - додавання реагентів до суспензії для осадження більших клітинних агрегатів та їх відділення від розчину та рідини;
- Флотація - уловлювання мікробної біомаси пінним кулькою і відділення її від фракції піни.

Варто врахувати всі можливі негативні сторони кожного методу. Все, що стосується методу фільтрації, непогано для методу, коли цільовий продукт

знаходиться в супернатанті. Це пояснюється тим, що тверда фаза і великі медулярні маси (в разі мікро - і ультрафільтрації) залишаються на фільтруючому матеріалі, але з цього випливає основний недолік, це закупорювання фільтрів, а отже необхідність у їх постійному відмиванні та регенерації, що потребує додаткового часу, а іноді реагентів. Ці недоліки не дають можливості обрати саме ці методики для цієї стадії, через велику кількість біомаси, яка буде сповільнювати процес, а не інтенсифікувати його [126,127].

Коагуляція, флотація також є хорошими методами, але для розділення біомаси та надосаду потрібно багато часу. Це збільшує час виробництва білка і, відповідно, збільшує кінцеву вартість продукту, що негативно позначається на виробництві. Цей негативний ефект також не дає змоги обрати цю методику за основну для подальшого виділення кератинази [126,127].

Тож, потрібно вибрати між сепарацією та центрифугуванням, оскільки воно базується на одному принципі - використання відцентрової сили для відділення твердої фази від рідини. Сепаратори в даний час широко використовуються в молочній промисловості. Їх головний недолік полягає в тому, що мундштуки і простір між тарілками швидко забиваються механічними включеннями і мертвими клітинами. Що стосується центрифуг, то в даний час вони стали більш поширеними в процесі поділу твердої і рідкофазної біотехнологій і все частіше використовуються для одержання препаратів ферментів. До основних недоліків цього типу обладнання можна віднести можливість механічного пошкодження клітин, але нас цікавлять не клітини, а супернатант [126,127]. Тому, спираючись на всі позитивні та негативні аспекти обираємо саме центрифугування.

З огляду на кількість культуральної рідини, що потрапляє на цю стадію, варто передбачити центрифугу проточного типу, яка економить час при відділенні біомаси від супернатанту. За допомогою проточної центрифуги можна безпосередньо перенести супернатант до необхідного обладнання без додаткових апаратів. Тому, залишаємо вибір за центрифугою з проточною центрифугою [128].

3.2. Обґрунтування методу концентрування супернатанту

Найбільш поширені такі методи концентрування: екстракція та екстракційна хроматографія, співосадження та осадження, дистиляційні методи (відгонка, фракційне випаровування, сублімація), адсорбційна, розподільча, осаджувальна хроматографія, іонний обмін, електроосадження, іонофорез, електродіаліз, флотація, ультрацентрифугування, мінералізація. Способи проведення концентрування залежать від методу аналізу. Для проведення концентрування в деяких випадках необхідні реактиви високої чистоти (всі види хроматографії, електрохімічні методи) у великій кількості, а іноді й спеціальна апаратура [129].

З врахуванням особливостей кератинолітичних ферментів, можна розглядати 2 методи концентрування, це упарювання та ультрафільтрація. Запропонована кератиназа є дуже термостабільною, а тому може витримувати доволі високі температури, що дозволяє використовувати методику упарювання. Про ультрафільтрацію було сказано вище (див.п.3.1.). В даному випадку, в надосаді присутня велика кількість позаклітинних метаболітів, що будуть забивати фільтри ультрафільтраційної установки та сповільнювати процес. Це, в свою чергу, буде потребувати додаткової промивки та регенерації (якщо, наприклад, будуть використовуватись фільтри на основі кераміки) фільтрів, а отже, додаткових витрат на обладнання. Випарювач потребує лише приготування повітря, яке і так передбачається технологічною схемою ділянки ферментаційних процесів, оскільки бацили – це строгі аероби. Отже, обладнання для підготовки повітря в будь якому випадку буде передбачатись для виробництва протеази. Через це, пропонується обрати саме випарну установку вакуумного типу для пришвидшення процесу концентрування нашої культуральної рідини [8,129].

3.3. Обґрунтування екстрагування кератинази

Для даної стадії в багатьох дослідженнях використовують PEG з додаванням солей. Це пов'язано з тим, що цей полімер зв'язується з гідрофобними ділянками на ферменті і таким чином дестабілізує його, ефективно відокремлюючи від інших речовин з супернатанту. Солі потрібні для додаткової очистки білкових молекул, тобто вони збільшують ступінь очищення за рахунок

змінни іонного потенціалу, додатково відштовхуючи непотрібні метаболіти. Тому, пропонується залишити цю речовину (PEG) для відокремлення кератинази від залишкових метаболітів. Як солі, в роботі використовують фосфат натрію та хлорид натрію, що також пропонується залишити незмінним. Але при цьому, PEG зв'язується разом з білком, тому потребує додаткової декон'югації [125,130].

Руйнування міцного зв'язку кератинази з PEG здійснюються за допомогою 100 мМ Tris-HCl буферу з додаванням сульфату амонію. Як було раніше сказано, сульфат амонію осаджує білок, а в нашому випадку ще й від'єднує від PEG, а Tris-HCl його розчиняє, тобто переводить у розчинну форму, що дозволяє відокремити його на подальшій стадії. Тому, через таку комбіновану дію, пропонується не змінювати ці розчини, а використовувати їх в подальшому у запропонованій технології виділення кератинази з культуральної рідини [125].

3.4. Обґрунтування відокремлення PEG від розчиненої кератинази

PEG можна видалити, додавши активоване вугілля до розчину, що містить білок або пептид, і потім видалить активоване вугілля шляхом центрифугування або фільтрації, або шляхом пропускання розчину через колонку з активованим вугіллям. Проте, це потребує додаткового використання активованого вугілля, яке після цього потрібно буде регенерувати (відновити до активованого для заощадження матеріалів, що призводить до закупівлі додаткових реагентів) [131].

Оскільки з минулої стадії ми отримуємо розчин, логічним буде запропонувати метод ультрафільтрації, який як раз використовується для розчинів, у якому речовини розчинені, оскільки молекули PEG більші за молекули кератинази [125]. З врахуванням цього методу маємо передбачити регенерацію керамічних фільтрів. Регенерація керамічного фільтру включає кілька операцій: (1) зворотне промивання, (2) ультразвукове очищення та (3) кислотну регенерацію. Зазвичай при цьому використовують щавлеву кислоту в концентрації 0,33 моль/л. Дана кислота – поширений і недорогий інгредієнт, а тому пропонується обрати саме метод ультрафільтрації з керамічними фільтрами, які будуть відокремлювати молекули PEG, залишаючи їх на кераміці, від кератинази [132].

3.5. Обґрунтування методу сушіння

Запропонована кератиназа є термостабільною, а з врахуванням об'єму (близько 117 л), який надійде для її швидкого сушіння варто звернути увагу на розпилюючу сушарку. Конвективні сушарки з ручним завантаженням не підходять для цього процесу через об'єм розчину, який надійде, це лише збільшить процес сушіння, а ліофілізаційна – просто не потрібна, тому що фермент може витримувати високу температуру [8,125].

Розпилююча сушарка дозволяє доволі швидко просушити фермент до стану порошку за високої температури. При цьому, також варто відмітити, що порошок при такому обладнанні буде збиратись в одну ємність, в той час як в сушильних шафах прийдеться збирати близько 276,4 г ферменту, що є дуже незручно. Тому, особливість ферменту дозволяє полегшити процес його сушіння, оскільки при виборі конвективних шаф потрібно було б передбачити додаткову стадію концентрування, а розпилююча сушарка дозволяє обійтись без цього додаткового та зайвого кроку [8,125].

РОЗДІЛ 4

ПІДБІР ТЕХНОЛОГІЧНОГО ОБЛАДНАННЯ З ВРАХУВАННЯМ МАТЕРІАЛЬНИХ ПОТОКІВ ПО СТАДІЯХ

Вихідні дані:

1. Об'єм культуральної рідини з однієї ферментації ($V_{кр}$) = 481,5 л;
 2. Концентрація біомаси *Vacillus sp.* CSK2 в культуральній рідині ($C_{біом}$) = 6 г/л;
 3. Концентрація кератинази в культуральній рідині ($C_{біом}$) = 0,82 г/л;
 3. Втрати на стадіях виділення і очищення кератинази = 30 %;
- Початкова кількість сухої кератинази складає $0,82 \cdot 481,5 \approx 394,8$ г, а кінцева її кількість, з урахуванням 30%-ів втрат, має становити 276,4 г. Розподіл втрат по усім стадіям виділення і очищення наведено в таблиці 4.1.

Таблиця 4.1

Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіям

№ п/п	Назва стадії (операції)	Матеріальні потоки на стадії	Кількість по стадіям			Необхідне обладнання
			Надійшло	Втрати (разом 30 %)	Вийшло	
1	2	3	4	5	6	7
ТП 3 Зберігання культуральної рідини						
1	ТП 3 Зберігання культуральної рідини	Культуральна рідина	481,5 л	-	481,5 л	Збірник культуральної рідини об'ємом 600 л
ТП 4 Центрифугування культуральної рідини						
2	ТП 4 Центрифугування культуральної рідини	Культуральна рідина	481,5 л	-	-	Центрифуга проточного типу
		Біомаса	-	-	≈2,9 кг	На утилізацію
		Супернатант	-	-	478,6 л	До збірника об'ємом 600 л

					НУХТ БТЕК 02.02.03 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Касіч М.О.			Лім.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Резніченко Ю.М.				65	103
Реценз.					Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Затверд.		Стабніков В.П.					
					РОЗДІЛ 4. ПІДБІР ТЕХНОЛОГІЧНОГО ОБЛАДНАННЯ З ВРАХУВАННЯМ МАТЕРІАЛЬНИХ ПОТОКІВ ПО СТАДІЯХ		

ТП 5 Упарювання супернатанту						
3	ТП 5 Упарювання супернатанту	Супернатант	478,6 л	-	-	Вакуум-випарна установка
		Упарений супернатант	-	5%	90,93 л	До збірника об'ємом 600 л
ТП 6 Перша стадія екстрагування						
4	ТП 6 Перша стадія екстрагування	Упарений супернатант	90,93 л	-	-	В збірнику об'ємом 600 л
		Перший розчин для екстракції на основі ПЕГ	363,72 л	-	-	
		Екстракт ферменту	-	10%	147,3 л	До збірника на 500 л
ТП 7 Друга стадія екстрагування						
5	ТП 7 Друга стадія екстрагування	Екстракт ферменту	147,3 л	-	-	В збірнику на 500 л
		Другий розчин для екстракції на основі Tris-HCl	254,8 л	-	-	
		Очищений від ПЕГ екстракт ферменту	-	10%	123,2 л	До збірника на 200 л
ТП 8 Дефільтрація розчину кератинази						
6	ТП 8 Дефільтрація розчину кератинази	Очищений від ПЕГ екстракт ферменту	123,2 л	-	-	В ультрафільтраційні установці
		Профільтрований екстракт	-	5%	117,1 л	До збірника на 200 л
ТП 9 Сушіння ферменту в розпилювальній сушарці						
7	ТП 9 Сушіння ферменту в розпилювальній сушарці	Профільтрований екстракт	117,1 л	-	-	В розпилювальній сушарці на 150 л
		Сухий порошок	-	-	276,4 г	В скляну ємність на 500 мл

РОЗДІЛ 5
СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ВИДІЛЕННЯ ТА
ОЧИЩЕННЯ КЕРАТИНАЗИ

Специфікація апаратурного обладнання для одержання кератинази показано в табл.5.1

Таблиця 5.1

Специфікація обладнання виробництва кератинази

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
ПЗ – 1	Повітрязабірник	1	Обладнаний металевою сіткою для видалення механічних забруднень.
Ф - 2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Панельний фільтр G4. Панельний повітряний фільтр складається з сталеві оцинкованої рамки, всередині якої покладено об'ємний фільтруючий матеріал, що складається з шару відкритопористого пінополіуретану. Країна: Україна. Бренд: ВЕНТ-ФИЛЬТР ¹
Ф-3	Фільтр тонкої очистки	1	Кишеньковий фільтр ФЯК 592x490x600-8 F9. Зроблений з рамки з оцинкованого профілю та фільтруючого матеріалу із синтетики у формі кишень. Країна: Україна. Бренд: АС ФИЛЬТР ²
Ф-4	НЕРА фільтр	1	НЕРА фільтр 305*610*78 Н14 ФяС. Виготовлений з використанням високоякісного фільтрувального матеріалу з ультратонких та мікротонких скляних волокон, упакованого у вигляді дрібних складок (мінігофр), розділених термопластичними або алюмінієвими сепараторами. Країна: Україна. Бренд: TECHNO-PARTS ³
Т-5	Теплообмінник-нагрівач	1	Нагрівач повітря Вентс НКВ 1000x500-2. Мінімальний робочий тиск – 16 бар. Нагрівач – водяний. Країна: Україна. Бренд: Вентс ⁴
Д-6 Д-23	Ваговий дозатор	2	Ваговий дискретний дозатор-витратомір для сипких продуктів. Має точність зважування 0,1%. Продуктивність: від 5 до 130 м ³ /год. Країна: Україна. Бренд: Техноаги ⁵

					НУХТ БТЕК 02.02.03 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.	Касіч М.О.				Лім.	Арк.	Аркушів
Перевір.	Резніченко Ю.М.					67	103
Реценз.					Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Затверд.	Стабніков В.П.						
					РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ КЕРАТИНАЗИ		

