

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь магістр

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

Освітньо-професійна програма «Фармацевтична біотехнологія»
(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і
мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ

“ 01 ” листопада 2022 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

Харченко Оксани Григорівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Біокаталізатори гідролітичної дії для фармацевтичної
промисловості

керівник роботи Старовойтова Світлана Олександрівна, доц., к.б.н.,
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від 31 жовтня 2022 року № 782-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 03.02.2022

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

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) Перспективи отримання гідролітичних ферментів шляхом мікробного синтезу. Техніко-економічне обґрунтування виробництва лікарського засобу. Обґрунтування вибору технологічної схеми. Опис технологічної схеми післяферментаційного виділення і очищення субстанції для одержання ЛЗ. Контроль виробництва лікарського засобу. Обґрунтування вибору технологічної схеми одержання ЛЗ. Опис лікарського засобу згідно АНД.

5. Перелік графічного матеріалу

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 24 жовтня 2022 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1.	Літературний огляд	12.11.21-15.01.22	
2.	Розділ 1. Перспективи отримання гідролітичних ферментів шляхом мікробного синтезу	18.02.22-18.03.22	
3.	Розділ 2. Техніко-економічне обґрунтування виробництва лікарського засобу	04.04.22-15.05.22 15.10.22-12.12.22	
4.	Розділ 3. Підбір технологічного обладнання для стадій отримання субстанції та лікарського препарату	16.05.22-07.07.22	
5.	Розділ 4. Специфікація обладнання	08.07.22-25.07.22	
6.	Розділ 5. Опис технологічної схеми післяферментаційного виділення і очищення субстанції для одержання лікарських засобів	26.07.22-12.09.22	
7.	Розділ 6. Контроль виробництва лікарського засобу	13.09.22-07.10.22	
8.	Розділ 7. Обґрунтування вибору технологічної схеми одержання лікарського засобу	08.10.22-31.10.22	
9.	Оформлення вступу та реферату	13.12.22-09.01.23	

Здобувач _____
(підпис)

Оксана ХАРЧЕНКО _____
(ім'я та прізвище)

Керівник роботи _____
(підпис)

Світлана СТАРОВОЙТОВА _____
(ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційну роботу присвячено розробці технології одержання капсул з амілазою бактеріального походження. Цільовий фермент отримують в процесі культивування бактеріального штаму *Bacillus* sp. WangLB, який здатен синтезувати амілазу з високою активністю (26 670 Од/л), за наявності в середовищі культивування крохмалю як джерела вуглецю у кількості 20 г/л.

Розроблено апаратурну і технологічну схеми виробництва, що включає технологічний процес виділення й очищення амілази та отримання лікарського засобу у формі капсул (відділення біомаси, висолювання, відділення осаду, концентрування, висушування, подрібнення та просіювання, фасування, пакування, маркування, відвантаження).

Кваліфікаційна робота викладена на 116 сторінках друкованого тексту, містить 9 таблиць, 1 рисунок і складається з вступу, восьми розділів, списку використаної літератури (88 джерел) та графічної частини (1 креслення формату А1 та 1 креслення формату А3).

Ключові слова: гідролітичні ферменти, амілаза, *Bacillus* sp. WangLB, крохмаль, аерація, виробничий біосинтез.

ЗМІСТ

ВСТУП	7
ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД	9
РОЗДІЛ 1. ПЕРСПЕКТИВИ ОТРИМАННЯ ГІДРОЛІТИЧНИХ ФЕРМЕНТІВ ШЛЯХОМ МІКРОБНОГО СИНТЕЗУ	9
ВИСНОВКИ.....	48
ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА	49
РОЗДІЛ 2. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВА ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ	49
2.1. Потреба у цільовому продукті	49
2.2. Обґрунтування вибору форми випуску лікарського засобу	50
2.2.1. Обґрунтування форми випуску ЛЗ.....	51
2.2.2. Обґрунтування вибору первинної і вторинної упаковки ЛЗ	53
2.3. Обґрунтування вибору біологічного агенту для отримання субстанції	55
2.4. Розрахунок потужності виробництва.....	59
2.4.1. Розрахунок кількості стадій отримання посівного матеріалу для вирощування культури у ферментері 5 м ³	60
2.4.2. Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в інокуляторі 500 л.....	61
2.4.3. Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в інокуляторі 50 л.....	62
2.4.4. Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в інокуляторі 5 л.....	62
2.4.5. Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в колбах на качалці	63
РОЗДІЛ 3. ПІДБІР ТЕХНОЛОГІЧНОГО ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ СТАДІЙ ОТРИМАННЯ СУБСТАНЦІЇ ТА ЛІКАРСЬКОГО ПРЕПАРАТУ	64
РОЗДІЛ 4. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ	70
РОЗДІЛ 5. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНОГО ВИДІЛЕННЯ І ОЧИЩЕННЯ СУБСТАНЦІЇ ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ ЛЗ	73
РОЗДІЛ 6. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ	77

РОЗДІЛ 7. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	
ОДЕРЖАННЯ ЛЗ	80
7.1. Розрахунок річної потужності виробництва ЛЗ та кількості серій на рік.....	80
7.2. Обґрунтування вибору класів чистоти виробничих приміщень	81
7.3. Обґрунтування вибору підготовки первинної упаковки.....	88
7.4. Обґрунтування вибору підготовки води.....	89
РОЗДІЛ 8. ОПИС ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ЗГІДНО АНД	92
ВИСНОВКИ.....	104
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	105

ВСТУП

Мікробні ферменти більш стабільні та активні порівняно з ферментами рослин і тварин. Відомо, що наразі вони мають широкий спектр фармацевтичного та іншого промислового застосування. Більш того, їх біохімічне різноманіття, чутливість до маніпуляцій з генами та можливість отримати значну кількість цільових ферментів за короткий час шляхом мікробного синтезу сприяє тому, що саме мікроорганізми є альтернативним та економічно вигідним джерелом для виробництва ферментів [1].

На сьогоднішній день серед широкого спектру гідролітичних ферментів (гідролаз) найбільше практичне значення мають протеази та пептидази, ліпази та амілази. Так, перспективним класом широко застосовуваних нині гідролітичних ферментів є амілази. Застосування амілолітичних ферментних препаратів з кожним роком все більш розширюється. Це пов'язано з нестачею енерго- та біоресурсів, а також екологічними проблемами [1].

У зв'язку з цим можна виділити саме застосування амілолітичних ферментних препаратів у фармацевтичній промисловості та медицині. Зважаючи на наявність амілаз у складі ферментних препаратів, у медицині амілази використовують для регуляції та усунення гіпоферментозів шлунково-кишкового тракту, лікування слизової оболонки кишечника, шлунка, підшлункової залози, аналітичної діагностики крові та сечі для виявлення невеликих кількостей сечовини, глюкози, сечової кислоти, нуклеотидів, амінокислот. Поліферментні препарати, у складі яких є амілази, використовуються для розсмоктування тромбів у кровоносних судинах, видалення надлишку накопиченого глікогену в тканинах організму [1].

Тому **актуальним** питанням є пошук та використання нових мікробних штамів для біосинтезу амілолітичних ферментів для подальшого їх використання

					НУХТ БТЕК 02.02.07 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Вступ	Літ.	Арк.	Аркушів 7
Розроб.		Харченко О.Г.					7	2
Перевір.		Старовойтова С.О.						
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						Кафедра БТМ

у фармацевтичній промисловості. **Новизною** даної кваліфікаційної роботи є використання бактеріального штаму *Bacillus* sp. WangLB для біосинтезу гідролітичного ферменту амілази, внаслідок вирощування якого отримують цільовий фермент з високою активністю 26 670 Од/л, для одержання лікарського препарату на основі амілази у формі капсул.

ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

РОЗДІЛ 1. ПЕРСПЕКТИВИ ОТРИМАННЯ ГІДРОЛІТИЧНИХ ФЕРМЕНТІВ ШЛЯХОМ МІКРОБНОГО СИНТЕЗУ

На сьогоднішній день відомо багато мікроорганізмів, які здатні продукувати ферменти гідролітичного комплексу, серед них виділяють продуцентів, здатних до росту на дешевих субстратах. Загалом, серед таких біологічних агентів присутні різні роди мікроорганізмів – *Bacillus*, *Aspergillus*, *Bispora*, *Pichia*, *Guehomyces*, *Penicillium*, *Pseudomonas*, *Candida*, *Escherichia*, *Thermotoga*, *Streptomyces*. Отже, можна відмітити, що спектр продуцентів гідролаз є досить широким.

1.1. Біосинтез гідролітичних ферментів на різноманітних субстратах

В сучасних умовах перспективність біотехнологій заключається в тому, що біотехнологічні виробництва дозволяють, використовуючи не дороговартісну сировину, нерідко навіть відходи певних харчових та інших біотехнологічних виробництв, серед яких виділяють і використання біомаси інших мікроорганізмів (біошрот) в якості субстрату, вирішувати проблему одержання практично цінних метаболітів з одночасною утилізацією відходів виробництв. Виробництво ферментів не є виключенням і у процесі промислового одержання ферментів також використовують різноматнітні групи субстратів.

Гідролітичні ферменти поділяються на певні групи, до їх числа входять різні гідролази – амілази, β -галактозидази, інулінази, ліпази, пулуланази, целюлази. Тому детальніше розглянемо особливості одержання таких гідролітичних ферментів шляхом культивування продуцентів на субстратах різного походження. деякі групи гідролітичних ферментів.

Амілази

Амілази (Е.С. 3.2.1.1.) – це гідролітичні ферменти, що руйнують внутрішні

					НУХТ БТЕК 02.02.07 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Харченко О.Г.			РОЗДІЛ 1. ПЕРСПЕКТИВИ ОТРИМАННЯ ГІДРОЛІТИЧНИХ ФЕРМЕНТІВ ШЛЯХОМ МІКРОБНОГО СИНТЕЗУ	Літ.	Арк.	Аркушів 9
Перевір.		Старовойтова С.О.					9	39
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

α -1,4-О – глікозидні зв'язки у крохмалі з утворенням різноманітних продуктів, включаючи моноцукрову глюкозу та олігоцукрову мальтозу. α -Амілази мають різноманітне походження, продуцентами можуть виступати рослини, тварини, бактерії, актиноміцети та гриби. З іншого боку, такі продукти мікробного синтезу як грибні та бактеріальні амілази, знайшли широке використання у фармацевтичній промисловості. Перевагами амілаз, отриманих внаслідок мікробного синтезу, є їх низька собівартість, значні обсяги продукту на виході, короткотривалість процесу синтезу, а також простий процес модифікації та оптимізації процесу [2].

Спектр використання амілолітичних ензимів розширюється з кожним роком, а отже – зростає потреба в них, у тому числі в Україні, яка використовує виключно імпортовані препарати амілаз [3]. Тому у статті [3] Кубрак О.І. було використано методику іммобілізації α -амілази з *Bacillus* sp. в Ca^{2+} -альгінатних кульках. *Bacillus* sp. ВКЛ20 культивували у середовищі з 0,3%-го пептону, 0,2%-го дріжджового екстракту і 0,025%-го крохмалю при 40 °С і 150 об/хв протягом 24 год. Максимальний вміст іммобілізованої α -амілази одержаний за нейтрального значення рН – 7 ОД/мг протеїну. Показано, що з Ca^{2+} -альгінатними кульками зв'язувалась приблизно така ж кількість α -амілази, що підтверджується також показниками загальної активності (0,05 Од) та зменшенням питомої активності (від 12 до 1 Од/мг протеїну) іммобілізованої α -амілази при додаванні ензимного препарату в кількості 20–160 мкг протеїну до 1 мл 2%-го розчину альгінатів.

Пізніше ці ж дослідники у роботі [4] встановили оптимізацію умов культивування штаму *Bacillus* sp. ВКЛ40. Інтенсивність синтезу α -амілази не залежала від наявності крохмалю в середовищі культивування (0,025%) – 4,4 ОД/мл протеїну, й стимулювалася додаванням пептону (0,3%) та дріжджового екстракту (0,2%) – 6,5 та 3 ОД/мл протеїну. Ензим повністю зберігав амілолітичну активність після 30 хв інкубації при 60 і 70°С. α -Амілаза виявляла високу

активність у широкому діапазоні значень рН — від 6,0 до 11,0 і зберігала активність навіть після 24 год інкубації за цих значень рН. Досліджувана α -амілаза не активувалась іонами кальцію та іонами інших двовалентних металів (1 мМ), а також не інгібувалась ЕДТА та ЕГТА (1–10 мМ), що може свідчити про відсутність іонів кальцію у структурі її молекули.

У праці [5] Борзова Н.В. зі співавторами виявили активні штами з глюкоамілазною активністю серед представників мікроміцетів родів *Acremonium*, *Alternaria*, *Eupenicillium*, *Gliocladium*, *Myrothecium*, *Penicillium*, *Rhizopus*, було виявлено, що найактивніші біосинтетики належали до родів *Aspergillus*, *Fusarium* та *Phoma*. Оптимальними джерелами вуглецю під час глибинного культивування штамів *Aspergillus* sp. при 220 об/хв, 25 °С протягом 4–5 діб виявились 2%-й картопляний або кукурудзяний крохмаль, а також комбінація 2%-го картопляного крохмалю з 1%-ю мальтозою. Однак для різних штамів *Aspergillus* sp. оптимальні умови для синтезу глюкоамілази відрізнялись. Так, для штаму *Aspergillus* sp. 9 такими були: засів 2–3 добовим інокулятом (5%), 4-добова ферментація, використання 2%-го картопляного або кукурудзяного крохмалю як джерела вуглецю. Глюкоамілазна активність у культуральній рідині за цих умов становила 1,42 Од/мг протеїну. Під час вирощування культури *Aspergillus* sp. 32 максимальний рівень активності спостерігався на 3-тю добу глибинного культивування у присутності 2%-го картопляного крохмалю або комбінації 2%-го кукурудзяного крохмалю з 1%-ю мальтозою (активність 1,4 та 1,6 Од/мг протеїну відповідно). Вирощування *Aspergillus* sp. 59 на кукурудзяному крохмалі (2%) забезпечувало синтез глюкоамілази на рівні 1,44 Од/мг протеїну, що на 20–40% вище, ніж у разі використання картопляного крохмалю або мальтози. Найвищих показників за глюкоамілазною активністю в перерахунку на мл культуральної рідини для культури *Aspergillus* sp. 182ш було досягнуто на середовищі з висівками та мальтозою, однак за показниками питомої активності цей штам поступався першим трьом. Автори відмітили, що одержані результати є

перспективними для створення засад для впровадження нових ензимних препаратів у процесі перероблення крохмалевмісної сировини.

Авдіюк К.В. зі співавторами провели дослідження методів виділення та очищення ферментів з α -амілазною активністю двох продуцентів — *Aspergillus flavus* var. *oryzae* 80428 та *Bacillus subtilis* 147 [6]. Штами вирощували у середовищі з нерозчинним картопляним крохмалем у кількості 10 та 1 г/л при рН 6,0, 220 об/хв, за температури 25 °С та 45 °С відповідно протягом 5 та 3 діб відповідно. Так, в супернатанті *B. subtilis* 147 α -амілазна активність становила 2,5-3 ОД/мл, у той час як активність ферменту *A. flavus* var. *oryzae* 80428 складала приблизно 4-6,5 ОД/мл. α -Амілаза *A. flavus* var. *oryzae* 80428 була очищена в 37 рази, а α -амілаза *B. subtilis* 147 — в 20 разів у порівнянні з активністю ензиму в супернатанті культуральної рідини. α -Амілаза *A. flavus* var. *oryzae* проявляла максимальну активність при рН 6,0 та температурі 60 °С, зберігала 100% активності через 24 год при рН 5,0–7,0 та протягом 3 год при температурі 37 °С. рН-оптимум α -амілази *B. subtilis* 147 складав 8,0 с термооптимумом при 90 °С; ензим повністю зберігав початкову активність протягом доби при рН 7,0–9,0 та протягом 3 год при температурі 37 °С, 60 °С та 70 °С. При температурі 80 °С α -амілаза *B. subtilis* зберігала 80% початкової активності після 3 год інкубування.

Пізніше ці ж дослідники вивчили здатність α -амілаз двох продуцентів — *A. flavus* var. *oryzae* 80428 і *B. subtilis* 147 розщеплювати різні вуглеводмісні субстрати, зокрема мальтозу, сахарозу, трегалозу, декстрин, α - та β -циклодекстрин, амілозу, амілопектин, глікоген, пулулан, розчинний картопляний, нерозчинний картопляний, кукурудзяний, пшеничний крохмалі, декстран 500 [7]. Показано, що досліджені ензими відрізняються за субстратною специфічністю. α -Амілаза *A. flavus* var. *oryzae* 80428 найефективніше гідролізує розчинний картопляний і пшеничний крохмалі, тоді як α -амілаза *B. subtilis* 147 — тільки пшеничний. Ензими обох продуцентів не розщеплюють мальтозу, α -циклодекстрин і декстран 500. Дуже низьку здатність до гідролізу пулулану виявлено в α -амілази *A. flavus* var. *oryzae* 80428, тоді як α -амілаза *B. subtilis* 147

взагалі не діяла на нього. Вивчення впливу хімічно активних речовин на активність досліджених ензимів показало, що α -амілази *A. flavus* var. *oryzae* 80428 і *B. subtilis* 147 є стійкими до сечовини, дезоксихолевої кислоти, Твіну-80, Тритону X-100 та пероксиду водню.

В наступній своїй роботі дослідники провели встановлення властивостей α -амілази *Achromobacter* sp. 7a [8]. Штам-продуцент ферменту вирощували у середовищі з картопляним крохмалем (20 г/л). При очищенні ферменту було застосовано метод афінної сорбції на нерозчинному картопляному крохмалі, найбільш ефективним серед елюантів виявився 2%-ий розчин мальтози з нагріванням до 40 °С, при цьому активність α -амілази була 3,0 ОД/мг білка. Показано також, що α -амілаза *Achromobacter* sp. 7a була активною в широкому діапазоні рН від 6,0 до 12,0 з оптимальними значеннями рН 7,0 і 11,0.

У свою чергу, закордонними дослідниками у роботі [2] було вивчено процес синтезу амілази термофільною бактерією *Bacillus subtilis* (штам не вказано). З метою підвищення рівня синтезу даного ферменту було проведено оптимізацію поживного середовища, що передбачало внесення до базового середовища різних концентрацій субстрату, представленого крохмалем (0-20 г /л), а також визначення оптимального джерела азоту (3 г/л) – пептон, дріжджовий екстракт, яловичий екстракт, солодовий екстракт, дріжджовий екстракт + пептон (1,5+ 1,5 г), яловичий екстракт+пептон, NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, пептон+ NaNO_3 , пептон+ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Встановили, що максимальна кількість ферменту 25 ОД/мл була отримана при внесенні 5 г/л крохмалю та 10 г/л пептону, а оптимальними умовами при проведенні вирощування продуцента протягом 48 год є підтримка температурного режиму на рівні 45 ° С, а також при рН 8,5.

Ма зі співавторами також встановили можливість отримання амілази при вирощуванні бактерії *B. subtilis* [9]. Автори підкреслили, що лужна амілаза має значний потенціал для застосування у різних галузях промисловості, однак низький вихід такої амілази не може задовольнити вимоги промислового застосування, тому їх дослідження було присвячено використанню стратегії

оптимізації мікробної ферментації цільового ферменту шляхом операцій мутагенезу для значного покращення рівня експресії рекомбінантної лужної амілази у вихідного штаму *B. subtilis* 168. Встановили, що активність лужної амілази у мутантного штаму *B. subtilis* 168 mut-16# була в 1,34 рази більшою, ніж у дикого типу, і найвища питома продуктивність була підвищена зі значення 1,31 ОД/(мг·год) у штаму дикого типу до 1,57 ОД/(мг·год) у мутантного штаму відповідно. Коли концентрація розчинного крохмалю та соєвого пептону у вихідному ферментаційному середовищі подвоїлась, активність лужної амілази збільшилася у 1,29 рази відповідно, у той час як наявність гідролізованого крохмалю та суміші соєвого пептону або глюкози значно покращило ріст клітин, однак супроводжувалось інгібуванням синтезу лужної амілази у мутантного штаму *B. subtilis* 168 mut-16#. Найвища активність лужної амілази внаслідок внесення у середовище гідролізованого крохмалю досягала 591,4 ОД/мл, що в 1,51 разів перевищувало активність ферменту при наявності гідролізованого крохмалю та суміші соєвого пептону в середовищі культивування продуцента.

Дослідження інших вчених також стосувались визначенню оптимальних умов для одержання амілази при культивуванні *B. subtilis* RM16 [10]. Було виявлено, що максимальна активність становила 350 ОД/мл і була зафіксована саме при використанні розчинного крохмалю як субстрату. Контрольовані параметри включали час інкубації, температуру інкубації, рН, розмір інокуляту, джерело вуглецю, джерело азоту та наявність іонів металів у середовищі. Крохмаль як джерело вуглецю вносили у кількості 1% (об'ємна частка), як джерело азоту використовували дріжджовий екстракт (1,5%, об'ємна частка). Крім цього визначили, що іони магнію у кількості 0,1% (об'ємна частка) надавали максимальний стимулюючий ефект для виробництва амілази, що допомогло досягнути максимального рівня її активності 350 ОД/мл.

Wang зі співавторами зазначили, що витрати на амілазу складають близько 24 % витрат у крохмальній промисловості, а значно скоротити виробничі витрати можна за рахунок збільшення обсягів виробництва та/або активності синтезованої

амілази [11]. У своєму дослідженні автори провели оптимізацію умов біосинтезу амілази, що передбачало вирощування штаму *Bacillus* sp. WangLB протягом 48 год у рідкому крохмальовмісному (20 г/л) середовищі, при температурі 35 °С та рН 10, при цьому було одержано 26670 ± 1390 ОД/мл амілази. Також було випробувано вплив 16 органічних індукторів на процес продукування амілази і результати показали, що внесення 20 ммоль/л аланіну у середовище значно підвищило синтез амілази до 290 % від базового рівня. Фермент також виявляв високу активність у широкому діапазоні температур (50–85 °С) та значень рН (3–10), а активність амілази не залежала від наявності Ca^{2+} у середовищі культивування штаму *Bacillus* sp. WangLB.

Хемотрофний аеробний бактеріальний штам *B. subtilis* В2 використали для отримання амілази шляхом глибинного культивування при різних джерелах освітлення у праці [12]. Штам В2 інкубували у середовищі з розчинним крохмалем (1%, об'ємна частка) при рН 7,0 під синім, зеленим, червоним та білим світлодіодами, а також під білим флуоресцентним світлом. Так, проведення ферментації під синіми світлодіодами дозволило максимізувати синтез амілази до $180,59 \pm 1,6$ ОД/мл за 24 год. Через 48 год рівень активності ферменту збільшився до $310,56 \pm 1,6$ ОД/мл з використанням глюкози як джерела вуглецю та енергії (5%, об'ємна частка) та становив $300,51 \pm 1,7$ ОД/мл при додаванні в середовище такої ж кількості арахісового масла як субстрату. Активність та стабільність синтезованої амілази були максимальними при рН 7,0 та температурі 45–55 °С. Іони Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Ba^{2+} та K^+ підвищували активність амілази, в той час як Ni^{2+} , Hg^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} и Zn^{2+} навпаки інгібували активність. Амілаза володіла високою толерантністю до поверхнево-активних речовин, була сумісна з органічними розчинниками, окислювачами та відновниками зі зниженою активністю.

В іншому дослідженні [13] було встановлено особливості продукування амілази новим штамом *Bacillus aryabhatai* КІПТ ВЕ-1. Встановили, що максимальне значення ферменту спостерігалось при культивуванні продуцента

протягом при температурі 37 °С, при цьому значення активності амілази становило 3,2 ОД/мл через 36 год вирощування штаму КІТ ВЕ-1 у базовому середовищі, що містило крохмаль та дріжджовий екстракт. Проведення оптимізації поживного середовища (10,25% крохмалю, 5,0% пептону, 5,18% дріжджового екстракту, при рН 7,3) дозволило підвищити активність амілази штаму *B. aryabhatai* КІТ ВЕ-1 у 1,39 рази до значення 4,16 ОД/мл.

Zhang зі співавторами [14] встановили, що α -амілаза, синтезована археєю *Pyrococcus furiosus*, може гідролізувати α -1,4-зв'язки у крохмалі та споріднених вуглеводах в умовах гіпертермофільності (температура ~ 100 °С), демонструючи значний потенціал у широкому діапазоні промислового застосування, однак обмежуючим фактором є низька продуктивність *P. furiosus* (штам не наведено). Було проведено термічну обробку інтактною культурою при температурі 90°C протягом 15 хв, що значно збільшило синтез α -амілази *P. furiosus* у штамі *B. subtilis* WS9, а після оптимізації умов культивування (соєвий пептон та дріжджовий екстракт у співвідношенні 2:1 загальною концентрацією 100 г/л, 500 г/л глюкози у вигляді підживлюючого розчину з підтримкою концентрації глюкози на рівні 0,5 г/л упродовж всього культивування) активність амілази досягла значення 3806,7 ОД/мл, що було у 3,3 та 28,2 рази більше, порівняно зі значеннями активності за відсутності термічної обробки (1155,1 ОД/мл) та значенням активності при вирощуванні початкового штаму (135,1 ОД/мл).

Існують різні типи амілаз, і одним з найважливіших є глюкоамілази (ЕС 3.2.1.3 1,4- α -D-глюкан глюкогідролаза), також відомі як амілоглюкозидази, вони є екзоамілазами, здатні гідролізувати глікозидні зв'язки α -1,4 типу шляхом послідовного видалення одиниць глюкози з невідновлювального кінця ланцюга, вивільняючи молекули D-глюкози в β -конформації. Ці ферменти також гідролізують зв'язки α -1,6 та деякі з типів α -1,3, але з меншою швидкістю [15].

Так, метою дослідження представленого у статті [15] було визначення оптимальної концентрації джерела вуглецю для індукування виробництва амілази *Aspergillus japonicus*, з подальшим її очищенням та визначенням її біохімічної

характеристики. *A. japonicus* (штам не вказано) культивували у середовищі Khanna, використовуючи картопляний крохмаль чи мальтозу в якості джерела вуглецю, при цьому за внесення 1% крохмалю як субстрату активність глюकोамілази *A. japonicus* по закінченню процесу становила 308,01 ОД/мл. Синтезована за таких умов глюкоамілаза зберігала 75% своєї активності через одну годину при 50 ° С і була стабільною в діапазоні рН 3,0-7,0. Аналіз кінцевих продуктів методом тонкошарової хроматографії показав лише утворення глюкози, що характеризує очищений фермент саме як глюкоамілазу.

Продукція глюкоамілази та її активність залежать від складу середовища для культивування даного ферменту, тому у праці [16] оптимізація середовища для отримання глюкоамілази розглядалась як метод підвищення її активності. Середовище для культивування штаму *Aspergillus niger* van Tieghem, що містило солодовий екстракт (51,82 г/л), FeSO₄·7H₂O (0,50 г/л) та CaCl₂·2H₂O (9,27 г/л), з додаванням 50 г/л пюре з картопляних відходів було оптимальним для синтезу глюкоамілази і дозволило отримати 274,4 ОД/мл цього ферменту, що перевищило показники активності глюкоамілази за вирощування штаму *A. niger* van Tieghem у базовому середовищі на 126%.