3-7	Збірник розчину для першої стадії екстракції	1	Хімічний реактор об'ємом 400 л. Виконаний з сталі типу 316L. Габарити: висота – 2000 мм, діаметр – 695 мм. Швидкість перемішування мішалки до 1300 об/хв. Країна: Іспанія. Бренд: COMQUIMA EUROPE ⁶
Д-8 Д-11	Об'ємно-ваговий дозатор	2	Дозатор води і рідин. Продуктивність від 10 мл до 9999 л. Робочий тиск від 0,5 атм до 10 атм. Країна: Україна. Бренд: Агро Тех ⁷
Н-9 Н-14 Н-17	Насос відцентровий	2	Відцентровий насос EUROAQUA РКМ 60 S. Потужність двигуна 370 Вт. Продуктивність - 2 м3/год. Робочий тиск 3,5 бар. Країна: Польща. Бренд: Euroaqua ⁸
3-10 3-25 3-28	Збірник для приготування Tris-HCl Збірник для зберігання екстракту кератинази Збірник для профільтованого екстракту кератинази	3	Реактор JJG-200 на 200 л. Оснащений мішалкою та датчиком контролю рН. Має подвійну сорочку. Виконано зі сталі типу 316L. Габарити: висота – 2330 мм, діаметр – 500 мм. Країна: Китай. Бренд: Wenzhou Yinuo Machinery Co., Ltd. ⁹
Н-12 Н-19 Н-21 Н-24 Н-26 Н-29	Насос перистальтичний	6	Перистальтичний насос ASP25/15IX. Максимальний тиск – 10 бар. Продуктивність від 60 до 385 л/год. Італія: Китай. Бренд: АСМЕ POMPE ¹⁰
3-13 3-16 3-20	Збірник для культуральної рідини Збірник для супернатанту Збірник для першої стадії екстрагування	3	Реактор JJG-600 на 600 л. Оснащений мішалкою. Має подвійну сорочку. Виконано зі сталі типу 316L. Габарити: висота – 2700 мм, діаметр – 650 мм. Країна: Китай. Бренд: Wenzhou Yinuo Machinery Co., Ltd. ⁹
Ц-15	Проточна центрифуга	1	Проточна центрифуга GF/GQ105. Внутрішній об'єм 6 літрів. Виконано зі сталі типу 316L. Максимальна швидкість – 19000g. Продуктивність 300-500 л/год. Країна: Китай. Бренд: Liaoyang Hongji Machinery Co., Ltd. ¹¹
В-18	Вакуум-випарна установка	1	Вакуум-випарна установка на 500 л FFE-500L. Продуктивність до 500 л/год. Агент упарювання – насичена пара. Виконано зі сталі типу 316L. Країна: Китай. Бренд: Topacelab ¹²

З-22	Збірник для другої стадії екстрагування	1	Реактор JJG-500 на 500 л. Оснащений мішалкою та датчиком контролю рН. Має подвійну сорочку. Виконано зі сталі типу 316L. Габарити: висота – 2600 мм, діаметр – 700 мм. Країна: Китай. Бренд: Wenzhou Yinuo Machinery Co., Ltd. ⁹
УФ-27	Ультрафільтраційна установка	1	Ультрафільтраційна установка СМР-01 зі встановленими керамічними мембранами на 10 кДа. Продуктивність – 100 л/год. Виконано з сталі типу 316L. Країна: Китай. Бренд: BTS Engineering ¹³
С-30	Розпилювальна сушарка	1	Розпилювальна сушарка ОР-LGP200. Продуктивність – 3-5 кг/год. Виконано з сталі типу 316L. Габарити: висота – 7200 мм, ширина – 7000 мм, довжина – 5500 мм. Робоча температура від 100 °С. Країна: Китай. Бренд: Luohe Orange Mechanical Equipment Co., Ltd. ¹⁴

Примітка: 1 - <https://ventfilter.kiev.ua/ru/goods/filtr-gruboy-ochistki-vozdruha-panelniy-4734820/>, 2 - <https://asfilter.com.ua/catalog/karmannye-filtry/karmanny-filtr-592kh490kh600-8-f9/>, 3 - <https://tehno-parts.com.ua/hepa-filtr-30561078-h14-fias>, 4 - <https://vencon.ua/ua/products/vents-nkv-1000x500-2>, 5 - <https://technowagy.com.ua/products/vesovoj-diskretnyj-dozator-rashodomer-dlya-sypuchih-3/>, 6 - <https://machineryline.ua/ru/-/prodazha/himicheskie-reaktory/REACTOR-400-LITROS-ACERO-INOXIDABLE-316-CON-SERPENTIN-INTERIOR-D--23040417460913165600>, 7 - <https://prom.ua/ua/p370228267-dozator-vody-zhidkostej.html?&primelead=My42>, 8 - <https://prom.ua/ua/p1156252914-tsentrobezhnyj-nasos-370.html>, 9 - https://www.alibaba.com/product-detail/JOSTON-Stainless-Steel-High-Pressure-Bulk_1600733558924.html, 10 - <https://dosingtech.com.ua/product/peristalticheskij-shlangovyj-nasos-asp25-15ix-385-l-ch-10-bar/>, 11 - <https://www.alibaba.com/product-detail/continuous-flow-centrifuge-60021532084.html>, 12 - https://www.alibaba.com/product-detail/Continuous-Evaporator-Topacelab-100L-200L-500L_1600343094432.html?spm=a2700.7724857.0.0.31f673cd9L1Q6I&s=p, 13 - <https://prom-nasos.pro/ua/catalog/engineering/filtration-plants/ultrafiltration-microfiltration/cmp-01-m-krof-ltrac-yna-p-lotna-ustanovka-z-keram-chnimi-membranami/>, 14 - https://www.alibaba.com/product-detail/5-200-Liters-milk-powder-making_1600196681352.html

РОЗДІЛ 6

ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНОГО ВИДІЛЕННЯ І ОЧИЩЕННЯ КЕРАТИНАЗИ ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ПРОТИ ОНІХОМІКОЗУ

На виробництві передбачається використання розпилюючої сушарки, тому потрібно передбачити підготовку та нагрівання аераційного повітря. Також, до допоміжних робіт треба віднести підготовку 2 розчинів для екстракції. Після цього, можна перейти до технологічного процесу.

ДР 1. Підготовка аераційного повітря

ДР 1.1. Забір атмосферного повітря

Атмосферне повітря забирають через повітрозабірник на висоті 10 м, де концентрація пилових часток і мікроорганізмів є мінімальною.

ДР 1.2. Груба очистка повітря

Дану операцію виконують з метою уникнення потрапляння бруду до готового порошку. Очистку повітря від пилу та механічних часток здійснюють у Ф-2, з затримуючою здатністю 90%.

ДР 1.3. Тонка очистка повітря

Задля зниження мікробного навантаження, а також зниження активності готової кератинази, потрібно передбачити високу очистку повітря. Повітря пропускають через Ф-3, з затримуючою здатністю 95%.

ДР 1.4. Надочищення повітря для сушіння

Дана стадія є останньою перед нагріванням готового повітря. Попередня фільтрація здійснюється задля уникнення великого навантаження на цю стадію для Ф-4, яки затримує до 99,995% бруду.

ДР 1.5. Нагрівання повітря

З метою запобігання утворення зайвого конденсату, охолоджене повітря у теплообміннику Т-5 нагрівають до температури 110 °С.

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.03 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Касіч М.О.</i>			<i>РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНОГО ВИДІЛЕННЯ І ОЧИЩЕННЯ КЕРАТИНАЗИ ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ПРОТИ ОНІХОМІКОЗУ</i>	<i>Лім.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Перевір.</i>		<i>Резніченко Ю.М.</i>					70	103
<i>Реценз.</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						

ДР 2. Приготування розчинів для екстракції

ДР 2.1. Приготування розчину для першої стадії екстракції

На ваговому дозаторі (Д-6) зважують 13,65 кг поліетиленгліколю (ПЕГ) 1500, 104,6 кг фосфату натрію, 36,4 кг хлориду натрію. Наважки подають до збірника об'ємом 400 л (З-7). Після цього, за допомогою об'ємно-вагового дозатор (Д-8) наливають 209 л води знесоленої. В реакторі вмикається мішалка (100 об/хв) та перемішує розчин близько 1 години до повного розчинення. Після цього, розчин подають за допомогою насосу відцентрового (Н-9) до збірника з супернатантом (З-20).

ДР 2.2. Приготування буферу Tris-HCl

На технічних вагах зважують 2,32 кг сухої готової суміші Tris-HCl. Після цього, наважку переносять до реактору об'ємом 200 л (З-10). За допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-11) доливають 145 л води знесоленої. Після цього, вмикається мішалка (100 об/хв) та перемішує розчин близько 30 хв до повного розчинення. Після цього, за допомогою датчика контролю рН, який передбачено конструкцією реактора, перевіряється рН, яке має становити 7,0. Після цього, розчин подають до відповідної стадії за допомогою перистальтичного насосу (Н-12)

ТП 3. Зберігання культуральної рідини

Культуральну рідину зберігають у З-13 при 4-8 °С для подальшого виготовлення відповідних препаратів.

ТП 4. Центрифугування культуральної рідини

Культуральну рідину від збірника З-13 за допомогою відцентрового насосу подають (Н-14) до проточної центрифуги (Ц-15). Температура процесу становить 4 °С. Швидкість обертання – 5000 g, а тривалість – 1 год. Після цього, супернатант передають безпосередньо до збірника (З-16) об'ємом 600 л. Біомасу передають на утилізацію.

ТП 5. Упарювання супернатанту

Супернатант із збірника (З-16) за допомогою відцентрового насосу (Н-17) подають до вакуум-випарної установки (В-18). До апарату подають насичену пару.

При цьому, встановлюється температура 100 °С. Тривалість випаровування становить 3 години. Ступінь випаровування – в 5 раз від початкового об'єму. Після цього, одержаний упарений супернатант передають до збірника (З-20) за допомогою перистальтичного насосу (Н-19).

ТП 6. Перша стадія екстрагування

До збірника (З-20) за допомогою насосу (Н-9) подають розчин для першої стадії екстрагування на основі ПЕГ 1500. Після цього, суміш активно перемішують за допомогою мішалки (500 об/хв) та залишають екстрагуватися протягом 5 годин. Після цього періоду, нижню фракцію передають на утилізацію (317,4 л), а верхню фракцію – 147,3 л, переносять до збірника (З-22) об'ємом 500 л за допомогою перистальтичного насосу (Н-21).

ТП 7. Друга стадія екстрагування

До збірника (З-22) за допомогою насосу (Н-12) подають розчин Tris-HCl від ДР 2.2. Після цього, на ваговому дозаторі (Д-23) зважують 111,5 кг сульфату амонію. Після цього, суміш активно перемішують за допомогою мішалки (500 об/хв) до повного розчинення амонійної солі та залишають екстрагуватися протягом 5 годин. Після цього періоду, нижню фракцію передають на утилізацію (295,3 л), а верхню фракцію – 117,1 л, переносять до збірника (З-25) об'ємом 200 л за допомогою перистальтичного насосу (Н-24).

ТП 8. Дефільтрація розчину кератинази

До ультрафільтраційної установки (УФ-27) за допомогою перистальтичного насосу (Н-26) від збірника (З-25) подають 117,1 л екстракту ферментів. Отвір мембрани становить 10 кДа. Кількість циклів – 5. Тривалість фільтрування становить 1,5 год. Температура процесу – 15 °С. Після цього, профільтрований екстракт подається до збірника об'ємом 200 л (З-28).

ТП 9. Сушіння ферменту в розпилювальній сушарці

Зі збірника (З-28) за допомогою перистальтичного насосу (Н-29) до розпилювальної сушарки (С-30) подається екстракт кератинази. Температура сушіння – 105 °С. Тривалість сушіння – 1 год. Маса ферменту має становити 276,4 г. Вологість – 5%. Одержану суху субстанцію кератинази переносять у скляну

ємність об'ємом 500 мл, закривають кришкою та передають на склад у холодильник. Температура зберігання – 4 °С.

РОЗДІЛ 7

КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА КЕРАТИНАЗИ ДЛЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ПРОТИ ОНІХОМІКОЗУ

7.1. Повірка дозуючого обладнання

Вагові та об'ємні дозатори підлягають щорічні повірці. Для таких операцій існують спеціально створені державні органи з метрологічно повірки. Зазвичай, повірку вагових дозаторів виконують за ДСТУ 7393:2013, а рідинні (об'ємно-вагові) - ДСТУ 7154:2010 [133-135].

7.2. Вимірювання рівня фракцій при екстракції

Оскільки екстракція буде проходити в збірниках, варто передбачити наявність рівноміра на апараті. Сучасний рівнемір являє собою систему, яка безперервно контролює рівень рідини, що знаходиться всередині резервуара або ємності. За допомогою зонда, який встановлений безпосередньо в резервуарі, система в автоматичному режимі постійно проводить вимірювання рівня рідини, температури, а також густини, і відображає отримані дані [136].

В нашому випадку перевагу треба віддавати безконтактним рівномірам безперервної дії. Тому, підійде рівнемір Micropilot FMR20. Micropilot FMR20 забезпечує безперервне безконтактне вимірювання рівня і витрати (з допомогою таблиці лінеаризації). Робоча температура $-40...+80^{\circ}\text{C}$. Робочий тиск $-1...3$ бар [137].



Рис. 7.1. Рівнемір Micropilot FMR20 [137]

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.03 КР ПЗ</i>					
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>						
<i>Розроб.</i>	<i>Касіч М.О.</i>				<i>РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА КЕРАТИНАЗИ ДЛЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ПРОТИ ОНІХОМІКОЗУ</i>					
<i>Перевір.</i>	<i>Резніченко Ю.М.</i>							<i>Лім.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Реценз.</i>									74	103
<i>Н. Контр.</i>								<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Затверд.</i>	<i>Стабніков В.П.</i>									

7.3. Визначення вологості кератинази

Для визначення вологості використовують аналізатори вологості. Найпопулярнішим та найпростішим за принципом вимірювання є ваговий аналізатор, який також ідеально підійде для потрібних нам вимірювань [138].

Лабораторні ваги KERN DAB 200-2 призначені для зважування і визначення вологості різних матеріалів. Для цього ваги мають нагрівальну камеру, яка може нагріватися до 199°C. У цій камері прилад висушує зважуваний зразок, а потім обчислює вміст води з різницею у вазі. Завдяки дискретності 0,01 г можуть бути визначені найнижчі різниці у вазі. Результати відображаються на великому РК-дисплеї. У пам'яті пристрою можна зберігати до 15 різних програм сушіння [138]. Вологість кератинази має становити 5%.



Рис.7.2. Лабораторні ваги KERN DAB 200-2 [138]

7.4. Визначення ваги кератинази

Контроль ваги одержаної кератинази також можна визначати на лабораторних вагах KERN DAB 200-2. Тому, для заощадження коштів на методи контролю, використовуємо цей прилад і для визначення ваги кератинази після розпилюючої сушарки, що має становити 275 г.