Автори статті [17] зазначили необхідність глюкоамілази з високою термостабільністю у різноманітних промислових умовах, зокрема і у переробці крохмалю. Було обрано штам *Bispora* sp. MEY-1 в якості мікробного джерела для подальшої експлуатації гена глюкоамілази. Так, ген глюкоамілази (gla15) було клоновано з *Bispora* sp. MEY-1 і успішно експресовано в *Pichia pastoris* GS115, що дозволило одержати 34,1 ОД/мл глюкоамілази при культивуванні при 30°C протягом 3-5 діб. Отримана очищена рекомбінантна глюкоамілаза GLA15 була термофільна і показала максимальну активність при 70°C.

Луо зі співавторами [18] визначили ефективність застосування трьохетапної стратегії подачі субстрату з різною швидкістю з оцінкою використання альтернативних джерел вуглецю з метою зниження вартості сировини для культивування глюкоамілази. При культивуванні штаму *A. niger* JJS-01

температуру підтримували на рівні 31 °С, а рН – 5,0, швидкість аерації становила 2 об/об/хв., швидкість перемішування на початку процесу становила 150 об/хв. Процес ферментації було розділено на 2 фази: періодична фаза (0-20 год) і фаза з підживленням (20-130 год), у першій фазі як субстрат використовували крохмаль (30 г/л), у другій – мальтозу (600 г/л). Завдяки застосуванню такого підходу активність глюкоамілази досягла 11000 ОД/мл.

β-Галактозидази

β-Галактозидази (Е.С. 3.2.1.23) каталізують гідроліз кінцевих невідновлювальних залишків β-d-галактози в β-d-галактозидах. Одним з основних застосувань цього ферменту є гідроліз лактози в молоці та молочних продуктах, де β-галактозидаза розщеплює лактозу на d-глюкозу та d-галактозу, а як відомо, ферментативний гідроліз лактози є важливим біотехнологічним процесом у харчовій промисловості [19].

Так, у статті [20] повідомили про синтез β-галактозидази рекомбінантним штамом, що призвело до отримання ферменту з високою активністю. Ген β-галактозидази з *Aspergillus oryzae* було сконструйовано з використанням оптимізації кодонів для постійно високої експресії в штамі *Pichia pastoris* SMD1168H. Після ферментації тривалістю 96 год з використанням суміші глюкози та гліцерину (3:1) як субстрату рекомбінантний фермент в супернатанті культури штаму SMD1168H мав активність 4239,07 ОД/мл. Рекомбінантна β-галактозидаза проявляла посилену здатність до гідролізу лактози – за дії 1000 ОД ферменту в 100 мл молока ступінь розкладу лактози становив 92,44% протягом 24 год при 60 °С.

У роботі [21] визначили знатність мутантного штаму *Guehomyces pullulans* NTG-133 синтезувати підвищені кількості β-галактозидази. Мутантний штам NTG-133, вирощений у середовищі з 30 г/л лактози та 2 г/л глюкози, міг продукувати більше ферменту, ніж у разі наявності лише лактози у середовищі культивування продуцента. Було визначено, що порошок сироватки у кількості 40 г/л був оптимальним субстратом для продукції β-галактозидази штамом NTG-133.

Після оптимізації середовища та умов культивування *G. pullulans* NTG-133 міг синтезувати 29,2 ОД/мл загальної активності β-галактозидази протягом 132 год за культивування в колбах, у той час як при вирощуванні в 2-літровому ферментері отримали 48,1 ОД/мл ферменту за 144 год. Також було показано, що β-галактозидаза, синтезована психротолерантними дріжджами, може бути використана для гідролізу лактози в сироватці.

Liю зі співавторами [22] описали отримання β-галактозидази внаслідок клонування та надекспресії термостабільної β-галактозидази з *Bacillus coagulans* NL01 в *Escherichia coli*. У порівнянні з іншими β-галактозидазами з сімейства глікозидгідролаз, β-галактозидаза *B. coagulans* NL01 виявляла чудову гідролізну активність. Питома активність ферменту для лактози становила 27,18 ОД/мг. Всього 104,02 г/л лактози в сироватці, що виступає субстратом у даному поживному середовищі, було повністю гідролізовано за 3 години з додаванням 2,38 мг чистого ферменту на грам лактози. Дослідники підкреслили, що з огляду на високу ціну комерційної β-галактозидази, β-галактозидаза *B. coagulans* NL01 може бути перспективним прототипом для розробки комерційних ферментних препаратів.

Інулінази

Інулінази являють собою ферменти, що каналізують інулін, вони належать до сімейства 32 глікозидгідролаз (GH). Бактерії, гриби та дріжджі є потенційними продуцентами інуліназ. В сучасну еру біотехнологій інулінази набувають значної уваги завдяки їх широкому спектру застосування, що включає виробництво сиропу з високим вмістом фруктози, фруктоолігосахаридів та багатьох інших важливих метаболітів, таких як біоетанол, органічні кислоти, 2,3-бутандіол тощо. Такі шляхи використання інуліназ зацікавили дослідників у всьому світі, актуальним питанням є розуміння взаємодії інуліну та інулінази при гідролізі поліфруктану. Серед інуліназ екзо- та ендоїнулінази знаходять широке застосування у фармацевтичній та харчовій промисловості [23].

Так, метою роботи [24] було вивчення синтезу та застосування інулінази з грибового ендоефітного штаму ССМВ 328. Результати показали, що найкращим умовами для продукції інулінази штаму ССМВ 328 є проведення культивування в середовищі з 9,89 г/л глюкози та 1,09 г/л дріжджового екстракту. Концентрація 0,20 моль/л NaCl та KCl збільшувала активність інулінази приблизно на 63% та 37% відповідно.

Як відомо, інулін є запасним вуглеводом приблизно у 15% квіткових рослин і накопичується у підземних бульбах, наприклад, у цикорію, георгіну та топінамбуру. Інулінази гідролізують інулін до фруктози та глюкози. У статті [25] встановили можливість синтезу інулінази представником роду *Penicillium*. Так, при культивуванні *Penicillium subrubescens* sp. nov. (CBS 132785T = FBCC 1632T) за температури 28 ° C та рН 6 з використанням інуліну та топінамбура в якості джерела вуглецю, активність інулінази на 4-й день складала 7,7 ОД/мл.

Інулін чи багаті на інулін матеріали можуть активно гідролізуватись мікробними інуліназами з утворенням сиропів глюкози та фруктози, які знаходять широке використання в біопроцесах. У дослідженні, описаному в статті [26], було виділено декілька мікробних штамів та оцінено їх здатність до біосинтезу інулінази. Новий штам дріжджів, ідентифікований як *Zygosaccharomyces bailii* Talf1, був найкращим продуцентом інулінази, активність якої досягала 8,67 ОД/мл, коли сік топінамбура (25%, об'ємна частка) використовувався в якості субстрату, культивування проводили протягом 5-8 діб при 25°C та швидкості обертів 150 об/хв.

Фруктоза та фруктоолігосахариди (ФОС) є важливими інгредієнтами у промисловості. Фруктоза вважається альтернативним сахарозі підсолоджувачем, підвищує абсорбцію заліза у дітей, а ФОС є джерелом харчових волокон з біфідогенним ефектом. Обидві ці речовини можна отримати ферментативним гідролізом інуліну. Однак інулін є обмежену розчинність при кімнатній температурі, тому виробництво фруктози та ФОС здійснюється при 60 °C. таким чином, підвищується інтерес до виділення термостабільних інуліназ. У роботі [27]

оцінили здатність різних грибних штамів продукувати термостабільні інулінази. Штами інкубували при 37 ° С та 200 об/хв. протягом 96 год. Найвищу активність інулінази у *Rhizopus microsporus* 13aIV (10,71 ОД/мл) вдалось визначити через 36 год при оптимальній для інулінази температурі 70 °С. Через 6 год при 60 ° С фермент не показав втрати активності і зберіг активність близько 87%. Згідно продуктів гідролізу, *R. microsporus* 13aIV синтезував ендо- та екзоінуліназу.

Здатність грибних штамів до синтезу інулінази досліджували також у праці [28]. Гриби, що належали до роду *Aspergillus* синтезували високі концентрації інулінази – *A. niger* GNCC2655 (11,3 ОД/мл), *A. awamori* MTCC 2879 (8,2 ОД/мл), *A. niger* ATCC 26011 (7,9 ОД/мл), у той час як здатність до продукування інулінази у *Penicillium* sp. NFCCI 2768 та *Penicillium citrinum* MTCC 1256 була нижчою – 2,6 ОД/мл та 1,1 ОД/мл відповідно. Аналіз кінцевих продуктів активності інулінази показав, що більшість ферментів були екзоінуліназами, що вивільняють фруктозу виключно з інуліну, що і був субстратом. П'ять штамів грибів – *P. citrinum* MTCC 1256, *Penicillium rugulosum* MTCC 3487, *Penicillium* sp. NFCCI 2768, *A. fumigatus* GNCC 1351 та *A. niger* ATCC 26011 продукували суміш ендо- та екзоінуліназ, що вивільняють олігосахариди разом з фруктозою.

Ліпази

Основну частину промислово важливих ферментів світового ринку на сьогодні становлять гідролази. Ліпази (триацилгліцеролгідролази КФ 3.1.1.3) як гідролітичні ферменти можуть використовуватись у багатьох галузях господарства, де необхідний частковий або повний гідроліз жирів та олій. Вони широко застосовуються в харчовій, фармацевтичній та легкій промисловості, в медицині, в препаративній хімії та біохімії, у виробництві мийних засобів, для очищення стічних вод і каналізаційних комунікацій. Ліпази викликають великий інтерес у науковців у зв'язку зі своїми унікальними властивостями, а саме дією на поверхні поділу фаз, різноманітністю субстратної специфічності, здатністю каталізувати як гідроліз тригліцеридів, так і зворотні реакції в мікrowодневих умовах. Ліполітичні ферменти поширені в організмах різного рівня біологічної

організації, але вирішити технологічні завдання можна тільки за допомогою їх мікробного синтезу [29].

Виробництво позаклітинної ліпази ґрунтовим ізолятом *Pseudomonas* spp. описано у праці [30]. Було встановлено, що оптимальний час для синтезу ліпази складає 72 год, температура 30 °С, режим перемішування 120 об/хв, рН 7,2, а кількість ферменту збільшувалась, коли в середовище культивування додавали гірчичну олію (5 %, об'ємна частка) в якості джерела вуглецю і дигідрофосфат амонію в якості джерела азоту, що покращувало вироблення ліпази, порівняно з іншими органічними джерелами азоту (екстракт яловичини, пептон, дріжджовий екстракт) – специфічна активність ліпази становила 0,276 $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$.

Інші вчені дослідили вплив факторів навколишнього середовища та емульгаторів на синтез ліпази культурою *Candida viswanathii* (штам не наведено) [31]. Найвищу активність ліпази 101,1 ОД/мл спостерігали при наявності 1,5 % (об'ємна частка) оливкової олії як субстрату, за режиму перемішування 210 об/хв, рН 6,0 та температури 27,5 °С, при цьому вихід ліпази становив 6,892 ОД/ г. Додавання соєвого лецитину збільшувало продукцію ліпази в 1,5 рази – вихід ферменту становив 10,061 ОД/г. Неочищена ліпаза демонструвала оптимальну активність при кислотному рН 3,5, що свідчить про новизну даного ліполітичного ферменту для цього роду та дріжджів загалом. Крім того, неочищена ліпаза демонструвала високу стабільність у кислих умовах і температурі від 40 до 45°С після 24 год інкубації.

У праці [32] було проведено дослідження виробництва ліпази з використанням стоків пальмової олійної фабрики (РОМЕ) як базового середовища для культивування. Крім того, було досліджено іммобілізацію ліпази *Candida cylindracea* АТСС 14830 на різних матеріалах. Ферментаційне середовище складалося з 1% РОМЕ, 0,5% (мас/об) пептону, 0,7% (об/об) Твін-80. Склад середовища було визначено на основі результатів оптимізації середовища попереднього дослідження. Ферментацію проводили протягом 48 годин при 30 °С та рН 6. Максимальний рівень синтезу ліпази становив 21,34 ОД/мл. Чотири

доступні допоміжні матеріали були перевірені на предмет їх можливого використання при іммобілізації і виявилось, що найбільш підходящим матеріалом для іммобілізації є активоване вугілля з максимальним ступенем іммобілізації 94%.

Дослідження, представлене у роботі [33], було присвячене встановленню можливості збільшення продукції галофільної термоалкалофільної ліпази штамом *Bacillus atrophaeus* FSHM2 внаслідок хімічно індукованого випадкового мутагенезу і оптимізації компонентів культурального середовища.

Максимальний рівень ліпази (14 824,3 ОД/мл) спостерігали при вирощуванні штаму FSHM2 у оптимізованому середовищі, що містило 5% оливкової олії, 0,5% глюкози, 0,5% сахарози, 2% мальтози в якості джерел вуглецю при 60 °С за режиму перемішування 120 об/хв.

Пулуланази

Пулуланаза (ЕС 3.2.1.41) – це фермент, що розгалужує крохмаль та специфічно каталізує гідроліз α -1,6-зв'язків у пулулані та амілопектині. Використання пулуланази у поєднанні з глюкоамілазою або β -амілазою під час оцукрювання дозволяє більш ефективно та швидко проводити реакції перетворення. Пулуланаза зазвичай використовується для виробництва глюкози, фруктози та мальтозного сиропу у харчовій промисловості. Більше того, розвиток біотехнології зробив її більш популярною у фармацевтичній, біоенергетиці та матеріально-технічній промисловості [34].