7.5. Визначення активності кератинази

Для початку в 100 мл води деонізованої розчиняють 100 мг ферменту. Фермент переносять до хімічної склянки на 500 мл. До нього доливають 100 мл 100

мМ Tris-HCl буферу та 300 мл розчину азоказеїну в концентрації 10 мг/мл. Після інкубації (40°C, 30 хв) реакцію зупиняють додаванням 600 мл 10% трихлороцтової кислоти (TCA). Потім цю суміш центрифугують (10000 г протягом 10 хв). Супернатант (800 мл) змішують з 1,8 М NaOH (200 мл) і визначають абсорбцію при 420 нм вимірювали спектрофотометром. Одну одиницю (U) активності протеази визначали як кількість ферменту, яка викликала збільшення на 0,1 одиниці поглинання у визначених умовах аналізу. Питома активність (Од/мг) виражається як співвідношення між протеолітичною активністю (Од/мл) і вмістом розчинного білка (мг/мл) [139].

Для визначення можна використати спектрофотометр LabAnalyt SP-UV1000. Довжина хвиль вимірювання даного апарату коливається від 200 до 1000 нм. Фотометричний діапазон -0,3-3,0 А. Точність вимірювання $\pm 0,02$ нм [140].



Рис. 7.3. Спектрофотометр LabAnalyt SP-UV1000 [140]

Активність кератинази має становити $1876,94 \pm 78,22$ Од/мг [8].

РОЗДІЛ 8

ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОДЕРЖАННЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ПРОТИ ОНІХОМІКОЗУ

8.1. Розрахунок річної потужності виробництва препарату проти оніхомікозу та кількості серій на рік

Препарат пропонується виробляти в баночках по 200 мл. Концентрація кератинази при цьому в препараті становить 1 мг/мл. За техніко-економічним обґрунтуванням була визначена річна потреба в кератиназі, яка становила 8,17 кг. Кількість препарату, яка потрібна на Київську область становить 8170 л. Тоді, річна потужність виробництва лікарського засобу становить:

$$\frac{8170}{0,2} = 40\ 850 \text{ флаконів/рік}$$

За один цикл одержується 418,5 л культуральної рідини, що еквівалентно 343,17 г кератинази (в культуральній рідині концентрація ферменту становить 0,82 г/л [8]). З врахуванням втрат на стадії виділення та очистки (30%) за один цикл одержується:

$$343,17 \times 0,7 = 240,219 \text{ г}$$

Отже, знаючи, що на 1 мл препарату припадає 1 мг кератиназу, за 1 серію одержуємо такий об'єм лікарського засобу:

$$240,219 \times 100 = 240\ 219 \text{ мл} \approx 240,2 \text{ л}$$

Враховуючи об'єм, що припадає на 1 одиницю готового лікарського препарату (200 мл), визначаємо кількість готової продукції за 1 серію:

$$\frac{240,2}{0,2} = 1201 \text{ флаконів/серію}$$

Отже, кількість серій на рік становитиме:

$$\frac{40\ 850}{1201} \approx 34 \text{ серії}$$

					<i>НУХТ БТЕК 02.02. КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Касіч М.О.</i>			РОЗДІЛ 8. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОДЕРЖАННЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ПРОТИ ОНІХОМІКОЗУ	<i>Лім.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Перевір.</i>		<i>Резніченко Ю.М.</i>					77	103
<i>Реценз.</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						

8.2. Обґрунтування вибору класів чистоти виробничих приміщень, підготовки персоналу, дезинфікуючих засобів, вентиляційного повітря

8.2.1. Вибір класу чистоти та вентиляційного повітря

Обраний лікарський препарат – це краплі місцевого застосування для наскрізного використання і він являє собою нестерильний лікарський засіб. Кератиназа має антимікробні властивості, але задля зменшення мікробного навантаження пропонується обрати клас чистоти С (порівняно з класом чистоти D, який має менші вимоги до чистоти) та готувати вентиляційне повітря для забезпечення ступеня очистки цього класу задля зменшення впливу мікроорганізмів з навколишнього середовища [141].

Клас чистоти чистої кімнати – це чітко регламентовані вимоги щодо рівня вмісту в повітрі різноманітних домішок та частинок. Класи чистоти розрізняються за кількістю та розміром частинок забруднення на одиницю об'єму. Цей параметр один із найважливіших у класифікації чистих кімнат та регламентується стандартами [142]:

ДСТУ ISO 14644-1-2002 “Чисті приміщення та пов’язані з ними контрольовані середовища”, частина 1, Класифікація чистоти повітря;

СТ-Н МОЗУ 42-4.9:2020 Лікарські засоби. Належна виробнича практика.

В деяких країнах існують свої регіональні стандарти, що регламентують чистоту повітря в приміщеннях, наприклад у Великобританії - BS5295, Франції - AFNOR X44101, Німеччини VD 1.2083. Тому був розроблений міжнародний стандарт ISO 14644-1 "Класифікація чистоти повітря", що визначає 9 класів чистоти по концентрації зважених часток [143].

Таблиця 8.1.

Взаємозв'язок між стандартами на чисті приміщення [143]

Країна	США		Великобританія	Німеччина	Франція	EU	ISO	Категорія
Стандарт	209D	209E	BS5295	VD 1.2083	AFNOR X44101	GMP	14644-1	
Дата видання	1988	1992	1989	1990	1972	1997	1997	

Класи чистоти	1	M1.5	C	1	-	-	3	жорсткий
	10	M2.5	D	2	-	-	4	жорсткий
	100	M3.5	E або F	3	4000	A/B	5	жорсткий
	1000	M4.5	G або H	4	-	-	6	середній
	10000	M5.5	J	5	400000	C	7	середній
	100000	M6.5	K	6	4000000	D	8	помірний

Щохвилини людина створює близько півтора мільйонів часток. Основними джерелами є волосся і одяг. Значна частина забруднюючих частинок виділяється при диханні. Тому всі роботи в чистій кімнаті повинні виконуватися в спеціальному одязі, виготовленого із спеціальної тканини. До персоналу чистої кімнати пред'являється ряд вимог, пов'язаних з їх особистою гігієною: від заборони на використання косметики і носіння бороди до заборони на куріння, оскільки курці створюють у півтора рази більше часток, ніж працівники, які не курять [143].

У системі подачі вентиляційного повітря у виробничих приміщеннях класів чистоти C і D прийнято застосовувати турбулентний повітряний потік. Повітря в них подається системою кондиціонування через встановлені на стелі розподільників повітря. Усередині приміщення додатково можуть встановлюватися пересувні рециркуляційні повітроочисники, що забезпечують швидке й ефективне очищення повітря за рахунок механічної фільтрації його через фільтр з ультратонких волокон і ультрафіолетової радіації [144].

Проектування турбулентно вентиляційних чистих приміщень відрізняється від проектування звичайних приміщень з кондиціонуванням повітря деякими особливостями [144]:

- Подавання значно більших об'ємів повітря;
- Використовуються вискоефективні повітряні фільтри, які зазвичай встановлюють в місцях подачі повітря в чисте приміщення;
- Організація руху повітря всередині чистого приміщення повинна сприяти видаленню забруднень;
- У чистому приміщенні створюється надлишковий тиск для того, щоб повітря рухалось в бік сусідніх менш чистих ділянок;

- Конструкційні та оздоблювальні матеріали повинні бути високої якості.

Очищення припливного повітря має бути ступінчастим. Кількість рівнів очищення обумовлюється необхідною чистотою повітряного середовища приміщення. Очищення повітря у виробничих приміщеннях С і D класів чистоти має бути дво або триступінчастим. На кожному рівні очищення слід використовувати фільтри, що по ефективності фільтрації відповідають вимогам європейських стандартів EN 779 та EN 1822 [145].

На кожному рівні очистки повітря фільтри повинні відповідати певним класам. Для виробничих приміщень С класу чистоти [145]:

- рівень-не нижче класу G 4
- рівень-не нижче класу F 7
- рівень-не нижче класу H 12

Комфортну температуру в виробничих приміщеннях слід підтримувати на рівні (21 ± 2) °С взимку і (23 ± 2) °С влітку, відносну вологість повітря - у межах від 30 до 50 % з урахуванням технологічних вимог. У виробничих приміщеннях, в яких не проводиться контроль на вміст часток та мікроорганізмів у повітряному середовищі, відносна вологість повітря має складати від 40 до 60 % [145].

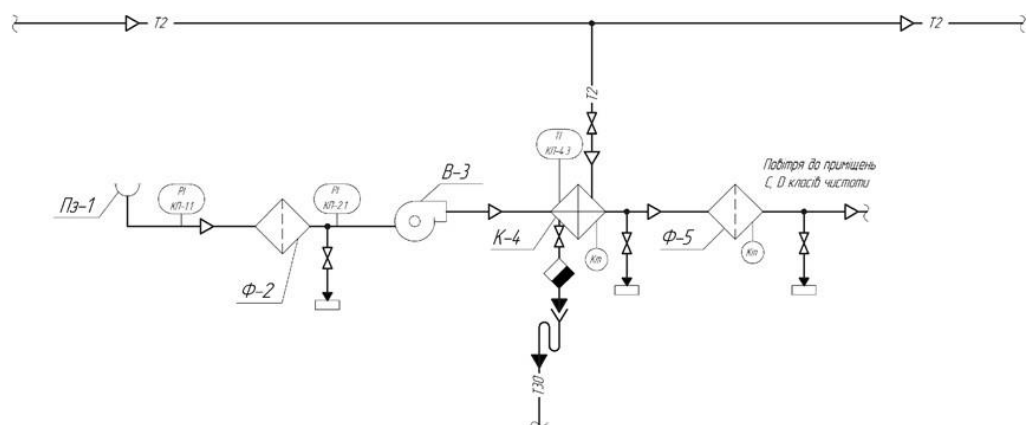


Рис.8.1. Апаратурна схема підготовки стерильного технологічного повітря двохступенева для приміщень класу чистоти С/D [145]

Трьохступенева очистка буде відрізнитись лише тим, що в кінці додається ще один фільтр очищення [145].

8.2.2. Підготовка персоналу

Готовність працівника фармацевтичного заводу до роботи включає ряд кроків та етапів, спрямованих на забезпечення його кваліфікованості, знань та відповідності стандартам безпеки та якості. Основні етапи підготовки працівника можуть виглядати наступним чином [146]:

1. Освіта та фахова підготовка:
 - Здобуття відповідної освіти в галузі фармації або інших пов'язаних спеціальностей.
 - Проходження спеціалізованого фармацевтичного навчання та курсів з підвищення кваліфікації.
2. Ознайомлення з внутрішніми правилами та процедурами. Ознайомлення з політикою якості, стандартами виробництва та внутрішніми правилами безпеки на фармацевтичному заводі.
3. Технічна підготовка:
 - Освоєння роботи з фармацевтичним обладнанням та технологічними процесами.
 - Проведення тренінгів з використання та обслуговування обладнання.
4. Стажування. Проходження стажування на виробництві для отримання практичних навичок та розуміння процесів виробництва.
5. Навчання з питань безпеки:
 - Отримання інструктажу з правил безпеки на робочому місці та екстрених ситуацій.
 - Знання та виконання вимог стандартів GMP (Доброї виробничої практики).
6. Сертифікація та ліцензування. Отримання необхідних ліцензій та сертифікатів для виконання конкретних завдань на фармацевтичному заводі (наприклад, при роботі з прекурсорами).
7. Оновлення знань. Участь у тренінгах, семінарах та курсах для оновлення знань з новітніх технологій та методів виробництва.

8. Контроль якості та валідація. Розуміння процедур контролю якості та валідації виробничих процесів.
9. Комунікаційні та міжособисті навички. Розвиток навичок комунікації та співпраці в колективі.
10. Етичний кодекс. Засвоєння етичних норм та відповідність етичному кодексу професії фармацевта.

8.2.3. Вибір дезінфікуючих засобів

Вибір дезінфікуючих засобів є важливим етапом в забезпеченні ефективного захисту від мікроорганізмів та збереженні гігієнічної чистоти. При виборі дезінфікуючого засобу слід враховувати кілька ключових факторів [147]:

1. Тип мікроорганізмів:

- Різні дезінфікуючі засоби можуть бути спрямовані на видалення конкретних типів мікроорганізмів, таких як бактерії, віруси, грибки. Важливо вибрати засіб, що ефективно вбиває ці конкретні мікроорганізми.

2. Тип поверхні або об'єкта:

- Деякі дезінфікуючі засоби придатні для використання на певних поверхнях або об'єктах (наприклад, для медичного обладнання, поверхонь у приміщеннях, шкіри). Важливо вибрати засіб, який підходить для конкретного застосування.

3. Активні компоненти:

- Різні дезінфікуючі засоби мають різні активні компоненти, такі як спирт, хлор, альдегіди, перекис водню. Деякі з них можуть бути більш ефективними проти певних видів мікроорганізмів чи підходити для конкретних умов використання.

4. Безпека та токсичність:

- Важливо враховувати безпеку використання дезінфікуючого засобу. Деякі засоби можуть бути токсичними, а отже, їх слід використовувати з особливою обережністю. Особливо важливо це враховувати при

використанні в чутливих місцях, таких як медичні установи чи приміщення для харчової та фармацевтичної промисловості.

5. Час дії та стабільність:

- Деякі дезінфікуючі засоби потребують певного часу для ефективної дії. Також важливо враховувати стабільність засобу та його тривалість зберігання.

6. Запах та аромат:

- Деякі засоби можуть мати виражений запах. Важливо враховувати цей аспект, особливо, якщо вони використовуються в чутливих місцях або у присутності людей.

7. Зручність використання:

- Деякі засоби можуть бути в зручній формі для використання, наприклад, рідини, спреї, серветки. Важливо вибрати засіб, який найбільше підходить для конкретного застосування та умов.

Дезінфектори класифікуються за типом діючої речовини на декілька груп.

Основні типи дезінфекторів за діючою речовиною включають [147]:

- Спиртові дезінфектори. В основі містять спирти, такі як етанол, ізопропанол, пропанол, бутандіол. Ефективні для рук, поверхонь та інших об'єктів. Широко використовуються за своєю ефективністю та швидкою випаровуваністю.
- Хлоровмісні дезінфектори. Містять хлор або його сполуки, такі як гіпохлорит натрію. Застосовуються для дезінфекції води, обладнання, поверхонь та інших об'єктів. Мають широкий зону дії.
- Фенольні дезінфектори. Засновані на фенолі або його похідних. Створюють захисну плівку, що довше зберігає дезінфекційний ефект. Застосовуються для обробки поверхонь, обладнання, інструментів.
- Альдегідні дезінфектори. Містять активні компоненти, такі як глютаровий альдегід, формалін. Ефективні проти різних мікроорганізмів, включаючи спори грибів.