У дослідженні [34] описано, що шляхом введення гену, кодуєчого пулулاناзи, до геномів штамів *B. subtilis* WB800 та WB600, вдалось підвищити активність пулуланази до значень 30,32 ОД/мл та 18,83 ОД/мл при вирощуванні рекомбінантних штамів *B. subtilis* WB800-РНраII-pul та *B. subtilis* WB600-РНраII-pul, відповідно. Після оптимізації умов культивування (кількість інокуляту, температура інкубування, швидкість струшування та початкове рН) для *B. subtilis* WB800-РНраII-pul активність пулуланази становила 60,85 ОД/мл.

Отримання термостабільної пулулани за проведення періодичної ферментації з підживленням з використанням рекомбінантного штаму *E. coli* BL 21 досліджували автори роботи [35]. Було встановлено вплив трьох стратегій контролю кисню, вплив глюкози, зміни тиску у ферментері та подачі повітря, збагаченого киснем, на ріст клітин продуцента та синтез пулулани. Рекомбінантна *Escherichia coli* BL 21 містила кДНК пулулани з термофільного штаму *Thermotoga lettingae* ТМО. Середовище для культивування містило 25 г/л глюкози як субстрату, підживлюючий розчин глюкози мав концентрацію 800 г/л, культивування проводили при 34 °С, за аерації 2 об/об/хв, рН та швидкість перемішування підтримували на рівні 6,9 та 300-1200 об/хв відповідно.

Було виявлено, що здатність переносити кисень збільшується зі збільшенням тиску у ферментері і співвідношенням кисню в повітрі, однак ріст клітин та синтез пулулани стримуються при високому тиску у ферментері. Як субстрат використовували глюкозу у кількості 25 г/л, найбільше значення біомаси та активності пулулани становило 55,1 г/л та 412 ОД/мл відповідно [36].

У дослідженні [36] мальтозний сироп та порошок соєвого шроту були замінені на дешевий кукурудзяний крохмаль та кукурудзяний лікер в якості джерел вуглецю та азоту, що призвело до отримання ферменту з активністю 440 ОД/мл, продуцентом був рекомбінантний штам *B. subtilis* BS001.

Після цього було досліджено можливість культивування *B. subtilis* BS001 у біореакторах об'ємами 50 л та 50 м³. При періодичному культивуванні за внесення 60 г/л кукурудзяного крохмалю та 18 г/л кукурудзяного лікеру, а також температури 37 °С, аерації 1 об/об/хв та швидкості перемішування 500 об/хв за 80 год активність пулулани становила 896 ОД/мл, у той час як при забезпеченні підживлення культури (через перистальтичний насос додавали кукурудзяний крохмаль, щоб підтримувати вміст редуруючих цукрів на рівні приблизно 0,5% під час всього вирощування) активність ферменту досягла 1743 ОД/мл за рахунок регулювання розчиненого кисню, рН (6,5-7,0), вмісту цукру та температури. При подальшому зберіганні пулулани при кімнатній температурі (25 °С) протягом 6

місяців активність ферменту складала більше 90%, періоди напіврозпаду при 60 та 80 °C становили 119,45 год та 51,18 год відповідно [36].

Целюлази

Біоконверсія лігноцелюлозної біомаси є перспективним внеском у виробництво органічних хімічних речовин. Цукор, отриманий з біомаси, можна легко ферментувати відповідними мікроорганізмами для отримання етанолу та інших промислово цінних хімічних сполук. Відомо, що *Bacillus coagulans* можуть ферментувати лігноцелюлозні гексози та пентози до молочної кислоти, яка знайшла використання у фармацевтичній галузі. Більше 75% органічних хімічних речовин отримують з п'яти основних хімічних речовин: етилену, пропілену, бензолу, толуолу та ксилолу, які використовуються для синтезу інших органічних сполук. Ароматичні сполуки можуть бути отримані з лігніну, тоді як низькомолекулярні аліфатичні сполуки можуть бути отримані з етанолу, отриманого шляхом ферментації цукру, що утворюється в результаті деградації целюлози та геміцелюлози [37].

Ванілін використовується як проміжний продукт у хімічній та фармацевтичній промисловості для виробництва гербіцидів, піноутворювачів або препаратів, таких як папаверин, L-допа та протимікробний агент триметоприм. Геміцелюлози становлять особливий промисловий інтерес, оскільки вони є легкодоступним джерелом ксилози, з якої можна отримувати ксиліт і фурфурол. Ксилоза, отримана з відходів пальм, може бути використана для виробництва ксиліту. Ксиліт має одонтологічне застосування, таке як зміцнення зубів, ремінералізація, в якості антимікробного агента, а також він входить до складу жувальної гумки та зубної пасти.

Для виробництва ксиліту з геміцелюлози за допомогою мікроорганізмів або їх ферментів були досліджені різні методи біоконверсії. Глутамінова кислота, отримана з гідролізату пальмових відходів шляхом ферментації характеризується

високим виходом, у порівнянні з кількістю глютамінової кислоти, отриманої з чистої глюкози в якості джерела вуглецю [37].

Целюлази складаються з трьох основних компонентів — ендоглюканази, екзоглюканази та β -глюкозидази, які діють синергетично, перетворюючи целюлозний комплекс біомаси в глюкозу. Крім того, ксиланаза відіграє важливу роль у перетворенні геміцелюлозного компонента біомаси в ксилозу. Для ефективного перетворення целюлозної та геміцелюлозної біомаси в цукри, що піддаються ферментації, потрібна велика доза ферменту на одиницю сировини. Висока ринкова ціна целюлази та геміцелюлази зумовлює високу вартість процесу перетворення целюлози в етанол. Тому перспективною є розробка різних альтернативних стратегій, серед яких виробництво целюлолітичних ферментів з використанням мікроорганізмів, підвищення ефективності целюлаз та пошук нових целюлаз, які володіють стабільністю в екстремальних умовах. Промислове застосування вимагає високої стабільності цих ферментів при екстремальних значеннях рН, високих температурах і в присутності різних інгібіторів, включаючи органічні розчинники та високу концентрацію NaCl [38].

Серед наукових напрацювань вітчизняних вчених можна виділити статтю [39], присвячену дослідженню целюлозолітичної активності гриба *Chaetomium cochliodes* 3250. Показано, що *C. cochliodes* 3250 синтезує комплекс целюлаз — ферментів деградації клітинної стінки. Найвищі показники ендо-, екзоглюкозидазної та β -глюкозидазної активності гриб проявляв на 9-у добу при рН 7,0 за поверхневого культивування на синтетичному середовищі Чапека у пробірках за температури 26 °C – $0,67 \pm 0,03$ ОД/мл.

Упродовж останніх років дослідженню біосинтезу целюлозолітичних ферментів були присвячені і роботи закордонних науковців. Так, Zhang зі співавторами у роботі [40] представили здатність штаму *Streptomyces griseorubens* JSD-1 до синтезу целюлази та ксиланази при забезпеченні контролю рН та розчиненого кисню на оптимальному рівні. Протягом перших 48 годин рН встановлювали на рівні 8,0 для підтримки високого росту клітин, ще через 48

годин знизили до значення 7,5 для покращення утворення целюлази та ксиланази. Культивування штаму JSD-1 проводили у середовищі з рисовою соломою та пшеничними висівками (20 та 10 г/л відповідно).

Завдяки даному підходу максимальна активність целюлази та ксиланази зросла на 47,9 та 29,5% відповідно, порівняно зі значеннями, отриманими при вирощуванні продуцента без контролю рН. Максимальний рівень активності целюлази та ксиланази досягав $114,38 \pm 0,96$ ОД/мл та $330,57 \pm 2,54$ ОД/мл при рН 7,5 та концентрації розчиненого кисню 50%, що було вище, ніж при забезпеченні нейтрального значення рН без контролю значень розчиненого кисню [40].

Іншими дослідниками було встановлено можливість штаму *Aspergillus fumigatus* N2, виділеного з гниючої деревини, до синтезу позаклітинних ферментів – целюлази та ксиланази [41]. Так, найвищу активність ксиланази (91,9 ОД/мл) і целюлази (5,61 ОД/мл) спостерігали за культивування *A. fumigatus* N2 у середовищі з 1% ячмінної соломи. Целюлаза виявляла максимальну активність при рН 4,0 і температури 65 °С.

У статті [42] описано оптимізацію продукування целюлази штамом *B. subtilis* subsp. *subtilis* JJBS300, внаслідок чого отримали фермент, активність якого становила 9,7 ОД/г субстрату, при співвідношенні пшеничних висівок та рисової соломи 1:1 у середовищі культивування продуцента, при співвідношенні субстрату і води 1:3, за температури 35 °С, рН 4,0 протягом 48 год. Частково очищена целюлаза штаму JJBS300 проявляла оптимальну активність при 50 °С та рН 5,0. Серед йонів металів саме Na^+ , Ca^{2+} та Fe^{2+} стимулювали целюлазну активність.

Таким чином, в ході аналізу літературних даних щодо дослідження особливостей мікробного синтезу гідролітичних ферментів закордонними вченими можна підсумувати, що ферменти грибного та бактеріального походження мають широкий спектр переваг – їх використання є економічно вигідним, оскільки за допомогою використання рекомбінантних штамів продуцентів можна отримати цільовий фермент з високою активністю, зважаючи

на це, вони є придатними для застосування у різних галузях промисловості, в тому числі і фармацевтичній.

Підсумовані дані про особливості синтезу гідролітичних ферментів бактеріальними та грибними штамами представлено у вигляді таблиці 1.1.

Узагальнені дані щодо досліджень особливостей мікробного синтезу гідролітичних ферментів закордонними вченими

Продуцент	Джерело вуглецю, концентрація	Активність ферменту, ОД/мл	Література
Амілаза			
<i>Bacillus subtilis</i> (штам не вказано)	Крохмаль, 5 г/л	25	[2]
<i>Bacillus subtilis</i> 168 mut-16#	Крохмаль, 10 г/л	591,4	[9]
<i>Bacillus subtilis</i> RM16	Крохмаль, 1% (об'ємна частка)	350	[10]
<i>Bacillus</i> sp. WangLB	Крохмаль, 20 г/л	26670 ± 1390	[11]
<i>Bacillus subtilis</i> B2	Глюкоза, 5% (об'ємна частка)	310,56 ± 1,6	[12]
<i>Bacillus aryabhatai</i> КІТ ВЕ-1	Крохмаль, 10,25 % (об'ємна частка)	4,16	[13]
<i>Bacillus subtilis</i> WS9	Соевий пептон та дріжджовий екстракт (2:1) концентрацією 100 г/л, 500 г/л глюкози у вигляді підживлюючого (0,5 г/л)	3806,7	[14]
<i>Aspergillus japonicus</i> (штам не вказано)	Крохмаль, 1% (об'ємна частка)	308,01	[15]
<i>Aspergillus niger</i> van Tieghem	Солодовий екстракт, 51,82 г/л Пюре з картопляних відходів, 50 г/л	274,4	[16]
<i>Bispora</i> sp. MEY-1 / <i>Pichia pastoris</i> GS115	Конжакове борошно, 5 г/л Пшеничні висівки, 30 г/л	34,1	[17]
<i>Aspergillus niger</i> JJS-01	Крохмаль, 30 г/л	11000	[18]
	Мальтоза, 600 г/л		
β-Галактозидаза			
<i>Aspergillus oryzae</i> / <i>Pichia pastoris</i> SMD1168H	Глюкоза та гліцерин (3:1), 40 г/л	4239,07	[20]
<i>Guehomyces pullulans</i> 17-1	Порошок сироватки, 40 г/л	48,1	[21]
Інуліназа			
<i>Penicillium subrubescens</i> sp. nov. (CBS 132785T = FBCC 1632T)	Порошок топінамбура, інулін, 19%	7,7	[25]

Продовження таблиці 1.1

<i>Zygosaccharomyces bailii</i> Talf1	Сік топінамбура, 25% (об'ємна частка)	8,67	[26]
<i>Rhizopus microsporus</i> 13aIV	Інулін, 10 г/л	10,71	[27]
Ліпаза			
<i>Pseudomonas</i> spp.	Гірчична олія, 5 % (об'ємна частка)	Специфічна активність 0,276 $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$	[30]
<i>Candida viswanathii</i> (штам не наведено)	Оливкова олія, 1,5 % (об'ємна частка)	101,1	[31]
<i>Candida cylindracea</i> ATCC 14830	Стоки пальмової олійної фабрики (POME), 1% (об'ємна частка)	21,34	[32]
<i>Bacillus atrophaeus</i> FSHM2	Оливкова олія, 5%; глюкоза, 0,5%; сахароза, 0,5%; мальтоза, 2% (об'ємна частка)	14 824,3	[33]
Пулулаза			
<i>Escherichia coli</i> BL 21 / <i>Thermotoga lettingae</i> TMO	Глюкоза, 25 г/л / 800 г/л	412	[35]
<i>Bacillus subtilis</i> BS001	Кукурудзяний крохмаль, 60 г/л (підживлення із забезпеченням вмісту редуруючих цукрів 0,5%)	1743	[36]
Целюлаза			
<i>Streptomyces griseorubens</i> JSD-1	Рисова солома та пшеничні висівки, 20 та 10 г/л відповідно	114,38 ± 0,96	[38]
<i>Aspergillus fumigatus</i> N2	Ячмінна солома, 1% (об'ємна частка)	5,61	[41]
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> JJBS300	Пшеничні висівки та рисова солома, співвідношення 1:1	9,7	[42]

Проаналізувавши наявну інформацію, узагальнену в таблиці 1.1 з різних літературних джерел можна підсумувати, що найбільш популярним субстратом для одержання гідролітичних ферментів, зокрема амілаз, є крохмаль.

Найбільш перспективними субстратами для виробництва галактозидаз та пулулаз є речовини вуглеводневої природи (зокрема, глюкоза), для виробництва інуліназ використовують рослинні порошки та соки, у свою чергу, ліпази культивують на олійних субстратах, а у середовищі для одержання целюлаз наявна солома та висівки.