- Пероксидоводневі дезінфектори. Базуються на перекисі водню. Цікаві відсутністю ароматичних параметрів та низькою токсичністю. Застосовуються в лабораторіях, медичних установах та інших чутливих місцях.
- Амінові дезінфектори. Включають третинні та четвертинні аміни. Застосовуються для дезінфекції різних поверхонь та об'єктів. Малотоксичні та широко використовуються в різних галузях.
- Органічні дезінфектори. Це новітнє покоління дезінфекторів, які мають високий рівень безпеки та ефективності. Зокрема, органічні дезінфектори на основі срібла азотнокислого.
- Гуанідинові дезінфектори. Містять гуанідин та його похідні. Використовуються для бактерицидної та віруліцидної дії, зазвичай в харчовій та фармацевтичній промисловості.
- Комбіновані дезінфектори. Містять кілька активних компонентів з різних груп. Забезпечують широкий спектр

З врахуванням того, що наше виробництво працює лише 75 днів, треба обрати всього 2 різних за діючою речовиною дезінфектора, щоб зменшити уникнення стійкості мікроорганізмів, що осідають на різні поверхні з навколишнього середовища. Пропонується розглянути 2 групи: хлорвмісні препарати через їх ефективність, а також комбіновані, які не містять в собі хлорвмісні речовини, також через їх потенціал в ефективності знешкодження непотрібних агентів.

Таблиця 2.2.

**Вибір засобів дезінфекції для виробництва препарату проти
оніхомікозу**

Тип	Назва	Склад	Вартість за 1 л(кг), грн	Робочий розчин, %	Ціна робочого розчину, грн/л	Джерело
Хлорвмісні	Хлорантин актив	натрієва сіль дихлоізоціанурової кислоти 89,0 ± 9,0%	410	0,03	0,012	[148]

Хлорвмісні	Хлорантоїн	дихлорантин 21,5-23,5 %	543,2	0,1	0,054	[149]
	Дезактін	1,3-дихлор-5,5-диметилгідантоїн у межах 21,0-23,0 % та 5,5-диметилгідантоїн у межах 12,4-16,4 %	552	0,1	0,055	[150]
Комбіновані	Антихлор Люкс	1,5 –алкілди-метилбензиламоній хлорид, полігексаметиленгуаніду гідрохлорид – 0,5%	960	0,01	0,009	[151]
	Фамідез Форте	формальдегід - 7,6 %, глутаровий альдегід - 4,5 %; гліколевий ефір – 5-15%; алкогільетоксилат – 5-15%	545	0,75	0,409	[152]
	Чистолайн Універсал	аніонні ПАР < 15 %; амфотерні ПАР < 5 %; неіоногенні ПАР < 5 %; 2–феноксиетанол 1 %;	121	0,1	0,012	[153]

Отже, економічно вигідніше з хлорвмісних препаратів використовувати Хлорантин актив, а з комбінованих - Антихлор Люкс. Тому, залишаємо вибір саме на цих дезінфекційних засобів.

8.3. Обґрунтування вибору підготовки первинної упаковки

Як первинна упаковка виступають флакони з піпетдозаторами. Їх підготовка полягає в тому, що їх попередньо треба промити водою очищеною, а потім просушити [154].

Миття зовнішньої і внутрішньої поверхні флаконів, а також дозаторів здійснюється в основному із застосуванням шприцевого або ультразвукового методу або їх комбінацій. Метод шприцювання оснований на обробці флаконів під тиском профільтрованими водою очищеною, парою, повітрям при положенні флакона горловиною вниз. Ультразвуковий спосіб миття оснований на використанні коливань, що випромінюються магнітострикційними перетворювачами, вмонтованими у дно або кришку апарата. При даному способі

миття флакони та дозатори занурені у воду на певній відстані від випромінювачів. Ефективнішим є контактнo-ультразвуковий спосіб очищення за рахунок безпосереднього контакту стінок флакона та дозатора з джерелом коливань. При цьому ультразвукові коливання збуджуються у самому виробі, що очищається, який стає випромінювачем, і очищення поверхні здійснюється як за рахунок специфічних ефектів, що виникають в рідині (імпульси тиску при захопленні кавітаційних порожнин), так і за рахунок механічних коливань самого флакона. Обполіскування флаконів проводять водою очищеною [154].

Після миття флакони за допомогою передавального пристрою надходять на сушіння. На цьому етапі використовуються сушильні установки тунельного типу, де флакони проходять 2 зони: нагрів до температури сушіння і охолодження [154].

Пропонується обрати метод ультразвукового миття первинної упаковки, через віддалений контакт ультразвукового модуля, який може призвести до часткового або повного руйнування упаковки.

8.4. Обґрунтування вибору підготовки води

Для миття, а також приготування лікарського засобу потрібно підготувати воду очищену. Вода очищена може бути отримана дистиляцією, іонним обміном, електролізом, зворотним осмосом. Якість води очищеної регламентується ФС 42-2619-89: вона повинна бути безбарвною, прозорою, без запаху і смаку; рН може коливатися в межах 5,0-7,0; не повинна містити відновлюючих речовин, нітратів, нітритів, хлоридів, сульфатів, слідів аміаку та інших домішок [155].

З методів одержання води очищеної найпоширенішим є метод дистиляції (перегонки). Перегонка води повинна проводитися згідно з наказом МОЗ України № 139 від 14.06.93 р. у спеціально обладнаному для цього приміщенні (дистиляційній). Стіни приміщення повинні бути пофарбовані олійною фарбою або викладені облицювальною плиткою і утримуватися в абсолютній чистоті. У цих приміщеннях забороняється робити інші роботи - мити брудний посуд, прати білизну, зберігати сторонні предмети. Як виняток може бути дозволена тільки стерилізація розчинів лікарських речовин [155].

Механічні домішки зазвичай відокремлюють відстоюванням з наступним зливанням води з осаду (декантацією) чи фільтруванням. Для цього використовують фільтри, виконані у вигляді ємності циліндричної форми, заповнені антрацитом чи кварцовим піском. Ємності мають кришку і дно, оснащене пристроєм для введення, виведення і розподілу води усередині фільтра. Фільтри можуть бути одношарові (наприклад, тільки шар антрациту) чи двошарові (антрацит і кварцовий пісок). Висота завантаження коливається в залежності від кількості суспендованих часток і бажаного промивного ефекту [155].

Руйнування органічних домішок. Перед дистиляцією до 100 л води, яка містить органічні домішки, додають у вигляді розчину 2,5 г калію перманганату (або 1% розчин калію перманганату 25 мл на 10 л води), перемішують і залишають стояти на 6-8 годин. Активний кисень, що виділяється, окисляє органічні речовини. Потім воду зливають і фільтрують [155].

Зв'язування аміаку. На 10 л води додають 5,0 г алюмінію сульфату чи алюмокалієвих галунів у розчиненому вигляді. При цьому протікає і побічна реакція: надлишок галунів реагує з хлоридами, що часто присутні у воді, з виділенням газоподібного водню хлориду, що легко переходить у дистилят. Якщо після використання галунів очищена вода дає реакцію з нітратом срібла, необхідно перед перегонкою додати ще двозаміщений натрію фосфат. Для зв'язування водню хлориду до 10 л води додають 3,5 г натрії фосфату двозаміщеного. При наявності вуглецю діоксида та інших летких домішок додають вапняну воду. По проходженні 20-30 хвилин воду декантують, фільтрують і після цього роблять перегонку [155].

Отже, перед перегонкою, для одержання води очищеної її потрібно спочатку прокип'ятити для видалення небажаних солей, які згодом відфільтруються через пісочний фільтр. До профільтрованої води додати калій перманганат, алюміній сульфат, двозаміщений натрій фосфат та вапняну воду. Після цього воду знову фільтрують і лише після цього піддають перегонці (дистиляції) [155].

8.5. Вибір технологічних стадій та операцій, обладнання

Для початку потрібно приготувати сам препарат, шляхом змішування води очищеної та кератинази. Оскільки він рідкий, для цього можна використовувати реактор-змішувач. На одну серію припадає близько 240 л препарату, отже потрібно передбачити реактор на 300 л. Потреби такого виробництва може задовольнити реактор SR300. Його виготовлено зі сталі нержавіючої. Робочі температури від -55 °С до +250 °С [156].



Рис.8.2. Реактор-змішувач SR300 [156]

Після одержання лікарського засобу його подають до лінії розливу за допомогою перистальтичного насоса. Проте, перед тим, як залити лікарський засіб у флакони, первинну упаковку потрібно помити та висушити. Попередньо було обрано миття флаконів та дозаторів зв допомогою ультразвуку. З цим завданням може впоратись автоматична лінія QBX12B. Швидкість миття від 80 до 200 флаконів/дозаторів на хвилину. Температура миття 40-50 °С. Габарити (мм): 4275 x 2838 x 1600 [157].



Рис.8.3. Автоматична лінія миття QBX12B [157]

Для сушіння можна використати сушильний тунель UVDM-1300. Дане обладнання містить в собі нагрівний елемент, що дозволяє додатково не

використовувати теплообмінник для підігріву повітря як сушильного агенту. Швидкість подачі апарату 2,88-20,22 м/хв. Габарити (мм): 4000x1760x2477 [158].



Рис.8.4. Сушильний тунель UVDM-1300 [158]

Після сушіння флакони наповнюються та загвинчуються дозаторами-піпетками. Для цього можна використати автоматичну лінію E -Fill SW Dropper. Продуктивність – 150 пляшок по 200 мл на 1 годину. Машина не лише заповнює та загвинчує флакони, але й клеїть на них відповідне маркування. Тому, додаткової машини для маркування флаконів передбачувати не потрібно [159].



Рис.8.5. Автоматична машина по наповненню, загвинчуванню та маркуванню флаконів E -Fill SW Dropper [159]

Наступним апаратом має бути апарат, який автоматично складає коробки та вкладає в них флакон з інструкцією. З цією задачею впорається автоматична лінія KV-80ZH. Швидкість роботи 20-80 коробок/хв. Габарити (мм): 4000x1579x1620 [160].



Рис.8.6. Автоматичний картонний пакувальник флаконів [160]

Після пакування у вторинну упаковку флакони потрібно запакувати в групову картонну упаковку. Оскільки за одну серію одержується доволі багато флаконів, варто передбачити автоматичне упакування в групову тару. Для цього пропонується використати атоматичну лінію ROY-15P. Упакувати будемо по 100 флаконів в одну коробку. Тож, з 1 серії має вийти 12 коробок. Продуктивність апарату: вкладання 30 шт. в 1 коробку за хвилину [161].



Рис.8.7. Лінія ROY-15P [161]

РОЗДІЛ 9

СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ПРОТИ ОНІХОМІКОЗУ

Специфікація обладнання, яке використовується для виробництва препарату проти оніхомікозу, де діючою речовиною виступає кератиназа показано в табл.9.1.

Таблиця 9.1.

Специфікація обладнання фармацевтичного виробництва препарату проти оніхомікозу

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
ПЗ – 1	Повітрязабірник	1	Хромований повітрязабірник CZNP. Основа виготовлена з хромованої нержавіючої сталі. Висота – 15 метрів. Країна: Польща. Бренд: DARCO ¹
Ф - 2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтр вугільний комірковий. Максимальна робоча температура – 50 °С. Клас очистки – G4. Пластиковий корпус. Країна: Україна. Бренд: ТОВ "ТЕКО Україна" ²
К-3	Компресор	1	Компресор Compass XY2065A-100. Об'єм ресивера – 100 л. Продуктивність на вході:400 л/хв. Продуктивність на виході:250 л/хв. Робочий тиск – 8 бар. Країна: Китай. Бренд: Compass ³
Т-4	Теплообмінник	2	Теплообмінник СТА-26. Продуктивність до 140 м ³ /год. Максимальна робоча температура – 240 °С. Робочий тиск від вакууму до 25бар. Матеріал пластин: сталь марки AISI 304/316L, титан, сталь марки SMO, сплав Хастелла. Країна: Україна. Бренд: Termoprom ⁴
Ф-5	Фільтр тонкого очищення	1	Фільтр очистки Jablotron F7. Клас чистоти – F7. Відфільтровує частинки розміром від 1 до 10 мкм: пух, пилок, спори цвілі тощо. Країна: Чехія. Бренд: Jablotron ⁵
Ф-6	Фільтр надочищення	1	HEPA фільтр. Клас чистоти H12. Матеріал фільтру - мікроскляні гофри. Корпус – нержавіюча сталь. Країна: Україна. Бренд: TechnoParts ⁶

					НУХТ БТЕК 02.02.03 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Касіч М.О.			РОЗДІЛ 9. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ПРОТИ ОНІХОМІКОЗУ	Літ.	Арк.	Архувів
Перевір.		Резніченко Ю.М.					91	103
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Д-7 Д-19	Дозатор води очищеної	1	Об'ємно-ваговий дозатор 2 Дозатор води і рідин. Продуктивність від 10 мл до 9999 л. Робочий тиск від 0,5 атм до 10 атм. Країна: Україна. Бренд: Агро Тех ⁷
3-8 3-11 3-14 3-17	Збірник для води	3	Реактор об'ємом 2000 л. Матеріал – нержавіюча сталь AISI 304. Оснащений подвійною сорочкою та мішалкою. Підключається до СІР мийки. Швидкість мішалки – 10-40 об/хв. Країна: Україна. Бренд: Промвіт ⁸
Н-9 Н-12 Н-15 Н-18	Насос відцентровий	2	Відцентровий насос CG-150 220-500. Продуктивність 150-500 л/хв. Робоча температура -20/+50°C. Тиск на виході 2 бар. Країна: Іспанія. Бренд: Gespasa ⁹
Ф-10 Ф-13	Фільтр піщаний	2	Піщаний фільтр ATS FLT019. Продуктивність 56 м ³ /год. Матеріал корпусу – поліпропілен. Тип підключення – боковий. Країна: Турція. Бренд: Atlaspool ¹⁰
Д-16	Дистиляційна установка	1	Промислова дистиляційна установка об'ємом 2000 л. Підключається до СІР мийки. Матеріал – сталь та мідь. Країна: Китай. Бренд: DYE ¹¹
3-20	Збірник для лікарського засобу	1	Реактор SR300. Робочі температури від -55 °С до +250 °С. Виконано з нержавіючої сталі, оснащений мішалкою. Країна: США. Бренд: Across International ¹²
Н-21	Насос перистальтичний	1	Перистальтичний насос MP-8086.16. Продуктивність 364 л/год. Потужність 0,09 кВт. Максимальна робоча температура 60 °С. Країна: Італія. Бренд: FLUIMAC ¹³
AM-22	Автоматична лінія миття флаконів та дозаторів	1	Ультразвукова мийка QBX12B. Продуктивність 80-200 флаконів/хв. Температура миття 40-50°C. Габарити (мм): 4275X2838X1600. Країна: Китай. Бренд: Shanghai IVEN Pharmatech Engineering Co., Ltd. ¹⁴
С-23	Сушильний тунель	1	Сушильний тунель UVDM 1300. Швидкість подачі, 2,88-20,22 м. Потужність 28 кВт. Габарити (мм): 4000x1760x2477. Країна: Україна. Бренд: ООО “МВМ-Київ” ¹⁵
АН-24	Автоматична машина по наповненню, загвинчуванню та маркуванню флаконів	1	Машина E-Fill SW Dopper. Продуктивність 150 флаконів/год. Робоча температура від 10 до 30 °С. Габарити (мм): 2000x2100x5000. Країна: США. Бренд: CDA ¹⁶
AK-25	Автоматичний картонний пакувальник флаконів	1	Автоматична лінія KV-80ZH. Швидкість роботи 20-80 коробок/хв. Габарити (мм): 4000x1579x1620. Країна: Китай. Бренд: Foshan Kingvictor Machinery Co., Ltd. ¹⁷

АГ-26	Автоматична лінії групової упаковки	1	Лінія ROY-15P. Продуктивність апарату: вкладання 30 шт. в 1 коробку за хвилину. Габарити (мм): 6700x1250x2000. Країна: Китай. Бренд: ROYAL ¹⁸
-------	--	---	---

Примітка: 1 - <https://energy-safe.com.ua/element-dlya-zabora-vozduha-pryamougol/>, 2 - <https://teko-ua.com/ua/ugolnyij-filtryi.html>, 3 - <https://epicentrk.ua/ua/shop/kompressor-compass-xy2065a-100.html>, 4 - <https://termoprom.com.ua/uk/teploobmenniki-po-brendu/teploobmenniki-sobstvennogo-proizvodstva/sta-26>, 5 - <https://jablotronlt.com.ua/product/jablotron-f7-filter/>, 6 - <https://tehno-parts.com.ua/hepa-filtr-610610292-h12-fias>, 7 - <https://prom.ua/ua/p370228267-dozator-vody-zhidkosteij.html?&primelead=My42>, 8 - <https://promvit.com.ua/reaktor-2000-l-dlya-prigotovleniya-sgushhennogo-moloka/>, 9 - https://azsmarket.com.ua/ua/p584115504-tsentrobezhnyj-nasos-150.html?source=merchant_center&utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_term=&utm_content=g&google_ad=568663987657&utm_campaign=%D0%A2%D0%BE%D1%80%D0%B3%D0%BE%D0%B2%D0%B0&gad_source=1&gclid=Cj0KCQiAy9msBhD0ARIsANbk0A8JJv5UCXvSanmMgmkPF8PgDJ1iLEgU2CMOfuBm_8PknD9r6PCZ88aApM8EALw_wcB, 10 - <https://ge-ua.net/product/filtr-pishhanij-komertsijnogo-tipu-flantseve-z-yednannya-z-ozonovim-oporom-canada-model/>, 11 - <https://www.dayuwz.com/10001-20001-copper-pot-still-for-rum-whisky-brandy-multifunctional-distillation-equipment.html>, 12 - <https://www.acrossinternational.com/shop-product-by-categories/stainless-glass-reactors/stainless-steel-reactors/stainless-300l.html>, 13 - https://bts.net.ua/pumping-equipment-distillery/chemical-pumps/peristaltichnyj-nasos-mp-808616-364-l-h-0-09-kw/?gad_source=1&gclid=Cj0KCQiAy9msBhD0ARIsANbk0A8nyGBwIRCPSpvEXfJQWQq9VCg98uvj8msnZBePbJRfN0pYXRermNsaAp3OEALw_wcB, 14 - <http://pharm-equipment.com/1-1-ultrasonic-bottle-washing-machine.html>, 15 - <http://www.mwm-kiev.com.ua/about>, 16 - <https://cdafrance.com/en/monoblocks/e-fill-sw-dropper/>, 17 - <https://www.kingvictormachine.com/product/kv-80zh-high-accuracy-automatic-vials-bottle-ampoules-carton-box-packing-sealing-machine-cartoning-machine.html>, 18 - <https://zhjgroyalmachine.en.made-in-china.com/product/XCNEjWscQqhr/China-Automatic-Paper-Carton-Box-Case-Group-Packing-Machine-2X3-3X4-4X6.html>

РОЗДІЛ 10

ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОТРИМАННЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ПРОТИ ОНІХОМІКОЗУ

ДР 1. Підготовка вентиляційного повітря

ДР 1.1. Забір атмосферного повітря

Атмосферне повітря збирається за допомогою повітрозабірника (ПЗ-1) на висоті 10 метрів, де концентрація пилових часток і мікроорганізмів досягає мінімуму.

ДР 1.2. Груба очистка повітря

За допомогою повітрозабірника (ПЗ-1) атмосферне повітря проходить фільтр грубого очищення (Ф-2) і піддається очищенню на рівні 90%.

ДР 1.3. Компресування повітря

Атмосферне повітря піддається стисненню у компресорі (К-3) до тиску приблизно 0,9 МПа. Під час цього процесу температура зростає, і вимагає подальшого охолодження.

ДР 1.4. Контроль температури повітря

Повітря потрапляє до теплообміннику (Т-4), на датчику температури встановлюється значення 22 °С. Після чого, система теплообміннику регулює теплові агенти для контролю позника температури на заданому рівні.

ДР 1.5. Тонке очищення повітря

Повітря проходить крізь фільтр (Ф-5) класу очистки F7 задля досягання ступеня очищення в 95%.

ДР 1.6. Надочищення повітря

Очищене повітря додатково проходить через НЕРА фільтр (Ф-6), тим самим досягаючи ступеня очищення до 99,999%.

ДР 2. Підготовка води очищеної

ДР 2.1. Кип'ятіння води водопровідної

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.03 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Касіч М.О.</i>			<i>РОЗДІЛ 10. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОТРИМАННЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ПРОТИ ОНІХОМІКОЗУ</i>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Перевір.</i>		<i>Резніченко Ю.М.</i>					94	103
<i>Реценз.</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						

За допомогою дозатору (Д-7) до збірника (З-8) подають 1,8 м³ води питної. Після цього, кришку реактору закривають та подають до сорочки воду охолоджену та насичену паром. Встановлюється температурний режим в 100 °С, при цьому тиск становить 0,05 МПа. Тривалість кип'ятіння – 1 година.

ДР 2.2. Фільтрування води кип'яченої

Після того, як воду прокип'ятять, її подають до фільтру (Ф-10) за допомогою відцентрового насосу (Н-9). Вода проходить крізь піщаний фільтр протягом 15 хвилин та потрапляє до збірника (З-11).

ДР 2.3. Додавання реагентів для додаткового очищення води

На технічних вагах зважують 45 г калію перманганату, 900 г алюмінію сульфату, 630 г натрію фосфату двозаміщеного та 900 г гідроксиду кальцію. Всі сухі реагенти вносять до збірника (З-11), вмикається мішалка на 10 хв. Після цього, розчин додатково ще відстоюють 30 хвилин.

ДР 2.4. Фільтрування води після додаткової обробки

Одержану воду подають до фільтру (Ф-13) за допомогою відцентрового насосу (Н-12). Вода знову проходить крізь піщаний фільтр протягом 15 хв та потрапляє до збірника (З-14).

ДР 2.5. Одержання води очищеної шляхом дистиляції

Попередньо очищену воду за допомогою відцентрового насосу (Н-15) подають до дистиляційної установки (Д-16). Встановлюється температура 100 °С. Тривалість дистиляції – 2 години. Після цього, вода очищена подається до збірника (З-17) на зберігання. За допомогою відцентрового насосу (Н-18) вода потрапляє до системи миття флаконів (АМ-22).

ТП 3. Приготування лікарського засобу проти оніхомікозу

На технічних вагах, що важать до 3 кг, зважують 2,4 кг азелаїнової кислоти, 240 г оксиду цинку. За допомогою мірного циліндру на 500 мл відміряють 360 мл екстракту календули та 360 мл екстракту ромашки. Циліндром на 2,5 л відміряють 2,4 л гіцерину. Всі ці компоненти подають до збірника (З-20), після чого вносять 240,219 г кератинази. Після цього, за допомогою дозатора (Д-19) до збірника

доливають воду очищену від ДР 2.5. в об'ємі 234 л. Вмикається мішалка на швидкості 50 об/хв. Тривалість перемішування – 30 хв.

ТП 4. Підготовка флаконів

ТП 4.1. Миття флаконів та дозаторів

До автоматичної лінії миття (АМ-22) приливає вода очищена з ДР 2.5. Після цього, в апарат завантажують спочатку 1201 флакон, а після їх миття - 1201 дозатор. Загальна тривалість миття становить 12 годин.

ТП 4.2. Сушіння флаконів та дозаторів

Конвеєрною лінією з'єднується автоматична лінія миття (АМ-22) та сушильний тунель (С-23). До тунелю підводять повітря від ДР 1.6., де воно нагрівається у модулі С-23 до температури 70 °С. Окремо в тунелі сушать флакони та дозатори, щоб відокремити їх для полегшення наступної операції. Тривалість сушіння 6 годин.

ТП 5. Наповнення, загвинчування, та маркування флаконів

До автоматичної лінії (АН-24) подають миті, висушені флакони. Дозатори переносять в окремий бункер для дозаторів, що передбачено конструкторською промисловою лінією. Шприцем вони заповнюються лікарським засобом від ТП 3. Готову лікарську рідину подають до АН-23 за допомогою перистальтичного насоса Н-21. Після наповнення, флакони загвинчують митими та сухими дозаторами. Після цього, по лінії на флакони автоматом наліплюються етикетки з назвою препарату, кількістю та назвою діючої речовини, номером партії, датою виготовлення та терміном придатності. На цьому етапі вилучається декілька коробок для контролю якості препарату за АНД. Тривалість процесу становить 8 годин. Після цього, партію відправляють на пакування.

ПМФ 6. Фасування готових промаркованих флаконів в коробки

Конвеєром готові флакони подаються до автоматичної лінії упакування флаконів в коробку (АК-25). На один флакон припадає 1 коробка. Тривалість упакування становить 1 годину. Має бути 1201 коробка.

ПМФ 7. Упакування готових лікарських препаратів в групову тару

Конвеєром коробки передаються до автоматичної лінії групового пакування (АГ-26). До автомату подаються складені картонні коробки, яка машина самостійно складає. В одну коробку вкладається 100 флаконів. Кількість групових коробок має становити 12 шт. Коробки відправляються на зберігання до складу при температурі не вище 25 °С.

РОЗДІЛ 11

ОПИС ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ НА ОСНОВІ КЕРАТИНАЗИ ПРОТИ ОНІХОМІКОЗУ ЗГІДНО АНД

Ця аналітично нормативна документація поширюється на лікарський засіб на основі кератинази, який являє собою краплі для зовнішнього застосування.

Склад: 1 флакон містить 200 мг кератинази, азелаїнову кислоту, цинк оксид, гліцерин, екстракт календули, екстракт ромашки.

Призначення. Лікування оніхомікозу.

Форма випуску. Флакон з піпеткою-крапельницею.

Специфікація на лікарський засіб наведена в табл. 11.1

МЕТОДИ КОНТРОЛЮ

1. Опис. Визначають візуально.

Розчин з відсутнім забарвленням, без сторонніх включень та осаду

2. Прозорість. Візуальне визначення.

Має бути прозорим

3. рН

Вимірювання проводять методом потенціометрії за допомогою рН-метра (див. рис.11.1.) Для цього перед початком вимірювання основного розчину проводять калібрування з буферними стандартами за лінійкою рН що складають 4,01; 7,01; 10,01. Після калібрування проводять вимірювання вмісту флакону. рН розчину кератинази має бути в межах 6,5 – 7,5 одиниць.



Рис.11.1. рН-метр [162]

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.03 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Касіч М.О.</i>			<i>РОЗДІЛ 11. ОПИС ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ НА ОСНОВІ КЕРАТИНАЗИ ПРОТИ ОНІХОМІКОЗУ ЗГІДНО АНД</i>	<i>Лім.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Перевір.</i>		<i>Резніченко Ю.М.</i>					98	103
<i>Реценз.</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						

СПЕЦИФІКАЦІЯ

Найменування показників контролю	Допустимі межі	Методи контролю
1	2	3
Опис	Розчин з відсутнім забарвленням, без сторонніх включень та осаду	За п. 1 АНД, візуально
Прозорість	Має бути прозорим	За п. 2 АНД, візуально
pH	Від 6,5 до 7,5	За п. 3 АНД, ДФУ/ЄФ, 2.2.3
Об'єм розчину, що витягається	Не менше номінального - 200 мл	За п. 4 АНД
Активність кератинази	1539,09 U/мг	За п. 5 АНД
Стерильність	Розчин має бути стерильним	За п. 6 АНД, ДФУ/ЄФ 2.6.1
Механічні включення	Видимі частинки: Повинні бути практично відсутніми (менше 2 частинок з 20 досліджених контейнерів). Невидимі частинки: Середня кількість частинок не перевищує 25 в 1 мл для частинок розміром 10 мкм або більше і не перевищує 3 в 1 мл для частинок 25 мкм або більше.	За п. 7 АНД, ДФУ/ЄФ 2.9.19, 2.9.20

4. Об'єм розчину, що витягається

Визначення проводять за допомогою скляного циліндру відповідної точності. Результат випробувань має бути не менше номінального - 200 мл.

5. Активність кератинази.