1.2. Особливості практичного використання гідролітичних ферментів мікробного походження у фармацевтичній промисловості

На сучасному ринку представлено велику кількість ферментних препаратів для фармацевтичного застосування, зокрема для лікування панкреатиту. Так, усі ферментні препарати для лікування панкреатиту можна умовно розділити на 2 великі групи: ті, що містять тільки панкреатин у чистому вигляді, і ті, до складу яких входить панкреатин + компоненти жовчі + геміцелюлаза. Панкреатин містить 3 ферменти: ліпазу, протеазу та амілазу. Ліпаза бере участь у гідролізі емульгованого жовцю нейтрального жиру, переважно у дванадцятипалій кишці, так як під час потрапляння ліпази в тонку кишку її активність різко знижується [43].

Включення амілаз та ліпаз до складу панкреатичних ферментних препаратів

Одним з важливих факторів, що визначають успіх лікування порушень травлення, є правильний вибір ферментного препарату, його дози і тривалості лікування. При виборі препарату враховують характер захворювання і механізми, що лежать в основі порушення травлення. Вкрай важливо враховувати, що доза ферментних препаратів залежить від ступеня панкреатичної недостатності і вмісту в препараті ліпази [44].

Відомо, що одним із найпоширеніших ферментних комплексів є панкреатин. Він містить травні ферменти підшлункової залози: ліпазу, амілазу та протеазу. Фізіологічною характеристикою панкреатину є його активність у лужному середовищі тонкої кишки. Цей фермент не може бути доставлений за допомогою звичайної твердої пероральної лікарської форми (таблетки чи капсули), оскільки такі таблетки й капсули вивільняють діючу речовину в кислому середовищі шлунка, що призводить до її інактивації [45].

Панкреатичний сік має різко лужне значення рН ($\geq 7,5-8,0$). До його складу входять ферментні (ферменти та проферменти) й мінеральні компоненти. Амілолітична активність панкреатичного соку забезпечується α -амілазою, дія

котрої подібна до такої α -амілази слини. Панкреатична α -амілаза розщеплює крохмаль і глікоген. Панкреатична ліпаза сприяє розщепленню тригліцеридів на гліцерин і вищі жирні кислоти. Цей фермент відіграє найважливішу роль у процесі перетравлення жирів.

Вищеописані властивості панкреатичних ферментів дають змогу зрозуміти, наскільки високоспецифічною має бути лікарська форма, щоб забезпечити ефективну дію всіх компонентів ферментного комплексу. Прикладом сучасного підходу до терапевтичного застосування панкреатину при низці захворювань шлунково-кишкового тракту (хронічному панкреатиті, муковісцидозі, звуженні протоки підшлункової залози, станах, зумовлених повною чи частковою резекцією підшлункової залози) є препарат Мезим® капсули, виготовлений за технологією інкапсульованих мінітаблеток Eurand Minitabs®.

Препарат Мезим® капсули створений на основі сучасної технології Eurand Minitabs®, яка забезпечує вищу фармакологічну доступність панкреатину порівняно зі стандартними твердими пероральними лікарськими формами, такими як таблетки чи капсули, заповнені гранулами. Закономірним наслідком застосування технології Eurand Minitabs® є підвищення біологічної активності панкреатину.

Мезим® капсули представлені лікарською формою, що поєднує властивості капсул і таблеток. При цьому мінітаблетки, якими заповнені капсули, стійкі до дії кислого середовища шлунка. Зазначають, що використання комплексу панкреатичних ферментів у вигляді мінітаблеток, які заповнюють тверді капсули, є ефективнішим, аніж застосування стандартних таблеток. Мінітаблетки дають можливість уникнути передчасного вивільнення активної речовини в шлунково-кишковому тракті, що має місце при використанні класичних таблетованих форм. Покриття мінітаблеток на основі кополімеру метакрилової кислоти стійке до шлункового секрету, стабілізує панкреатичний комплекс і перешкоджає його інактивації [45].

Разом з тим встановлено, що клінічною метою проведення замісної терапії препаратами панкреатичної ліпази є покращення якості життя пацієнтів за рахунок усунення мальабсорбції макро- та мікронутрієнтів, зменшення або ліквідації абдомінальних проявів мальдигестії [46].

Суттєву роль для реалізації зазначених клінічних та фармакокінетичних завдань відіграє вибір препарату панкреатичної ліпази з широкого арсеналу ферментних препаратів, що різняться за своїм ензимним складом, формулою концентрацій та покриттям.

У теперішній час на зміну порошкам та таблеткам прийшли більш сучасні форми випуску препаратів (мікротаблетки, гранули, мікросфери, драже), використовуються оболонки і капсули, що захищають панкреатичні ферменти від руйнування агресивними компонентами шлункового соку. Поряд з цим на фармацевтичному ринку залишаються й препарати, що не мають захисної оболонки. Так, до переліку препаратів панкреатичної ліпази, що рекомендовані для використання Управлінням з контролю за харчовими продуктами і лікарськими засобами США (Food and Drug Administration — FDA), входить препарат Viokase, що не має ентеросолюбільного покриття [46].

Наявність кислотостійкої захисної оболонки дозволяє зберегти активність ферментів на більш високому рівні та збільшити їх концентрацію в кишечнику, а випуск препарату у вигляді мікросфер, гранул і мікротаблеток — забезпечити гомогенне змішування харчової маси та ферменту. Більшість препаратів у ентеросолюбільній оболонці мають досить високі дози активних компонентів (10 000–25 000 ОД ліпази). Переваги препаратів панкреатину в кислотостійкій оболонці надзвичайно важливі для лікування вираженої панкреатичної недостатності у пацієнтів із хронічним панкреатитом, муковісцидозом, при станах після резекції підшлункової залози, онкологічних захворюваннях.

Група сучасних ферментних препаратів без ентеросолюбільної оболонки (Cota-zym, Kuzym, Viokase, Mezym forte) також має певні переваги – зокрема, раннє вивільнення активних компонентів препарату, що дозволяє

медикаментозному засобу розпочати діяти вже в проксимальних відділах кишечника. В Україні панкреатична ліпаза без ентросолюбильної оболонки представлена препаратом Мезим форте з відносно невисоким вмістом ліпази (3500 ОД), що дає можливість призначати його дорослим та дітям різного віку із відносною панкреатичною недостатністю і максимально індивідуалізувати дозу і кратність прийому без ризику розвитку побічних ефектів [46].

Загалом на фармацевтичному ринку України зареєстровано та реалізується декілька препаратів панкреатину вітчизняного виробництва з меншою ферментативною активністю, аніж у лікарському засобі ПАНКРЕАТИН 8000. До них належать ПАНКРЕАТИН, ПАНКРЕАТИН ДЛЯ ДІТЕЙ та ПАНКРЕАТИН ФОРТЕ виробництва ПАТ «Вітаміни», а також ПАНКРЕАТИН-ЗДОРОВ'Я, виробництва ТОВ «Фармацевтична компанія «Здоров'я» [44].

Однак є відомості, що японська фірма «Тойокодьо» запатентувала спосіб очищення ліпаз із використанням сорбентів у вигляді солей вищих жирних кислот, з подальшим формуванням їх у вигляді таких лікарських форм як гранули або мікрокапсули. Фермент сорбується в них, а потім елююється поверхнево-активною речовиною (ПАР). Такий спосіб дає можливість одержувати високоочищені препарати з активністю до 90—95 % від вихідної. Як відомо, ліпази випускаються у вигляді комплексних препаратів, що містять, окрім ліпази, протеазу, амілазу, іноді целюлазу і пектиназу. Препарати, що мають ліполітичну активність, широко випускаються закордоном – в США (фірми Enzyme Development Corp., Equichem International Inc., Chr. Hansen, Wright Group The, Aalto Scientific, “Miles Chemical”, “Rohm&Haas”), Японії (“Amano Enzyme” Co. Ltd., “Meito”, “Sangyc”, “Nagase”), Нідерландах (Clea Technologies B.V., “Gist Brocades”), Франції (“Rapidase”), Індії (Advanced enzymes), Аргентині (Ran Industrias Quimica), Данії (“Novozymes”), Фінляндії (“FINNFEEDS OY”), Китаї (“Sekisui Enzymes”) [30].

Отже, проаналізувавши літературні дані щодо особливостей введення амілаз та ліпаз до складу панкреатичних ферментних препаратів можна зробити

висновок, що функціонування вітчизняного виробництва у даному напрямку є досить продуктивним та динамічним, незважаючи на широкий випуск амілолітичних та ліполітичних препаратів закордонного походження.

Виробництво пробіотичних препаратів на основі β -галактозидази

Мікроорганізми, які здатні використовувати лактозу в якості єдиного джерела вуглецю та енергії є продуцентами β -галактозидази. Є дані про те, що із молочнокислих стрептококів найбільшим лактазозброджувальним потенціалом володіють термофільні молочнокислі стрептококи. Фермент β -галактозидаза, який виробляють *Streptococcus thermophilus* більш активно гідролізує лактозу молока, проявляючи при цьому високу активність та стабільність. Масова частка лактози, що розщеплюється *S. thermophilus*, складає 0,8-1,2 %. Залишковий вміст лактози в кисломолочних продуктах, отриманих ферментацією вказаних культур становить 3,6–3,9% [47].

Штам *Lactobacillus acidophilus* є сильним кислотоутворювачем, при ферментації молока він розщеплює 0,9–1,0% лактози, утворюючи L(+) або D/L-ізомери молочної кислоти. Тобто доцільним є культивування біфідобактерій разом з молочнокислими культурами *L. acidophilus*, які стимулюють ріст молочнокислих бактерій різних видів та підвищують їх β -галактозидазну активність [47].

Так, описано ферментативний спосіб використання штамів, що володіють β -галактозидазною активністю, та їх композицій в якості основи заквашувальних культур. Перш за все, проводили підбір культур лакто-, біфідо-, пропіоновокислих бактерій, які були б підходящими для створення композицій з високою β -галактозидазною активністю. В результаті було показано, що перспективним виявилось використання композиції на основі штамів *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, *B. longum*, *B. adolescentis* та *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *schermanii*. Автори зазначили, що внаслідок використання даних мікроорганізмів можливим є отримання кисломолочних

пробіотичних продуктів зі зниженим вмістом лактози, що обумовлено β -галактозидажною активністю використаних мікроорганізмів [48].

Разом з тим, було показано, що доцільним є додаткове внесення ферментних препаратів β -галактозидази при виробництві препаратів пробіотичного спрямування, оскільки використання лише культур мікроорганізмів, що володіють β -галактозидажною активністю, може бути недостатнім. Так було встановлено, що застосування препаратів β -галактозидази сприяє здійсненню гідролізу лактози до показників 0,1 - 0,01%, які є регламентованими значеннями. Даний метод застосовується з метою одержання безлактозних ферментованих молочних продуктів.

Також є відомості про отримання біфідовмісного пробіотичного йогурту з низьким вмістом лактози. Основу йогурту склали змішані культури пробіотичних бактерій *B. bifidum*, *B. longum* та *B. adolescentis*, адаптованих до молока, в отриману гідролізовану нормалізовану гомогенізовану суміш додатково вносили фермент β -галактозидазу. Дослідники повідомили, що використання такого підзоду забезпечувало пробіотичні функціональні властивості отриманого низьколактозного продукту [49].

Згідно патенту [50], вітчизняними дослідниками було розроблено продукт кисломолочний низьколактозний, виробництво якого передбачає внесення ферментного препарату β -галактозидази. Технологія отримання даного продукту включає нормалізацію, пастеризацію нормалізованої суміші, охолодження, внесення ферментного препарату β -галактозидази та гідроліз лактози, підігрів та гомогенізацію гідролізованої суміші, внесення заквашувального препарату та подальше сквашування. Причому нормалізацію за вмістом сухих речовин у межах від 15 до 19 % проводили білково-вуглеводною молочною сировиною, після охолодження здійснювали внесення ферментного препарату β -галактозидази для досягнення ступеня гідролізу лактози 85-90 %, після чого гідролізовану суміш сквашували заквашувальним препаратом на основі культур виду *S. thermophilus*. Автори патенту зазначили, що поєднання ферментативного гідролізу лактози

препаратом β -галактозидази з подальшим сквашуванням дозволило отримати кінцевий продукт з масовою часткою лактози менше 1 %.

Також відомий метод одержання пробіотичного йогурту діабетичного призначення за додаткового включення до його складу ферментного препарату β -галактозидази [51]. Технологія передбачає використання вторинної молочної сировини як основи, до складу якої було додано ферментний препарат β -галактозидази, харчові волокна, концентрат сироваткових білків, біологічно активна добавка «Селен Активний», вітаміни E і C, 10%-вий спиртовий екстракт шипшини та суміш молочних вершків, соєвої і оливкової олій. У виробництві застосовували симбіотичну закваску – пробіотичні культури біфідобактерій *B. bifidum*, *B. longum*, *B. breve* та лактобактерії *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, співвідношення біфідо- та лактобактерій становило 1:10.

Крім цього, науково обґрунтовано раціональні співвідношення між чистими культурами *Bifidobacterium* у складі заквашувальних композицій зі змішаних культур біфідобактерій, впроваджених у виробництво: композиція 1 містила *B. bifidum* + *B. longum* + *B. breve* (у співвідношенні 1:1:10), а композиція 2 – *B. bifidum* + *B. longum* + *B. adolescentis* (у аналогічному співвідношенні). Показано, що використання чистих культур *B. animalis* Bb-12 забезпечує отримання біфідовмісних молочних продуктів функціонального призначення з помірним рівнем кислотності. Спільне використання ферментних препаратів β -галактозидази та заквашувальних композицій з використанням біфідобактерій дозволяє одержати низьколактозні біфідовмісні ферментовані молочні продукти, в тому числі діабетичного та геродієтичного призначення [52].