Вміст 1 флакону переносять до хімічної склянки на 500 мл. До нього доливають 100 мл 100 мМ Tris-HCl буферу та 300 мл розчину азоказеїну в концентрації 10 мг/мл. Після інкубації (40°C, 30 хв) реакцію зупиняють додаванням 600 мл 10% трихлороцтової кислоти (ТСА). Потім цю суміш центрифугують (10000 g протягом 10 хв). Супернатант (800 мл) змішують з 1,8 М NaOH (200 мл) і визначають абсорбцію при 420 нм вимірювали спектрофотометром. Одну одиницю (U) активності протеази визначали як кількість ферменту, яка викликала збільшення на 0,1 одиниці поглинання у визначених умовах аналізу. Питома активність (Од/мг) виражається як співвідношення між протеолітичною активністю (Од/мл) і вмістом розчинного білка (мг/мл) [139].

Для визначення можна використати спектрофотометр LabAnalyt SP-UV1000. Довжина хвиль вимірювання даного апарату коливається від 200 до 1000 нм. Фотометричний діапазон -0,3-3,0 А. Точність вимірювання $\pm 0,02$ нм [140].

Активність кератинази має становити 1539,09 U/мг [8].

6. Стерильність

Випробування проводять відповідно до вимог ДФУ/ЄФ, 2.6.1.

Випробуваний розчин переносять на мембранний фільтр. Відразу фільтрують. Після фільтрування мембранний фільтр відмивають стерильним розчинником не менше трьох разів, об'ємом не більше 100 мл на одну порцію. Після відмивання мембранний фільтр переносять у живильне середовище. Один фільтр вносять у рідке тіогріколеве середовище, для аналізу росту анаеробних бактерій та другий фільтр на соєво-казеїнове середовище призначене для вирощування грибів та аеробних бактерій. Посіви інкубують не менше 14 діб.

Препарат повинен бути стерильним.

7. Механічні включення

Видимі частинки (ДФУ/ЄФ, 2.9.20). Мають бути практично відсутні.

Вміст контейнерів переливають в прозорі флакони для дослідження та закривають щільною пробкою. В кімнаті з умовами досягнення темряви, візуально переглядають флакони перед білим екраном пристрою спочатку, та після – перед чорним екраном. При перегляді флакони плавно перевертають, для уникнення утворення повітряних кульок.

Видимі частинки повинні бути практично відсутніми (менше 2 частинок з 20 досліджених контейнерів).

Невидимі частинки (ДФУ/ЄФ, 2.9.19).

В мірну ємність переносять розчин з 10 контейнерів та доводять об'єм до позначки - 200 мл водою попередньо очищеною від частинок, Р.

Проводять відстоювання зразка, та відкривають ємність з подальшим відбором проб.

Контроль здійснюється за за методом світлоблокування, на приладі, що дозволяє автоматично вимірювати кількість та розмір частинок, та автоматичною обробкою та видачею результатів випробування у вигляді – кількість частинок в 1 мл.

Препарат проходить випробування, якщо середня кількість частинок у випробовуваних одиницях не перевищує 25 в 1 мл для частинок розміром 10 мкм або більше і не перевищує 3 в 1 мл для частинок розміром 25 мкм або більше.

Пакування.

По 1 флаконі (білого кольору зі скла) з піпеткою-крапельницею та інструкцією у пачці з картону.

Маркування.

На пачці має бути зазначене торгове найменування, загальна інформація, склад, спосіб застосування, умови зберігання, спосіб застосування, штрих-код, виробник, термін придатності, номер серії виробництва.

Транспортування.

При температурі від 5°C до 25 °C у відповідному транспорті.

Зберігання.

Зберігати у сухому та недоступному для дітей місці при температурі не від +5 °С до +25 °С, та відносній вологості не більше 75 %.

Термін придатності.

До відкриття термін придатності – 36 місяців.

Після відкриття термін придатності – 6 місяців

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Reshma C. V. Microbial enzymes: therapeutic applications. *Microbiol. Res. J. Int.* 2019, 27(2): 1-8. <https://doi.org/10.9734/MRJI/2019/v27i230093>
2. Nnolim N. E., Udenigwe C. C., Okoh A. I., Nwodo U. U. Microbial keratinase: Next generation green catalyst and prospective applications. *Frontiers in Microbiology.* 2020, 11: 580164. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.580164>
3. Vidmar B., Vodovnik M. Microbial keratinases: enzymes with promising biotechnological applications. *Food technology and biotechnology.* 2018, 56(3): 312-328. <https://doi.org/10.17113%2Fftb.56.03.18.5658>
4. Srinidhi K. R., Subrahmanyam V. M., Alex A. T., Mathew A. J., Kamath B. V. Role of Nano-formulation in the treatment of Onychomycosis. *Research Journal of Pharmacy and Technology.* 2020, 13(1): 453-455.
5. Оніхомікоз: причини, симптоми, діагностика та лікування. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://oxford-med.com.ua/ua/media-center/publikacii/onikhomikoz_prichiny_simptomy_diagnostika_i_lechenie/
6. 3 «НІ» перед дослідженням на оніхомікоз. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://imdlab.com.ua/3_no
7. Leung A. K., Lam J. M., Leong K. F., Hon K. L., Barankin B., Leung A. A., Wong A. H. Onychomycosis: an updated review. *Recent patents on inflammation & allergy drug discovery.* 2020, 14(1): 32-45. <https://doi.org/10.2174%2F1872213X13666191026090713>
8. Nnolim N. E., Nwodo U. U. *Bacillus* sp. CSK2 produced thermostable alkaline keratinase using agro-wastes: keratinolytic enzyme characterization. *BMC biotechnology.* 2013, 20(1): 1-14. <https://doi.org/10.1186/s12896-020-00659-2>
9. Ravindran R., Hassan S. S., Williams G. A., Jaiswal A. K. A review on bioconversion of agro-industrial wastes to industrially important enzymes. *Bioengineering.* 2018, 5(4): 93. <https://doi.org/10.3390/bioengineering5040093>
10. Danilova I., Sharipova M. The practical potential of bacilli and their enzymes for industrial production. *Frontiers in microbiology.* 2020, 11: 1782. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01782>

11. Hassan M. A., Haroun B. M., Amara A. A., Serour E. A. Production and characterization of keratinolytic protease from new wool-degrading *Bacillus* species isolated from Egyptian ecosystem. *BioMed research international*. 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/175012>
12. Miljaković D., Marinković J., Balešević-Tubić S. The significance of *Bacillus* spp. in disease suppression and growth promotion of field and vegetable crops. *Microorganisms*. 2020, 8(7): 1037. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8071037>
13. Kumar P., Patel S. K., Lee J. K., Kalia V. C. Extending the limits of *Bacillus* for novel biotechnological applications. *Biotechnology advances*. 2013, 31(8): 1543-1561. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.08.007>
14. Latorre J. D., Hernandez-Velasco X., Wolfenden R. E., Vicente J. L., Wolfenden A. D., Menconi A., et al. Evaluation and selection of *Bacillus* species based on enzyme production, antimicrobial activity, and biofilm synthesis as direct-fed microbial candidates for poultry. *Frontiers in Veterinary Science*. 2016, 3: 95. <https://doi.org/10.3389/fvets.2016.00095>
15. Contesini F. J., Melo R. R. D., Sato H. H. An overview of *Bacillus* proteases: from production to application. *Critical reviews in biotechnology*. 2018, 38(3): 321-334. <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1354354>
16. Liu B., Zhang J., Li B., Liao X., Du G., Chen J. Expression and characterization of extreme alkaline, oxidation-resistant keratinase from *Bacillus licheniformis* in recombinant *Bacillus subtilis* WB600 expression system and its application in wool fiber processing. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2013, 29: 825-832. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1237-5>
17. Liu L., Liu Y., Shin H. D., Chen R. R., Wang N. S., Li J., et al. Developing *Bacillus* spp. as a cell factory for production of microbial enzymes and industrially important biochemicals in the context of systems and synthetic biology. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2013, 97: 6113-6127. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4960-4>
18. Pant G., Prakash A., Pavani J. V. P., Bera S., Deviram G. V. N. S., Kumar A., et al. Production, optimization and partial purification of protease from *Bacillus*

- subtilis*. *Journal of Taibah University for Science*. 2015, 9(1): 50-55.
<https://doi.org/10.1016/j.jtusci.2014.04.010>
19. Hammami A., Fakhfakh N., Abdelhedi O., Nasri M., Bayoudh A. Proteolytic and amyolytic enzymes from a newly isolated *Bacillus mojavensis* SA: characterization and applications as laundry detergent additive and in leather processing. *International journal of biological macromolecules*. 2018, 108: 56-68.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.148>
20. Pawar S. V., Rathod V. K. Ultrasound assisted process intensification of uricase and alkaline protease enzyme co-production in *Bacillus licheniformis*. *Ultrasonics sonochemistry*. 2018, 45: 173-179. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.03.004>
21. Pham V. H. T., Kim J., Shim J., Chang S., Chung W. Purification and Characterization of Strong Simultaneous Enzyme Production of Protease and α -Amylase from an Extremophile-*Bacillus* sp. FW2 and Its Possibility in Food Waste Degradation. *Fermentation*. 2021, 8(1): 12. <https://doi.org/10.3390/fermentation8010012>
22. Suganthi C., Mageswari A., Karthikeyan S., Anbalagan M., Sivakumar A., Gothandam K. M. Screening and optimization of protease production from a halotolerant *Bacillus licheniformis* isolated from saltern sediments. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 2013, 11(1): 47-52. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2013.02.002>
23. Ali N., Ullah N., Qasim M., Rahman H., Khan S. N., Sadiq A., Adnan M. Molecular characterization and growth optimization of halo-tolerant protease producing *Bacillus subtilis* Strain BLK-1.5 isolated from salt mines of Karak, Pakistan. *Extremophiles*. 2016, 20: 395-402. <https://doi.org/10.1007/s00792-016-0830-1>
24. Lakshmi B. K. M., Kumar D. M., Hemalatha K. P. J. Purification and characterization of alkaline protease with novel properties from *Bacillus cereus* strain S8. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 2018, 16(2): 295-304.
<https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.05.009>
25. Anbu P. Characterization of solvent stable extracellular protease from *Bacillus koreensis* (BK-P21A). *International Journal of Biological Macromolecules*. 2013, 56: 162-168. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.02.014>

26. Parrado J., Rodriguez-Morgado B., Tejada M., Hernandez T., Garcia C. Proteomic analysis of enzyme production by *Bacillus licheniformis* using different feather wastes as the sole fermentation media. *Enzyme and Microbial Technology*. 2014, 57: 1-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2014.01.001>
27. Aruna K., Shah J., Birmole R. Production and partial characterization of alkaline protease from *Bacillus tequilensis* strains CSGAB0139 isolated from spoilt cottage cheese. *Int J Appl Biol Pharm*. 2014, 5: 201-221.
28. Asker M. M., Mahmoud M. G., El Shebwy K., Abd el Aziz M. S. Purification and characterization of two thermostable protease fractions from *Bacillus megaterium*. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 2013, 11(2): 103-109. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2013.08.001>
29. Baweja M., Tiwari R., Singh P. K., Nain L., Shukla P. An alkaline protease from *Bacillus pumilus* MP 27: functional analysis of its binding model toward its applications as detergent additive. *Frontiers in microbiology*. 2016, 7: 1195. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01195>
30. Rekik H., Jaouadi N. Z., Gargouri F., Bejar W., Frikha F., Jmal N., et al. Production, purification and biochemical characterization of a novel detergent-stable serine alkaline protease from *Bacillus safensis* strain RH12. *International journal of biological macromolecules*. 2019, 121: 1227-1239. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.139>
31. Suberu Y., Akande I., Samuel T., Lawal A., Olaniran A. Optimization of protease production in indigenous *Bacillus* species isolated from soil samples in Lagos, Nigeria using response surface methodology. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*. 2019, 18: 101011. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.01.049>
32. Zhou C., Zhou H., Li D., Zhang H., Wang H., Lu F. Optimized expression and enhanced production of alkaline protease by genetically modified *Bacillus licheniformis* 2709. *Microbial cell factories*. 2020, 19: 1-13. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01307-2>

33. Zhou C., Zhou H., Zhang H., Lu F. Optimization of alkaline protease production by rational deletion of sporulation related genes in *Bacillus licheniformis*. *Microbial cell factories*. 2019, 18(1): 1-12. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1174-1>
34. Jadhav H. P., Sonawane M. S., Khairnar M. H., Sayyed R. Z. Production of alkaline protease by rhizospheric *Bacillus cereus* HP_RZ17 and *Paenibacillus xylanilyticus* HP_RZ19. *Environmental Sustainability*. 2020, 3(1): 5-13. <https://doi.org/10.1007/s42398-020-00096-z>
35. Karray A., Alonazi M., Horchani H., Ben Bacha A. A novel thermostable and alkaline protease produced from *Bacillus stearothermophilus* isolated from olive oil mill sols suitable to industrial biotechnology. *Molecules*. 2021, 26(4): 1139. <https://doi.org/10.3390/molecules26041139>
36. Kalwasińska A., Jankiewicz U., Felföldi T., Burkowska-But A., Brzezinska M. S. Alkaline and halophilic protease production by *Bacillus luteus* H11 and its potential industrial applications. *Food Technology and Biotechnology*. 2018, 56(4): 553. <https://doi.org/10.17113%2Fftb.56.04.18.5553>
37. Nathan V. K. Application of extremozymes in the paper and pulp industries. In *Extremozymes and their Industrial Applications*. Academic Press. 2022. P. 231-247). <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90274-8.00015-0>
38. Abdel-Fattah A. M., El-Gamal M. S., Ismail S. A., Emran M. A., Hashem A. M. Biodegradation of feather waste by keratinase produced from newly isolated *Bacillus licheniformis* ALW1. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 2018, 16(2): 311-318. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.05.005>
39. Bhangre K., Chaturvedi V., Bhatt R. Simultaneous production of detergent stable keratinolytic protease, amylase and biosurfactant by *Bacillus subtilis* PF1 using agro industrial waste. *Biotechnology reports*. 2016, 10: 94-104. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2016.03.007>
40. Sanghvi G., Patel H., Vaishnav D., Oza T., Dave G., Kunjadia P., Sheth N. A novel alkaline keratinase from *Bacillus subtilis* DP1 with potential utility in cosmetic formulation. *International journal of biological macromolecules*. 2016, 87: 256-262. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.02.067>

41. Shafique T., Shafique J., Zahid S., Kazi M., Alnemer O., Ahmad A. Screening, selection and development of *Bacillus subtilis* apr-IBL04 for hyper production of macromolecule alkaline protease. *Saudi journal of biological sciences*. 2021, 28(2): 1494-1501. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.11.079>
42. Salim A. A., Grbavčić S., Šekuljica N., Stefanović A., Tanasković S. J., Luković N., Knežević-Jugović Z. Production of enzymes by a newly isolated *Bacillus* sp. TMF-1 in solid state fermentation on agricultural by-products: the evaluation of substrate pretreatment methods. *Bioresource technology*. 2017, 228: 193-200. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.12.081>
43. Singh S., Bajaj B. K. Bioprocess optimization for production of thermoalkali-stable protease from *Bacillus subtilis* K-1 under solid-state fermentation. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*. 2016, 46(7): 717-724. <http://dx.doi.org/10.1080/10826068.2015.1135455>
44. Karataş H., Uyar F., Tolan V., Baysal Z. Optimization and enhanced production of α -amylase and protease by a newly isolated *Bacillus licheniformis* ZB-05 under solid-state fermentation. *Annals of Microbiology*. 2013, 63: 45-52. <https://doi.org/10.1007/s13213-012-0443-6>
45. Saggi S. K., Mishra P. C. Characterization of thermostable alkaline proteases from *Bacillus infantis* SKS1 isolated from garden soil. *PloS one*. 2017, 12(11): e0188724. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188724>
46. Kieliszek M., Pobiega K., Piwowarek K., Kot A. M. Characteristics of the proteolytic enzymes produced by lactic acid bacteria. *Molecules*. 2021, 26(7): 1858. <https://doi.org/10.3390/molecules26071858>
47. Belguesmia Y., Bendjeddou K., Kempf I., Boukherroub R., Drider D. Heterologous biosynthesis of five new class II bacteriocins from *Lactobacillus paracasei* CNCM I-5369 with antagonistic activity against pathogenic *Escherichia coli* strains. *Frontiers in Microbiology*. 2020, 11: 1198. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01198>
48. Sun F., Hu Y., Yin X., Kong B., Qin L. Production, purification and biochemical characterization of the microbial protease produced by *Lactobacillus*

fermentum R6 isolated from Harbin dry sausages. *Process Biochemistry*. 2020, 89: 37-45. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.10.029>

49. Kempka A. P., Artifon S. E. S., Sumny E. H., Fabris T., de Jesus B. A. P., Magalhães M. D. L. B., et al. Biosynthesis of the Acid Protease Produced by *Lactocaseibacillus Casei* Lbc 237 and *Limosilactobacillus Fermentum* Lbf 433 and Their Potential Application in the Bovine Milk Clotting. Available at SSRN 4385193. 2023. <https://dx.doi.org/10.2139/ssrn.4385193>

50. Karthikeyan G., Palanisamy A., Madheshwar R. V., Sudhakar N. Milk clotting and proteolytic activity of protease enzyme from *Lactobacillus delbrueckii* isolated from raw goat milk. *Aust J Pharm Biol*. 2018, 1(1): 15-26.

51. Kurniati N., Mubarik N. R. Optimization of production of protease by *Lactobacillus plantarum* SK (5) from bekasam with response surface methodology. *Pakistan Journal of Biotechnology*. 2014, 12(2): 123-130.

52. Dallagnol A. M., Pescuma M., De Valdez G. F., Rollán G. Fermentation of quinoa and wheat slurries by *Lactobacillus plantarum* CRL 778: proteolytic activity. *Applied microbiology and biotechnology*. 2013, 97: 3129-3140. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4520-3>

53. Blieva R. K., Mustafin K. G., Akhmetsadykov N. N., Suleimenova Z., Saduyeva Z., Zhakipbekova A., et al. Optimization of culture medium for enhanced protease biosynthesis in *Streptomyces globisporus*. *Rasayan Journal of Chemistry*. 2021, 14(1): 270-275. <http://dx.doi.org/10.31788/>

54. Al-Dhabi N. A., Esmail G. A., Ghilan A. K. M., Arasu M. V., Duraipandiyan V., Ponmurugan K. Characterization and fermentation optimization of novel thermo stable alkaline protease from *Streptomyces* sp. Al-Dhabi-82 from the Saudi Arabian environment for eco-friendly and industrial applications. *Journal of King Saud University-Science*. 2020, 32(1): 1258-1264. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2019.11.011>

55. Nayera A.M., Danial E. N., Noura E. E., Asem A. M. Optimization of alkaline protease production by *Streptomyces ambofaciens* in free and immobilized form. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*. 2014, 10(1): 1-13.

doi:10.3844/ajbbbsp.2014.1.13

56. Boulkour T. S., Zaraï Jaouadi N., Boudjella H., Ferradji F. Z., Belhoul M., Rekik H., et al. Purification and biochemical characterization of two detergent-stable serine alkaline proteases from *Streptomyces* sp. strain AH4. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2015, 31: 1079-1092. <https://doi.org/10.1007/s11274-015-1858-6>
57. Renganath R. R., Vimudha M., Kamini N. R., Gowthaman M. K., Chandrasekran B., Saravanan P. Alkaline protease production from *Brevibacterium luteolum* (MTCC 5982) under solid-state fermentation and its application for sulfide-free unhairing of cowhides. *Applied biochemistry and biotechnology*. 2017, 182: 511-528. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2341-z>
58. Darwesh O. M., El-Hawary A. S., El Kelany U. S., El-Sherbiny G. M. Nematicidal activity of thermostable alkaline protease produced by *Saccharomonospora viridis* strain Hw G550. *Biotechnology Reports*. 2019, 24: e00386. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00386>
59. Sharma A. K., Singh S. P. Effect of amino acids on the repression of alkaline protease synthesis in haloalkaliphilic *Nocardiopsis dassonvillei*. *Biotechnology Reports*. 2016, 12: 40-51. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2016.10.004>
60. Gnanadoss J. J., Devi S. K. Optimization of nutritional and culture conditions for improved protease production by *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus flavus*. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. 2021: 518-523. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2015.4.6.518-523>
61. Karthic J., Siddalingeshwara K. G., SunilDutt P. L. N. S. N., Pramod T., Vishwanatha T. An approach isolation, screening and production of protease from *Aspergillus oryzae*. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*. 2014, 4(2): 86-89. <http://dx.doi.org/10.22270/jddt.v4i2.816>
62. Pilli R., Siddalingeshwara K. G. Effect of fermentation kinetics for the biosynthesis of protease from *Aspergillus awamori*. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*. 2016, 6(3): 115-118. <https://doi.org/10.22270/jddt.v6i3.1281>
63. Zhao G., Ding L. L., Pan Z. H., Kong D. H., Hadiatullah H., Fan Z. C. Proteinase and glycoside hydrolase production is enhanced in solid-state fermentation by

manipulating the carbon and nitrogen fluxes in *Aspergillus oryzae*. *Food chemistry*. 2019, 271: 606-613. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.199>

64. Chimbekujwo K. I., Ja'afaru M. I., Adeyemo O. M. Purification, characterization and optimization conditions of protease produced by *Aspergillus brasiliensis* strain BCW2. *Scientific African*. 2020, 8: e00398. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2020.e00398>

65. Salihi A., Asoodeh A., Aliabadian M. Production and biochemical characterization of an alkaline protease from *Aspergillus oryzae* CH93. *International journal of biological macromolecules*. 2017, 94: 827-835. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.06.023>

66. Polley T., Ghosh U. Isolation and identification of potent alkaline protease producing microorganism and optimization of biosynthesis of the enzyme using RSM. *Indian Chemical Engineer*. 2018, 60(3): 285-296. <https://doi.org/10.1080/00194506.2017.1376600>

67. Jia B., Jeon C. O. High-throughput recombinant protein expression in *Escherichia coli*: current status and future perspectives. *Open biology*. 2016, 6(8): 160196. <https://doi.org/10.1098/rsob.160196>

68. Joshi S., Satyanarayana T. Characteristics and applications of a recombinant alkaline serine protease from a novel bacterium *Bacillus lehensis*. *Bioresource technology*. 2013, 131: 76-85. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.124>

69. Bhatt H. B., Singh S. P. Cloning, expression, and structural elucidation of a biotechnologically potential alkaline serine protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus lehensis* JO-26. *Frontiers in microbiology*. 2020, 11: 941. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00941>

70. Zhao C., Ju J. Cloning, expression and activity analysis of a novel fibrinolytic serine protease from *Arenicola cristata*. *Journal of Ocean University of China*. 2015, 14: 533-540. <https://doi.org/10.1007/s11802-015-2488-1>

71. Li B., Habermann D., Kliche T., Klempt M., Wutkowski A., Clawin-Rädecker I., et al. Soluble *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 92059 PrtB proteinase derivatives for production of bioactive peptide hydrolysates from casein.

- Applied microbiology and biotechnology.* 2019, 103: 2731-2743.
<https://doi.org/10.1007/s00253-018-09586-x>
72. Deng J. J., Huang W. Q., Li Z. W., Lu D. L., Zhang Y., Luo X. C. Biocontrol activity of recombinant aspartic protease from *Trichoderma harzianum* against pathogenic fungi. *Enzyme and microbial technology.* 2018, 112: 35-42.
<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2018.02.002>
73. Banani H., Spadaro D., Zhang D., Matic S., Garibaldi A., Gullino M. L. Biocontrol activity of an alkaline serine protease from *Aureobasidium pullulans* expressed in *Pichia pastoris* against four postharvest pathogens on apple. *International Journal of Food Microbiology.* 2014, 182: 1-8.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.05.001>
74. Pratiwi R. D., Yuliawati Y., Fitriagustiani F., Aminah A., Hariyatun H., Utami N., et al. Extracellular Expression of Recombinant Kex2 Protease in *Pichia pastoris* BG10. *Biointerface Research in Applied Chemistry.* 2022, 13(4): 1-10.
<https://doi.org/10.33263/BRIAC134.360>
75. Sun Q., Chen F., Geng F., Luo Y., Gong S., Jiang Z. A novel aspartic protease from *Rhizomucor miehei* expressed in *Pichia pastoris* and its application on meat tenderization and preparation of turtle peptides. *Food chemistry.* 2018, 245: 570-577. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.113>
76. Gupta P. V., Nirwane A. M., Belubbi T., Nagarsenker M. S. Pulmonary delivery of synergistic combination of fluoroquinolone antibiotic complemented with proteolytic enzyme: A novel antimicrobial and antibiofilm strategy. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine.* 2017, 13(7): 2371-2384.
<https://doi.org/10.1016/j.nano.2017.06.011>
77. De Gobba C., Tompa G., Otte J. Bioactive peptides from caseins released by cold active proteolytic enzymes from *Arsukibacterium ikkense*. *Food chemistry.* 2014, 165: 205-215. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.082>
78. Salinas Ibañez A. G., Vallés D., Adaro M., Barberis S., Vega A. E. Antimicrobial effect of a proteolytic enzyme from the fruits of *Solanum granuloso-*

leprosum (Dunal) against *Helicobacter pylori*. *Frontiers in Nutrition*. 2021: 1060.
<https://doi.org/10.3389/fnut.2021.699955>

79. Uzair M. S., Mushtaq M., Shah M., Ullah H. A., Sadique U., Khan H., et al. Enhanced Neomycin antibiotic properties through proteolytic enzyme in *Escherichia coli* induced infection in broiler chicks. *Research Article*. 2022.
<https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1928276/v1>

80. Lilianny D., Widyarman A. S., Erfan E., Sudiono J., Djamil M. S. Enzymatic activity of bromelain isolated pineapple (*Ananas comosus*) hump and its antibacterial effect on *Enterococcus faecalis*. *Scientific Dental Journal*. 2018, 2(2): 39-50.
<http://dx.doi.org/10.26912/sdj.v2i1.2540>

81. Eshamah H., Han I., Naas H., Rieck J., Dawson P. Bactericidal effects of natural tenderizing enzymes on *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*. *Journal of food research*. 2013, 2(1): 8. <https://doi.org/10.5539/jfr.v2n1p8>

82. Culp E., Wright G. D. Bacterial proteases, untapped antimicrobial drug targets. *The Journal of antibiotics*. 2017, 70(4): 366-377.
<https://doi.org/10.1038/ja.2016.138>

83. Verma S., Dixit R., Pandey K. C. Cysteine proteases: modes of activation and future prospects as pharmacological targets. *Frontiers in pharmacology*. 2016, 7: 107.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00107>

84. do Nascimento-Júnior E. M., Reinheimer D. M. Efficacy of proteolytic enzyme bromelain on health outcomes after third molar surgery. Systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal*. 2019, 24(1): e61. <https://doi.org/10.4317%2Fmedoral.22731>

85. Purchase D. Microbial keratinases: Characteristics, biotechnological applications and potential. *The handbook of microbial bioresources*. Wallingford: CAB International Publishing. 2016. P. 634-74.
<http://dx.doi.org/10.1079/9781780645216.0634>

86. Thapa S., Li H., OHair J., Bhatti S., Chen F. C., Nasr K. A., et al. Biochemical characteristics of microbial enzymes and their significance from industrial

- perspectives. *Molecular biotechnology*. 2019, 61: 579-601.
<https://doi.org/10.1007/s12033-019-00187-1>
87. Theron L. W., Divol B. Microbial aspartic proteases: current and potential applications in industry. *Applied microbiology and biotechnology*. 2014, 98: 8853-8868.
<https://doi.org/10.1007/s00253-014-6035-6>
88. Kawecki M., Łabuś W., Klama-Baryla A., Kitala D., Kraut M., Glik J., et al. A review of decellurization methods caused by an urgent need for quality control of cell-free extracellular matrix'scaffolds and their role in regenerative medicine. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2018, 106(2): 909-923.
<https://doi.org/10.1002/jbm.b.33865>
89. Matsuzaki K., Kumagai N. Treatment of vitiligo with autologous cultured keratinocytes in 27 cases. *European Journal of Plastic Surgery*. 2013, 36: 651-656.
<https://doi.org/10.1007/s00238-013-0875-7>
90. Thakur P., Kumar V. Serine Proteinase industrial applications: a review. *J. Inf. Comput. Sci*. 2018, 5(7): 316-328.
91. Chalamaiah M., Yu W., Wu J. Immunomodulatory and anticancer protein hydrolysates (peptides) from food proteins: A review. *Food chemistry*. 2018, 245: 205-222. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.087>
92. Fujimura M. Effects of an enzyme agent containing mutanase and dextranase for treatment of biofilms in bacteria-and yeast-infected canine otitis externa. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. 2022, 25(3): 383-389.
<https://doi.org/10.24425/pjvs.2022.142021>
93. Yahaya R. S. R., Normi Y. M., Phang L. Y., Ahmad S. A., Abdullah J. O., Sabri S. Molecular strategies to increase keratinase production in heterologous expression systems for industrial applications. *Applied microbiology and biotechnology*. 2021, 105: 3955-3969. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11321-y>
94. Silva-López R. E., Gonçalves R. N. Therapeutic proteases from plants: biopharmaceuticals with multiple applications. *J Appl Biotechnol Bioeng*. 2019, 6(2): 101-109. <https://doi.org/10.15406/jabb.2019.06.00180>