Також є відомості, що активізація росту біфідобактерій в молоці шляхом внесення ферменту β -галактозидази, або за рахунок високої β -галактозидазної активності інших заквашувальних культур, пов'язана з підвищенням власної β -галактозидазної активності біфідобактерій. За таких умов біфідобактерії набувають здатність вилучати з лактози необхідну для свого розвитку глюкозу. У зв'язку з цим доцільно культивувати біфідобактерії в молочному середовищі

разом з *S. thermophilus*, який відрізняється високою β -галактозидазною активністю.

Крім того, моноцукри (глюкоза та галактоза), які утворюються під час розщеплення ферментом виконують не тільки функцію біфідогенних факторів, але й підвищують солодкість продукту, що виключає необхідність використання замінників цукру, які негативно впливають на мікрофлору кишківника. Використання різних моноцукрів біфідобактеріями може сприяти розробці нових симбіотичних препаратів та нових культурних середовищ для біфідобактерій.

На основі проведених досліджень для виробництва простокваші діабетичного призначення рекомендовано використання заквасочних композицій на основі штаму *S. thermophilus*, який входить в склад Liobac ST; для виробництва кефіру діабетичного призначення – заквасочні композиції з використанням Liobac Kefir 22; для виробництва ацидофіліну діабетичного призначення – комплекс Liobac BIFI + Liobac Lacid + фруктоза; для виробництва йогурту діабетичного призначення – комплекси FD DVS Yo Flex + FD DVS Bb 12 + β -галактозидаза і Liobac Yo Yo + Liobac BIFI + β -галактозидаза.

Здатність лактококів до ферментації лактози є нестабільною властивістю, оскільки кодується плазмідною, через що можуть виникнути варіанти, неспроможні до утилізації цього вуглеводу. Застосування методу трансдукції дозволило ввести лактозний ген в хромосому і створити стабільний лактозоферментуючий фенотип штаму *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, а D.J.Anderson & L.L.Mc Kay одержали штам лактококу з великою кількістю копій lac-гену в плазмідах, що дозволило підвищити β -галактозидазну активність вдвічі без впливу на основний метаболізм мікроорганізму. Це дозволило авторам припустити, що лактококи можуть бути оптимізовані за утилізацією лактози, і що швидкість гідролізу лактози істотно не впливає на кислотоутворення.

Також співробітниками відділу молочних продуктів та дитячого харчування Інституту продовольчих ресурсів проводились дослідження щодо розроблення технологій гідролізованих молочних продуктів з використанням різних видів

(дріжджового та грибного походження) ферментних препаратів β -галактозидази у виробництві сироватки молочної гідролізованої згущеної, напоїв на основі сироватки молочної гідролізованої, молока гідролізованого згущеного та продукту кисломолочного низьколактозного [52].

У зв'язку з вищенаведеною інформацією, слід підсумувати, що використання препаратів β -галактозидази дозволяє отримати пробіотичні препарати функціонального призначення із заданими властивостями. Так, використання такого підходу зумовлює одержання продуктів для забезпечення потреб різних вікових груп населення, враховуючи особливості їх призначення. Також варто звернути увагу на те, що дослідження та практичне впровадження препаратів β -галактозидази до складу пробіотичних продуктів набуває широкого поширення саме завдяки діяльності вітчизняних вчених.

Роль целюлаз у складі препаратів для поліпшення травлення

Як правило, ферментні препарати целюлаз широко застосовуються у тваринництві. Встановлено, що до 30–40% поживних речовин корму не засвоюється тваринами, а проходить транзитом через травний тракт. Особливо це відноситься до тварин молочного періоду, у яких слабо розвинена травна система. Натомість, сучасні стратегії годівлі включають використання ензимів, дія яких направлена на підвищення доступності важкогідролізованих компонентів кормів [53].

Целюлозолітичні ензими продукуються багатьма бактеріями та грибами, лише незначна їх кількість синтезують високі рівні клітинної целюлази, яка здатна до гідролізу целюлози. Ензиматична деструкція целюлози, що використовується у тваринництві найбільш характерна для грибних целюлаз.

Целюлозолітичні ензими сумісні з іншими біологічно активними речовинами, мінерально-вітамінними компонентами комбикормів та преміксів. Целюлаза представлена трьома типами ензимів ендоглюконаза, целобіогідролаза, целобіоза. На даний час целюлазу випускають наступною з активністю: 200 од/г, 1000 од/г, 2000 од/г, 10000 од/г.

На сьогоднішній день ринок целюлаз досить стабільний. Головними представниками на ньому залишаються такі компанії, як Novozymes, Danisco, Genzyme, Roche, Allergen, DSM і BASF. Компанія Novozymes контролює 46,0 % ринку ензимних препаратів, з яких, за даними дослідницького агентства Freedonia Group, більше 26,0 % припадає на ензими для харчової промисловості гідролізної дії. Інша частина (36,0 %) поділена між Danisco, Genzyme, Roche, Allergen, DSMi, BASF.

На сьогодні в Україні єдиним великим біотехнологічним підприємством залишається Ладижинський завод біо- та ензимних препаратів «Ензим». На сьогодні Ензим випускає до 6000 товарних тон продукції на рік, яка спеціалізується на виробництві технічних ензимних препаратів. Також діють кілька дрібних виробників ТОВ «Дніпровська асоціація-К» м. Київ, інші заводи виробники медичного призначення, ПАТ «Вітаміни», ПрАТ «Біофарма», ВАТ «Дніпрофарм».

Препарати, що мають одночасно декілька ензимних активностей, називаються мультиензимними композиціями (МЕК): ладозим респект, ладозим прокси, проторизин, ксилолад, альфагалавізим, вільзим, ендوفід, пуриветин, МЕК-СГ-1, МЕК-СГ-2 тощо [53].

Разом з тим, целюлази знайшли використання і у складі ферментних препаратів для покращення травлення людини.

Основними показаннями до застосування лікарських препаратів травних ферментів є: хронічний панкреатит із зовнішньосекреторною недостатністю; панкреатомія, рак підшлункової залози, захворювання печінки та жовчних шляхів, резекція шлунка, тонкої кишки, хронічний ентерит, гастрит з секреторною недостатністю, літній вік, похибки в дієті при прийомі жирної, незвичної або важко перетравлюваної їжі та ін. Відомо, що для лікування цих захворювань застосовується панкреатин, який компенсує дефіцит ферментів підшлункової залози, містить екскреторні панкреатичні ферменти [54].

Відомо, що крім панкреатину до складу деяких лікарських засобів, таких як Абомін, Дігестал, Іпентал, Тагестал, Фестал та Ензістал додатково містять целюлазу та геміцелюлазу, які сприяють розщепленню рослинної клітковини. Однак присутність тільки целюлазу у лікарських засобах не може забезпечити повне перетравлення рослинної їжі, тому такі препарати є комплексними [54].

Наявність геміцелюлази у складі таких ферментних препаратів як Дигестал, Кадистал, Фестал, Котазим-Форте, Мензим, Панстал, Рустал, Ензістал, Флатон сприяє зменшенню диспепсії, відчуття тяжкості в правому підребер'ї, покращенню евакуації хімусу з верхніх відділів травного тракту, ліквідації запорів, дуоденостазу, метеоризму [55]. Порівняння складу даних ферментних препаратів представлено у таблиці 1.2.

Таблиця 1.2

**Порівняльний склад ферментних препаратів, що містять
геміцелюлазу [55]**

Назва препарату	Форма випуску	Ліпаза (Од FIP)	Протеази (Од FIP)	Амілаза (Од FIP)	Жовч (г)	Геміцелюлаза (г)	Інші компоненти
Дигестал	Драже	6 000	300	5 000	0,025	0,05	-
Кадистал	Драже	6 000	300	4 500	0,025	0,05	-
Фестал	Драже	6 000	300	4 500	0,025	0,05	-
Мензим	Драже	3 600	300	4 500	0,025	0,05	-
Ензістал	Таблетки	6 000	300	4 500	0,025	0,05	-
Панзістал	Таблетки	6 000	300	5 000	0,025	0,05	-
Флатон	Драже	1 050	210	3 150	0,025	0,05	Симетикон (50 мг)

При порівнянні вищезазначених препаратів можна сказати, що більшість засобів містять ліпазу з протеазою та амілазою у співвідношенні 6:0,3:4,5, але у деяких препаратах співвідношення може дещо різнитись, допоміжні компоненти також відрізняються. Геміцелюлаза використовується у всіх препаратах в кількості 0,05 г, її функція полягає у покращенні перетравлення в цілому,

усуненню таких несприятливих відчуттів як тяжкість, корекції різноманітних проявів неправильного процесу травлення.

Зокрема «Фестал» є одним із популярних препаратів із групи ферментів, що призначаються при проблемах із травленням. Даний лікарський засіб здатний заповнити ферментні сполуки, які у нормі продукує підшлункова залоза. Необхідність приймати Фестал може виникнути у будь-якої людини, у тому числі і при вагітності. Проте застосування даного препарату під час вагітності без припису лікаря не рекомендується. «Фестал» – це один із продуктів популярної фармацевтичної компанії Sanofi. Він виготовляється у формі драже [56].

Дія даного препарату обумовлена декількома активними речовинами. Насамперед це панкреатин, представлений у кожному драже у дозуванні 192 мг. Він включає травні ферменти – ліпазу та амілазу, а також протеази, іншими діючими інгредієнтами драже виступають компоненти жовчі та геміцелюлази. Що стосується геміцелюлази, то даний фермент допомагає розщеплювати клітковину в рослинній їжі, тому включення такої речовини до складу «Фесталу» сприяє покращенню травлення та зменшенню здуття кишечника внаслідок споживання надлишку харчових волокон [56].

Таким чином, зважаючи на літературні дані, варто підкреслити, що роль амілаз у складі ферментних препаратів є значною, оскільки присутність даних ензимів дозволяє удосконалити дію лікарських препаратів. Терапевтична функція амілаз відіграє провідну роль у складі препаратів для покращення травлення, оскільки амілаза розщеплює полісахариди, не проявляючи при цьому негативного впливу на функцію шлунка, печінки, моторику біліарної системи та кишечника.

Тому актуальним є скринінг перспективних продуцентів гідролаз, зокрема амілаз. Далі розглянемо детальніше аналіз інформації щодо продуцентів амілаз, які мають як бактеріальне, так і дріжджове походження.

1.3. Аналіз перспективних біологічних агентів для синтезу амілази

α -Амілази (Е.С. 3.2.1.1) – сімейство гідролітичних ферментів, розщеплюючих крохмаль до простих цукрів. Дані ферменти часто виявляють у мікроорганізмів, тому останні стали розповсюдженим біотехнологічним джерелом амілаз для промисловості, клінічної практики та наукових досліджень. Ген α -амілази (*amy*) достатньо повно охарактеризовано, оскільки даний ген було неодноразово клоновано та експресовано в *E. coli* та *B. subtilis*. Пошук нових продуцентів амілаз являє собою селекцію амілолітично активних представників серед повторно виділених або мутантних штамів мікроорганізмів. Постгеномна ера розвитку науки дозволяє передбачити ферментативну активність нових ізолятів без трудоємнісного скринінгу класичними методами мікробіології. Тим не менше, присутність гену амілази не завжди означає його високу експресію внаслідок різних механізмів регуляції активності генів [57].

Виділення потенційних бактеріальних чи грибкових штамів-продуцентів амілази, що володіють високою ефективністю, є важливим етапом перед перевіркою на їх здатність до синтезу амілолітичних ферментів. Мікроорганізми поширені всюди і їх можна виділити з будь-якого природного джерела. Однак найефективніші штами зазвичай отримують із багатих на субстрат середовищ. Поширеним методом виділення штамів є метод серійних розведень, внаслідок чого кількість колоній продуцента амілази мінімізується, внаслідок цього полегшується виділення чистої культури. Інший метод полягає у виділенні ефективних високопродуктивних штамів відповідно до їх спорідненості до конкретного субстрату. Згідно літературних даних, за допомогою цих методів було здійснено виділення та дослідження бактеріальних і грибних штамів-продуцентів амілази [58].

Підходи з регулювання активності мікробних амілаз

Мікробні амілази, отримані з бактерій, грибів і дріжджів, використовуються в різних галузях промисловості і в наукових дослідженнях. Рівень синтезу амілази у представників одного роду, виду і навіть штаму може бути різним. Крім того, на

рівень продукування амілази штамом може впливати його походження – наприклад, штами, виділені з середовищ багатих на крохмаль, здатні виробляти більшу кількість ферменту. Такі фактори, як рН, температура, природа джерела вуглецю та азоту також відіграють важливу роль у рівні та швидкості синтезу амілази, особливо це стосується промислових умов виробництва. Ефективним є використання методів генної інженерії, тому завдяки такому підходу можна підвищити рівень утворення амілази. Також використання генно-інженерних штамів дозволяє отримати амілази, що характеризуються термостабільністю та стійкістю до несприятливих умов середовища.

Гідролази, отримані з екстремофільних мікроорганізмів, широко застосовувались в різноманітних біотехнологічних процесах через стійкість до суворих умов, таких як концентрація солі, підвищена температура чи екстремально кисле або лужне значення рН. Зокрема, у роботі [33] було представлення встановлено збільшення продукції галофільної термоалкалофільної гідролази штамом *B. atrophaeus* FSHM2 внаслідок хімічно індукованого випадкового мутагенезу і оптимізації компонентів культурального середовища. Аналогічні маніпуляції можна провести і з продуцентами амілаз.