95. Singh R., Kumar M., Mittal A., Mehta P. K. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *3 Biotech.* 2016, 6: 1-15. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0485-8>
96. Nnolim N. E., Nwodo U. U. Microbial keratinase and the bio-economy: a three-decade meta-analysis of research exploit. *AMB Express.* 2021, 11: 1-16. <https://doi.org/10.1186/s13568-020-01155-8>
97. Hassan M. A., Abol-Fotouh D., Omer A. M., Tamer T. M., Abbas E. Comprehensive insights into microbial keratinases and their implication in various biotechnological and industrial sectors: A review. *International journal of biological macromolecules.* 2020, 154: 567-583. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.116>
98. Avdiyuk K. V., Varbanets L. D. Keratinolytic enzymes: producers, physical and chemical properties. Application for biotechnology. *Biotechnologia Acta.* 2019, 12(2): 27-45. <https://doi.org/10.15407/biotech12.02.027>
99. Лікування грибка нігтів лазером. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://medcity.ua/ua/services/lechenie-gribka-nogtey-lazerom/>
100. Global Keratinase Sales Market by Type (Food Grade, Industrial Grade), By Application (Feed, Cosmetics, Medicine, Other) And By Region (North America, Latin America, Europe, Asia Pacific and Middle East & Africa), Forecast From 2022 To 2030. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://dataintelo.com/report/global-keratinase-sales-market/>
101. Трофазол краплі 10мл. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://fitosana.com.ua/trofazol>
102. НаноДермікс NanoDermix протигрибковий розчин для нігтів, 10 мл. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://tabletki.ua/uk/NanoDermix/1025073/#productCardFeatures>
103. АнтиГрибок краплі для нігтів по 15 мл у флак.-кап.. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://tabletki.ua/uk/%D0%90%D0%BD%D1%82%D0%B8%D0%93%D1%80%D0%B8%D0%B1%D0%BE%D0%BA/1025109/>

104. Екзодерил розчин н/ш 1 % по 10 мл у флак. [Електронний ресурс].
Режим доступу:

<https://tabletki.ua/uk/%D0%AD%D0%BA%D0%B7%D0%BE%D0%B4%D0%B5%D1%80%D0%B8%D0%BB/4691/#productCardFeatures>

105. Екзїк розчин н/ш по 1 % по 20 мл у флак.. [Електронний ресурс]. Режим доступу:

<https://tabletki.ua/uk/%D0%AD%D0%BA%D0%B7%D0%B8%D0%BA/37531/>

106. Catalase Powder 100000u/g CAS 9001-05-2 Pure Enzyme Catalase Powder. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://enzymes.bio/product/catalase-powder-100000u-g-cas-9001-05-2-pure-enzyme-catalase-powder/?gclid=CjwKCAjw04yjBhApEiwAJcvNocmVT_8aS700f2NiqX_b7qK8YkTZB5wb9gomaWyUYg_Hq6jN1isWhxoCTCAQAvD_BwE

107. Кератиназа (Keratinase). [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://market.enzim.biz/fermenti/keratinaza>

108. Keratinase Enzymes. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.indiamart.com/proddetail/keratinase-enzymes-2850491610148.html>

109. High quality keratinase enzyme powder food grade Keratinase. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.alibaba.com/product-detail/High-quality-keratinase-enzyme-powder-food_1600648792039.html?spm=a2700.pc_countrysearch.main07.37.5a0c16b0hj5qGV

110. Онїхомїкоз: особливостї, симптоми, лікування і профїлактика хвороби. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://zdravica.ua/diseases/dermatology/onychomycosis>

111. Що таке онїхомїкоз. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://virtus.ua/blog/lechenie-gribka-nogtej-onihomikoz>

112. Засоби від грибка нїгтів. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://liki24.com/uk/category/8000796/>

113. МАЗІ. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/1300/mazi>

114. РОЗЧИНИ. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/1141/rozchini>
115. Протигрибкові препарати для нігтів. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://1sa.com.ua/protivogribkovye-preparaty-dlja-nogtej/>
116. Флакони косметичні з піпеткою білою Ascorp скляний 10мл матовий набір 5шт (2203). [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://rozetka.com.ua/ua/111979682/p111979682/>
117. Kothari D., Rani A., Goyal A. Keratinases. In Current Developments in Biotechnology and Bioengineering. 2017 (pp. 447-469). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63662-1.00019-1>
118. Rahayu S., Syah D., Suhartono M. T. Degradation of keratin by keratinase and disulfide reductase from *Bacillus* sp. MTS of Indonesian origin. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*. 2012, 1(2): 152-158. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2012.02.001>
119. Zhang J., Li B., Liao X., Du G., Chen J. Expression and characterization of extreme alkaline, oxidation-resistant keratinase from *Bacillus licheniformis* in recombinant *Bacillus subtilis* WB600 expression system and its application in wool fiber processing. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2013, 29(5): 825-832. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1237-5>
120. Gupta S., Nigam A., Singh R. Purification and characterization of a *Bacillus subtilis* keratinase and its prospective application in feed industry. *Acta Biologica Szegediensis*. 2015, 59(2): 197-204.
121. Скільки крапель в 1 мл? [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://dovidkam.com/porady/skilki-krapel-v-1-ml.html>
122. Mohorčič M., Torkar A., Friedrich J., Kristl J., Murdan S. An investigation into keratinolytic enzymes to enhance ungual drug delivery. *International journal of pharmaceuticals*. 2007, 332(1-2): 196-201. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.09.042>
123. Gopinath S. C., Anbu P., Lakshmi Priya T., Tang T. H., Chen Y., Hashim U., et al. Biotechnological aspects and perspective of microbial keratinase production. *BioMed research international*. 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/140726>

124. Sala L., Gautério G. V., Younan F. F., Brandelli A., Moraes C. C., Kalil S. J. Integration of ultrafiltration into an aqueous two-phase system in the keratinase purification. *Process Biochemistry*. 2014, 49(11): 2016-2024.

<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.07.013>

125. Lemes A. C., Gautério G. V., Rosa C. A. D., Brandelli A., Kalil S. J. Two-Step Purification and Partial Characterization of Keratinolytic Proteases from Feather Meal Bioconversion by *Bacillus* sp. P45. *Processes*. 2023, 11(3): 803.

<https://doi.org/10.3390/pr11030803>

126. Основи біотехнології : підручник для студ. освітнього рівня бакалавр спец. «Біологія» / уклад. Н. Ю. Мацай. – Луганськ : Держ. закл. «Луган. нац. ун-т імені Тараса Шевченка». – Луганськ : Вид-во ДЗ «ЛНУ імені Тараса Шевченка», 2011. – 153 с.

127. Карлаш Ю.В., Красінько В.О. Основи проєктування біотехнологічних виробництв: Навч. посібник. –К.:НУХТ, 2022. –373 с.

128. Overview of Continuous Flow Centrifugation. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.news-medical.net/whitepaper/20160926/Overview-of-Continuous-Flow-Centrifugation.aspx>

129. Концентрування в аналітичній хімії. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/3678/koncentruvannya-v-analitichnij-ximii>

130. Fatima S., Khan R. H. Effect of polyethylene glycols on the function and structure of thiol proteases. *Journal of biochemistry*. 2007, 142(1): 65-72.

<https://doi.org/10.1093/jb/mvm108>

131. Patent FR WO1997003092A1. A process for removal of polyethylene glycol from a protein or peptide solution / Per K. S., Knud C. Publ. 30.12.1997.

132. Salmimies R., Kallas J., Ekberg B., Häkkinen A. Oxalic acid regeneration of ceramic filter medium used in the dewatering of iron ore. *International Scholarly Research Notices*. 2012. <https://doi.org/10.5402/2012/921873>

133. Повірка та призначення вагових дозаторів. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.ifdcsms.com.ua/en/news/296/povirka-ta-pryznachennia-vahovykh-dozatori>

134. ДСТУ 7393:2013 Метрологія. Дозатори дискретної дії вагові автоматичні. Методика повірки. [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://online.budstandart.com/ua/catalog/doc-page.html?id_doc=82497

135. ДСТУ 7154:2010 Метрологія. Лічильники рідини камерні. Методика повірки (калібрування). [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://online.budstandart.com/ua/catalog/doc-page?id_doc=92460

136. Рівноміри. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://petroline.ua/rivnemiri/>

137. Безконтактний радарний рівнемір Micropilot FMR20. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://trigla.net.ua/ua/p824148499-beskontaktnyj-radarnyj-urovnemer.html>

138. KERN DAB 200-2 аналізатор вологості з пам'яттю. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://pragmatic.com.ua/kern_dab200_2?gclid=CjwKCAjw04yjBhApEiwAJcvNoQTV_1_7iE57f8zmOE2FoQK_bDp65PyrLDjle37Sf99hOAHkKZymKlhoCPUUQAvD_BwE

139. Lemes A. C., Gautério G. V., Rosa C. A. D., Brandelli A., Kalil S. J. Two-Step Purification and Partial Characterization of Keratinolytic Proteases from Feather Meal Bioconversion by *Bacillus* sp. P45. *Processes*. 2023, 11(3): 803. <https://doi.org/10.3390/pr11030803>

140. Спектрофотометри LabAnalyt SP-UV1000. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://prom.ua/ua/p1762661496-spektrofotometri-labanalyt-uv1000.html?utm_source=google_product&utm_medium=cpc&utm_content=pla&utm_campaign=KT_cpc_1&gclid=CjwKCAjw04yjBhApEiwAJcvNoZfyf0Pjx9H6hC-7JoESf8lgh7NTUEPPLqWOKDvvt2uZ2e5xIHX6JBoCfQ8QAvD_BwE

141. Класифікація виробничих приміщень. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/3558/klasifikaciya-virobnichix-primishhen>

142. Вентиляція чистих приміщень, класи чистоти. [Електронний ресурс].
Режим доступу: <https://lumax.com.ua/uk/ventilyatsiya-chistih-primishhen-klasi-chistoti/>

143. Класифікація та стандарти чистоти повітря для чистих приміщень.
[Електронний ресурс]. Режим доступу: https://envirco.in.ua/class_room.html

144. Чорний, М. В. (2017). Система підготовки повітря для медичних та фармацевтичних підприємств (Doctoral dissertation, ВНТУ).

145. Устаткування асептичних і неасептичних виробництв лікарських засобів. Конспект лекцій для студентів спеціальності 133 «Галузеве машинобудування» спеціалізація «Обладнання фармацевтичних та біотехнологічних виробництв» / Уклад.: В.М. Поводзинський, В.Ю. Шибецький – К.: КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2017. – 251с.

146. Фармацевтична технологія: навчальний посібник для семінарських занять та самостійної роботи провізорів передатестаційного циклу підвищення кваліфікації за спеціальністю «Організація та управління фармації» / Г. П. Смойловська, О. О. Малюгіна, Т. В. Хортецька. – Вид. 2-ге, допрац. та допов. – Запоріжжя : ЗДМУ, 2020. – 84 с.

147. Сучасні засоби для дезінфекції та гігієни. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.systopt.com.ua/article-sovremennye-sredstva-dlya-dezynfekcyi-y-gygyeny>

148. Хлорантин актив 1кг. [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://www.xn--80aaolbmrsqie.com.ua/catalog_item?attr_id=20248

149. Хлорантоін. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.add.ua/ua/manual/hlorantoin-1kg.html>

150. Дезактін. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://prom.ua/ua/p276022596-dezaktin.html>

151. Антихлор Люкс. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://casada.ua/dezinficiruyushhee-sredstvo-antihlor-lyuks-koncentrat-1-1000-1-1>

152. Фамідез Форте. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.info-dent.com.ua/product/famidez_forte/

153. Чистолайн Універсал.__[Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://hlorka.in.ua/ua/p416344776-chistolajn-universal-dlya.html>
154. Виробництво інфузійних розчинів.__[Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://buklib.net/books/36223/>
155. Методи одержання та очищення води.__[Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://studfile.net/preview/8572913/page:3/>
156. SR300 from Across International. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.acrossinternational.com/shop-product-by-categories/stainless-glass-reactors/stainless-steel-reactors/stainless-300l.html>
157. Ultrasonic Bottle Washing Machine.__[Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://pharm-equipment.com/1-1-ultrasonic-bottle-washing-machine.html>
158. Сушильний туннель UVDM-1300.__[Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://www.mwm-kiev.com.ua/machine/210-sushilnyy-tunnel-uvdm-1300>
159. E -Fill SW Dropper.__[Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://cdafrance.com/en/monoblocks/e-fill-sw-dropper/>
160. KV-80ZH High Accuracy Automatic Vials Bottle Ampoules Carton Box Packing Sealing Machine Cartoning Machine. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.kingvictormachine.com/product/kv-80zh-high-accuracy-automatic-vials-bottle-ampoules-carton-box-packing-sealing-machine-cartoning-machine.html>
161. Automatic Paper Carton/Box /Case Group Packing Machine 2X3, 3X4, 4X6. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://zhjgroyalmachine.en.made-in-china.com/product/XCNEjWscQqhr/China-Automatic-Paper-Carton-Box-Case-Group-Packing-Machine-2X3-3X4-4X6.html>
162. Лабораторный прибор EZODO PL-700ALS с магнитной мешалкой для анализа параметров воды (pH, RedOx, COND, O2). [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://simvolt.ua/ru/laboratorniy-prilad-ezodo-pl-700als-dlya-analzu-parametrv-vodi-z-magnitnoyu-mishalkoyu-ph-redox-cond-o2.html/>