Переваги застосування бактеріальних продуцентів амілаз

Серед широкого спектру мікробних продуцентів амілази, використання бактерій для отримання даного ферменту є більш дешевим та швидким процесом, у порівнянні з грибними культурами. Крім того, бактеріальні продуценти амілази краще піддаються методам генної інженерії, що дозволяє легше отримувати рекомбінантні ферменти. З метою одержання амілази було виділено та досліджено широкий спектр бактерій. Більшість з них складають представники роду *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. stearothermophilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. coagulans*, *B. polymyxa*, *B. mesentericus*, *B. vulgaris*, *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. halodurans* та *Bacillus* sp. *ferdowsicus*), також існують відомості про синтез амілази представниками інших родів – *Rhodothermus marinus*, *Corynebacterium gigantea*, *Chromohalobacter* sp., *Caldimonas taiwanensis*,

Geobacillus thermoleovorans, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus manihotivorans* та *Pseudomonas stutzeri* [58].

B. subtilis – це грампозитивна бактерія, яка широко використовується у промисловому виробництві, тому дослідження, представлене у роботі [14] передбачало проведення підвищення синтезу α -амілази *P. furiosus* у штамі *B. subtilis* WS9. Було показано, що спільна експресія молекулярного шаперона *P. furiosus* пептидил-проліл цис-транс-ізомерази у режимі геномної інтеграції з використанням системи CRISPR / Cas9 дозволило підвищити продукування цільового ферменту. Враховуючи той факт, що нативна *P. furiosus* α -амілаза синтезується в умовах гіпертермофільного середовища і має високу термостабільність, було проведено термічну обробку інтактною культурою при температурі 90°C протягом 15 хв, що значно збільшило синтез амілази.

Галофіли як перспективні продуценти

Перспективним є використання галофільних штамів для синтезу амілази, які включають види *Haloarcula hispanica*, *Halobacillus* sp., *Chromohalobacter* sp., *Bacillus dipsosauri* та *Halomonas meridiana*. З кожним роком з'являється все більше досліджень, що включають виділення та вдосконалення нових штамів-продуцентів амілолітичних ферментів. Наприклад, Dash et al. визначили новий штам *B. subtilis* BI19, який ефективно продукує амілазу, за оптимізації умов отримання даного ферменту було збільшено рівень синтезу ферменту приблизно у 3,06 рази. Також дослідники зазначають, що тривимірний структурний аналіз таких амілаз сприяє підвищенню їх ефективності. Наприклад, кристалічна структура \square -амілази, синтезованої представником роду *Anoxybacillus* дозволила встановити підклас даного ферменту. Так, дослідження тривимірної структури дозволяє підвищувати ефективність і посилювати функції амілолітичного ферменту на рівні впливу на певні амінокислоти.

Особливості використання продуцентів амілаз грибного походження

У свою чергу, перевагою ферментів грибного походження заключається в тому, що вони секретуються позаклітинно. Окрім цього, здатність грибів

проникати в тверді субстрати полегшує процес гідролізу, оскільки більшість видів грибів піддаються ферментації на твердих поживних середовищах. Перша грибна амілаза для промислового застосування була досліджена та описана кілька десятиріч тому.

До ефективних продуцентів амілази грибного походження відносяться представники роду *Aspergillus* (*A. oryzae*, *A. niger*, *A. awamori*, *A. fumigatus*, *A. kawachii* та *A. flavus*), а також види *Penicillium* (*P. brunneum*, *P. fallutanum*, *P. expansum*, *P. chrysogenum*, *P. roqueforti*, *P. janthinellum*, *P. camemberti* і *P. olsonii*), *Streptomyces rimosus*, *Thermomyces lanuginosus*, *Rychnoporus sanguineus*, *Cryptococcus flavus*, *Thermomonospora curvata* та *Mucor* sp [58].

Таким чином, на вибір біологічного агенту для синтезу амілази впливає ряд чинників, серед яких джерело виділення продуцента, особливості його метаболізму, умови культивування та ін. Внаслідок вищенаведеної інформації можна підсумувати, що найкращими продуцентами амілолітичних ферментів є бактерії, зважаючи на легкість та простоту їх використання в якості біотехнологічних об'єктів, крім того бактеріальні продуценти амілази краще піддаються методам генної інженерії, порівняно з грибами та дріжджами. Зокрема, наразі найпоширенішими та найперспективнішими продуцентами амілаз є представники роду *Bacillus*.

ВИСНОВКИ

1. При дослідженні виробництва амілаз вчені у своїх роботах показали, що використання підживлення у процесі біосинтезу дозволяє одержати високі значення активності ферменту у культуральній рідині і при цьому не інгібувати біологічний агент на початку культивування. Це дозволяє найбільш ефективно асимілювати крохмаль і отримати максимальну кількість амілолітичного комплексу. Отже, актуальним у технологіях одержання амілаз є саме використання технологічного прийому підживлення.

2. Зважаючи на огляд інформації, представленої в літературі, можна сказати, що найбільш перспективними субстратами для виробництва галактозидаз та пулуланаз є речовини вуглеводневої природи (наприклад, глюкоза), для виробництва інуліназ використовують рослинні порошки та соки, у свою чергу, ліпази культивують на олійних субстратах, а у середовищі для одержання целюлаз наявна солома та висівки.

3. Найперспективнішими для виробництва з точки зору застосування у фармацевтиці, а саме у виробництві фармацевтичних лікарських засобів ферментного походження є амілолітичні ферменти. Серед них найпопулярнішими є препарати для подолання проблем травлення.

4. Більшість лікарських препаратів, які випускаються для подолання проблем травлення, містять амілазу. В результаті аналізу перспективності продуцентів було показано, що найвигіднішими є продуценти родів *Bacillus* та *Aspergillus*.

ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

РОЗДІЛ 2. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВА ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ

2.1. Потреба у цільовому продукті

Згідно з аналізом даних Центру медичної статистики МОЗ України за 2006 - 2013 рр., встановлено, що показник поширеності хвороб підшлункової залози на 100 тис. дорослого населення збільшився в країні на 56,8%; темп приросту був нижче в 2,5 разу і склав 23,1%. Найбільш неблагоприємними за поширеністю хвороб підшлункової залози є м. Київ (4950), Одеська (3930), Дніпропетровська (3718), Вінницька (3487) і Хмельницька (3266) області [59].

Ключове місце серед хвороб підшлункової залози займає хронічний панкреатит. Дозування препарату з амілазою для лікування хронічного панкреатиту базується на індивідуальних потребах хворого і залежить від ступеня порушення травлення та складу їжі. Такі препарати для покращення травлення [60] містять амілазу у кількості 5600 Од відповідно.

При хронічному панкреатиті доза препарату складає 2-4 таблетки, однак наш препарат буде у формі капсул, отже приймаємо усереднену кількість – 3 капсули за день приймає 1 людина [61] при хронічному панкреатиті.

Курс лікування призначають індивідуально, в середньому тривалість прийому препарату з амілазою становить 3-4 тижні, однак можуть бути ускладнення в процесі лікування, тому приймаємо курс прийому 4 тижні (28 днів).

Отже, 1 людина з хронічним панкреатитом в ході курсу лікування 28 днів приймає $3 \times 28 = 84$ капсули.

Приймаємо, що будемо забезпечувати препаратом з амілазою мікробного походження 4950 пацієнтів з м. Київ, тоді за курс лікування кількість капсул для даних пацієнтів становить:

					НУХТ БТЕК 02.02.07 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Харченко О.Г.			Літ.	Арк.	Аркушів 49
Перевір.		Старовойтова С.О.				48	15
Реценз.					Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Затверд.		Стабніков В.П.					

$$4950 \times 84 = 415\,800 \text{ капсул}$$

З урахуванням наявних на ринку конкурентних препаратів приймаємо, що будемо забезпечувати 35% ринку, тоді кількість капсул становить:

$$415\,800 \times 0,35 = 145\,530 \text{ капсул}$$

Якщо в одній капсулі активність амілази становить 5600 Од, то у складі 145 530 капсул міститься:

$$145\,530 \times 5600 = 814\,968\,000 \text{ Од амілази.}$$

Таким чином, потреба в амілазі для лікування 4950 хворих на хронічний панкреатит у м. Києві становить 814 968 000 Од.

2.2. Обґрунтування вибору форми випуску лікарського засобу

Перспективним класом широко застосовуваних нині гідролітичних ферментів є амілази. Застосування амілолітичних ферментних препаратів з кожним роком все більш розширюється. Це пов'язано з нестачею енерго- та біоресурсів, а також екологічними проблемами. У зв'язку з цим можна виділити саме застосування амілолітичних ферментних препаратів у фармацевтичній промисловості та медицині. Зважаючи на наявність амілаз у складі ферментних препаратів, у медицині амілази використовують для регуляції та усунення гіпоферментозів шлунково-кишкового тракту, лікування слизової оболонки кишечника, шлунка, підшлункової залози, аналітичної діагностики крові та сечі для виявлення невеликих кількостей сечовини, глюкози, сечової кислоти, нуклеотидів, амінокислот. Поліферментні препарати, у складі яких є амілази, використовуються для розсмоктування тромбів у кровоносних судинах, видалення надлишку накопиченого глікогену в тканинах організму [62].

Одним з ключових чинників, що визначають ефективність лікування поряд зі складом і дозуванням ферментів, є форма випуску препарату. Сьогодні відомо, що для збереження активності ферментів у складі даних лікарських засобів необхідно забезпечити їх вивільнення саме в кишечнику, оскільки кислий шлунковий вміст здатний інактивувати їх. Сучасні ферментні препарати

випускаються у вигляді драже або таблеток у кишково-розчинній оболонці, що захищає ферменти від вивільнення в шлунку і руйнування соляною кислотою шлункового соку [63].

Даний проект передбачає використання амілолітичного ферменту, синтезованого штамом *Bacillus* sp. WangLB у середовищі з крохмалем, в складі ферментного препарату для лікування хронічного панкреатиту та інших захворювань, що залучають до патологічного процесу підшлункову залозу.

Отже, розглянемо детальніше які форми випуску ферментних препаратів, що містять амілазу, наявні на ринку.

2.2.1. Обґрунтування форми випуску ЛЗ

Нові відкриття та укорінення їх результатів у сучасних гастроентерологічних рекомендаціях сприяють удосконаленню підходів у сфері фармакотерапії станів та захворювань, пов'язаних із ферментною недостатністю. Соціально відповідальні фармацевтичні компанії усвідомлюють свою ключову роль у створенні умов для надання раціональної фармакотерапії та відмовляються від промоції та продажу препаратів, що з плином часу стають морально застарілими.

Наприклад, компанія «Берлін-Хемі» має у власному продуктовому портфелі препарат МЕЗИМ® ФОРТЕ 10 000 та МЕЗИМ® ФОРТЕ 20 000 у таблетованій формі. Оболонка, яка покриває таблетки, не розчиняється під дією шлункового соку та захищає ферменти від їх інактивації шлунковим соком. Тільки під впливом нейтрального або злегка лужного середовища тонкого кишечника відбувається розчинення оболонки й вивільнення ферментів [63].

Однак, властивості панкреатичних ферментів обумовлюють високоспецифічність лікарської форми задля забезпечення ефективної дії всіх компонентів ферментного комплексу. Прикладом сучасного підходу до терапевтичного застосування панкреатину при низці захворювань шлунково-кишкового тракту (хронічному панкреатиті, муковісцидозі, звуженні протоки підшлункової залози, станах, зумовлених повною чи частковою резекцією

підшлункової залози) є препарат Мезим у формі капсул, виготовлений за технологією інкапсульованих мінітаблеток Eurand Minitabs® [64].

Препарат Мезим® капсули створений на основі сучасної технології Eurand Minitabs®, яка забезпечує вищу фармакологічну доступність панкреатину порівняно зі стандартними твердими пероральними лікарськими формами. Закономірним наслідком застосування такої технології є підвищення біологічної активності панкреатину.

Мезим у формі капсул представлений лікарською формою, що поєднує властивості капсул і таблеток. При цьому мінітаблетки, якими заповнені капсули, стійкі до дії кислого середовища шлунка. Зазначають, що використання комплексу панкреатичних ферментів у вигляді мінітаблеток, які заповнюють тверді капсули, є ефективнішим, аніж застосування стандартних таблеток, оскільки можна усунути передчасне вивільнення активної речовини в шлунково-кишковому тракті, що характерно при використанні класичних таблетованих форм [64].

У теперішній час на зміну порошкам та таблеткам прийшли більш сучасні форми випуску препаратів, як от гранули, мікросфери, драже тощо, а також використовуються оболонки і капсули, що захищають панкреатичні ферменти від руйнування агресивними компонентами шлункового соку. Але поряд з цим на фармацевтичному ринку залишаються й препарати, що не мають захисної оболонки [65].

Також є відомості, що японська фірма «Тойокодьо» запатентувала спосіб очищення ферментів подальшим формуванням їх у вигляді таких лікарських форм як гранули або мікрокапсули. Такий спосіб дає можливість одержувати високоочищені препарати з активністю до 90—95 % від вихідної [66].

Щодо іншого референтного препарату амілази, то «Фестал» є одним із популярних препаратів із групи ферментів, що призначаються при проблемах із травленням. Так, «Фестал» виготовляється у формі драже [67].

Таким чином, наявні на вітчизняному ринку ферментні препарати для лікування захворювань підшлункової залози представлені у формі таблеток, драже, гранул, капсул, мікрокапсул, мінітаблеток у капсулах.

На сьогодні капсульні лікарські форми займають третє місце з-поміж усіх лікарських форм, зареєстрованих в Україні, зокрема їм належить близько 10% номенклатури лікарських засобів, а також друге місце серед твердих лікарських форм [68].

Інтерес до капсул пояснюється їх високою біодоступністю і цілою низкою переваг: привабливий зовнішній вигляд; легко проковтуються; проникні для травних соків; точність дозування; лікувальна дія вмісту виявляється через 5-10 хв після введення; оболонка капсул непроникна для летких рідин, газів, кисню повітря (що дуже важливо для зберігання засобів, які легко окиснюються); вміщення в оболонку зручне для відпуску речовин, що мають фарбувальний ефект або неприємний смак і запах, оскільки її руйнування та вивільнення діючих речовин відбувається в певному відділі травного тракту, що обумовлює високу стійкість та стабільність капсул [69].

Тому запропоновано випускати препарат амілолітичного ферменту, синтезованого штамом *Bacillus* sp. WangLB у середовищі з крохмалем, для лікування хронічного панкреатиту та інших захворювань підшлункової залози у формі капсул.

2.2.2. Обґрунтування вибору первинної і вторинної упаковки ЛЗ

Тверді лікарські форми складають приблизно 70% від загального випуску готових лікарських засобів. Тверді лікарські форми пакують в саму різноманітну тару, в тому числі в паперову (конвалют), скляну (банки і флакони), металеву та ін. Найбільш перспективною вважається контурно-чарункове пакування (блістери) [70].

Блістери - це контурно-чарункове пакування, яке виконане з полімерної плівки та фольги алюмінієвої, і має форму близьку до форми капсули. Основна частина капсул і таблеток пакуються тільки таким чином. Блістери виготовляють

з полімерної плівки, яка, як правило, утворює достатньо жорсткий каркас. Завдяки таким властивостям вона захищена від механічних пошкоджень, потрапляння вологи і забруднень. Матеріали для виготовлення полімерної плівки можуть бути різні: поліпропілен, поліетилен, полівінілхлорид, полівінілденхлорид та ін., що дає простір для оптимального рішення в залежності від результатів вивчення стабільності лікарських засобів.

В Україні набули подальшого розвитку різні види упаковок. Для збереження якості готових лікарських засобів (ГЛЗ) застосовується первинна та вторинна упаковки. Головний вплив на ГЛЗ має первинна упаковка, оскільки вона безпосередньо контактує з лікарським засобом [70].

За основу було обрано препарат «Креон» (рис. 1.1), що випускається у формі твердих желатинових капсул у флаконі з поліетилену високої щільності (по 1 флакону в картонній коробці) або по 10 капсул у блістері (по 1, 2 чи 3 блістери в картонній коробці), кожна капсула містить 150 мг суміші панкреатичних ферментів [71], приймаємо, що 50 мг становить частку амілази.



Рис. 2.1. Креон 10000.

З огляду на зручність використання зі споживчої точки зору, флакон поступається блістеру, оскільки капсули в блістері краще захищені від механічного впливу, навколишнього середовища, не контактують з повітрям та вологою.

Таким чином, оптимальним варіантом є пакування капсул з амілазою *Bacillus* sp. WangLB є по 10 капсул у 1 блістері, упаковка міститиме по 2 блістера відповідно.

2.3. Обґрунтування вибору біологічного агенту для отримання субстанції

Як було зазначено у попередніх розділах, такі продукти мікробного синтезу як грибні та бактеріальні амілази, знайшли широке використання у фармацевтичній промисловості в складі панкреатичних ферментних препаратів.

Тому важливим питанням є пошук та характеристика штамів-продуцентів таких гідролітичних ферментів, які б забезпечували синтез амілаз з високим рівнем активності.

Для порівняння було обрано 3 продуценти, які є представниками роду *Bacillus* – *Bacillus subtilis* RM16, *Bacillus* sp. WangLB та *Bacillus subtilis* B2 [10-12].

Вибір даних штамів для подальшого обґрунтування вибору біологічного агента з метою отримання амілази для застосування її у складі фармацевтичного препарату був обумовлений здатністю цих продуцентів до біосинтезу амілаз з відносно високою активністю за їх культивування на таких доступних субстратах як крохмаль та глюкоза. Штами-продуценти порівнювали за активністю синтезованого ферменту, складом поживного середовища та особливостями процесу культивування.

Згідно даних, представлених у табл. 2.1, амілазу з найнижчою активністю отримали при культивуванні *B. subtilis* B2 – 310,56 Од/мл за 48 год, у той час як при удвічі меншій тривалості процесу вирощування штаму *B. subtilis* RM16 активність амілази була дещо вищою і становила 350 Од/мл. Найвищою активністю володіла амілаза штаму *Bacillus* sp. WangLB – 26 670 Од/мл за 48 год культивування продуцента. Проте, спиратись лише на дані, представлені у табл. 2.1, при виборі найкращого продуцента амілази є не доцільним, тому далі слід порівняти склад та вартість поживних середовищ для культивування обраних штамів (див. табл. 2.2).

Особливості культивування *Bacillus subtilis* RM16, *Bacillus* sp. WangLB, *Bacillus subtilis* B2 з метою отримання амілаз

Біологічний агент	Склад поживного середовища, г/л	Активність амілази, Од/мл	Тривалість процесу, год	Особливості технологічного процесу	Використана література
<i>Bacillus subtilis</i> RM16	Крохмаль – 10 Триптон – 10 Дріжджовий екстракт – 5 NaCl – 10	350	24	40 ° C, pH 8,0, 150 об/хв	Salman T., Kamal M., Ahmed M., Siddiq S.M., Khan R.A., Hassan A. Medium optimization for the production of amylase by <i>Bacillus subtilis</i> RM16 in Shake-flask fermentation. <i>Pakistan J. Of Pharmaceutical Sciences</i> . 2016, 29(2): 439-444 [10].
<i>Bacillus</i> sp. WangLB	Крохмаль – 20 KNO ₃ – 1 K ₂ HPO ₄ – 0,5 MgSO ₄ ·7H ₂ O – 0,5 NaCl – 0,5 FeSO ₄ ·7H ₂ O – 0,01	26 670	48	35 ° C, pH 10, 200 об/хв	Wang S., Jeyaseelan J., Liu Y., Qin W. Characterization and Optimization of Amylase Production in WangLB, a High Amylase-Producing Strain of <i>Bacillus</i> . <i>Applied Biochemistry and Biotechnology</i> . 2016, 180(1): 136–151. doi:10.1007/s12010-016-2089-5 [11].
<i>Bacillus subtilis</i> B2	Глюкоза – 5 Дріжджовий екстракт – 5 K ₂ HPO ₄ – 0,5 MgSO ₄ – 0,2 CaCl ₂ – 0,1 Пептон – 5	310,56	48	37 ° C, pH 7, 150 об/хв	Elumalai P., Lim J.-M., Park Y.-J., Cho M., Shea P. J., Oh B.-T. Enhanced amylase production by a <i>Bacillus subtilis</i> strain under blue light-emitting diodes. <i>Preparative Biochemistry and Biotechnology</i> . 2019, 1–8 [12].

Вартість поживних середовищ для культивування *Bacillus subtilis* RM16, *Bacillus* sp. WangLB та *Bacillus subtilis* B2

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело* (1,2,3,4,5)
<i>Bacillus subtilis</i> RM16	Крохмаль – 10	19	0,19	1
	Триптон – 10	270,94	2,7	2
	Дріжджовий екстракт – 5	1100	5,5	3
	NaCl – 10	4,3	0,043	4
Вартість 1 л середовища становить – 8,43 грн.				
<i>Bacillus</i> sp. WangLB	Крохмаль – 20	19	0,38	1
	KNO ₃ – 1	34	0,034	5
	K ₂ HPO ₄ – 0,5	117	0,058	6
	MgSO ₄ ·7H ₂ O – 0,5	13,92	0,007	7
	NaCl – 0,5	4,3	0,002	4
	FeSO ₄ ·7H ₂ O – 0,01	4	0,00004	8
Вартість 1 л середовища становить – 0,48 грн.				
<i>Bacillus subtilis</i> B2	Глюкоза – 5	18	0,09	9
	Дріжджовий екстракт – 5	1100	5,5	3
	K ₂ HPO ₄ – 0,5	117	0,058	6
	MgSO ₄ – 0,2	13,92	0,003	7
	CaCl ₂ – 0,1	16	0,0016	10
	Пептон – 5	990	4,95	11
Вартість 1 л середовища становить – 10,6 грн				

Примітка: * – ціни наведено з урахуванням ПДВ станом на листопад 2021 р.:

- 1 – <https://flagma.ua/krahmal-kartofelny-o12344751.html> .
- 2 – <https://russian.alibaba.com/product-detail/tryptone-for-microorganism-growth-1600173341052.html?spm=a2700.8699010.29.12.67806e4aFMb6CF> .
- 3 – <https://prom.ua/p1086437845-ekstrakt-drozhzhej.html> .
- 4 – <https://prom.ua/p34849503-sol-pischevaya-pomol.html> .
- 5 – <https://soda.kiev.ua/p12292112-azotnokislyj-kalij-nitrat.html> .
- 6 – <https://prom.ua/p953593209-kalij-fosfornokislyj-zameschennyj.html> .
- 7 – https://novohim.com.ua/catalog/promyshlennaya-khimiya-i-syre/magnij-ternokislyj-7-vodnyj/?attribute_fasovka=5%20кг&gclid=CjwKCAiA2O39BRBjEiwApB2IkpuI .

[a4LtOnV-aTPSvfbdo_5pH9YQ-](#)

[N09JdkFk5efjUB5BEcP6j0sfRoCkY4QAvD_BwE](#) .

8 – <https://flagma.ua/kuporos-zhelezny-o10358680.html> .

9 – <https://flagma.ua/glyukoza-dekstroza-o2394980.html> .

10 – https://zakupka.com/p/31365786-hlorid-kalciya-pishchevoy-i-tehnicheskij-kupit-s-dostavkoy-po-ukraine/?e=1&i=DXDf_OD6a4TRa8hbT0W8to1exWDJFWbw_NWFtaRD9pFq_6E-9K2IROlJ9pQTcRRQUGvZhXh79iGbtZ6POfOW2xl97zvBh0d-p5yM8LsqUqShIWqspCok5ST6dmu7d5OXtVVD6G2SRqQm7RIHT6KV4ksChe_yn5ZTq2Ut5FTaRIOHUOvC4sGgA7r5fAN024EI .

11 – <https://www.systopt.com.ua/ru/item-pepton-fermentatyvnyj> .

Виходячи з розрахунків, наведених у таблиці 2.2, найдорожчим виявилось середовище для культивування *B. subtilis* B2 – 10,6 грн за 1 л, дещо дешевшим є середовище для вирощування *B. subtilis* RM16 – 8,43 грн, у той час як найдешевшим є поживне середовище для штаму *Bacillus* sp. WangLB – 0,48 грн, що у 21 та 17 разів дешевше, ніж для штамів B2 та RM16 відповідно.

На наступному етапі розрахуємо умовну вартість 1 Од ферменту амілази та активність ферменту, синтезованого за 1 годину.

Так, згідно інформації, поданої у таблиці 2.3, найвищу активність амілази, синтезованої за год, спостерігали при культивуванні штаму *Bacillus* sp. WangLB – 555,6 Од/мл, у той час як за вирощування штамів RM16 та B2 активність ферменту за 1 год була у 38 та 85 разів нижчою – 14,58 та 6,47 Од/мл відповідно. Відповідно, згідно табл. 2.3, умовна вартість 1 Од амілази, синтезованої *Bacillus* sp. WangLB, є найнижчою.

Умовна вартість 1 Од амілази при культивуванні *Bacillus subtilis* RM16, *Bacillus sp. WangLB* та *Bacillus subtilis* B2

Продуцент	Вартість 1 л середовища, грн	Активність амілази, Од/л	Умовна вартість 1 Од амілази, грн	Тривалість культивування, год	Активність амілази, синтезованої за год, Од/мл
<i>Bacillus subtilis</i> RM16	8,43	350	0,024	24	14,58
<i>Bacillus sp. WangLB</i>	0,48	26 670	0,00002	48	555,6
<i>Bacillus subtilis</i> B2	10,6	310,56	0,034	48	6,47

Таким чином, зважаючи на високу активність ферменту та найнижчу вартість поживного середовища, варто підсумувати, що найкращим продуцентом амілази серед вищенаведених є штам *Bacillus sp. WangLB*.

2.4. Розрахунок потужності виробництва

У підрозділі 2.1 розраховано, що потреба в амілазі для лікування 4950 хворих на хронічний панкреатит у м. Києві становить 814 968 000 Од.

При вирощуванні *Bacillus sp. WangLB* протягом 48 год отримують 26 670 Од/л амілази, тоді для отримання 814 968 000 Од амілази необхідна кількість культуральної рідини становить:

$$\begin{aligned}
 &26\ 670\ \text{Од} - 1\ \text{л} \\
 &814\ 968\ 000\ \text{Од} - x \\
 x = &\frac{814\ 968\ 000}{26\ 670} = 30\ 557\ \text{л}
 \end{aligned}$$

Враховуючи сумарні втрати цільового продукту при виробництві (20 %), необхідна кількість культуральної рідини складає :

$$V_{\text{кр}} = 30\ 557\ \text{л} / (1-0,2) = 38\ 196\ \text{л}$$

Приймаємо кількість робочих трудоднів ($T_{\text{рд}}$) 38. Тоді кількість продукту на добу ($V_{\text{д}}$) становитиме:

$$V_d = V_{кр}/T_{рд} = 38\,196 / 38 = 1005 \text{ л}$$

Протягом інших 292 робочих днів підприємство буде працювати для біосинтезу інших мікробних ферментів.

Визначасмо кількість виробничих циклів на рік:

$$N_{ц} = V_{кр} / ((V_d \times T_{цф})/24) = 38\,196 / ((1005 \times 54)/24) = 17 \text{ циклів,}$$

де $T_{цф}$ – цикл роботи ферментера (мийка та огляд – 1,5 год, перевірка на герметичність – 0,5 год, підігрів та стерилізація апарату – 1,5 год, охолодження ферментера – 0,5 год, завантаження поживного середовища – 1,5 год, засів культурою – 0,5 год та ферментація – 48 год).

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

$$V_{крц} = K_1 \times V_d \times T_{цф} / 24 = 1,1 \times 1005 \times 54 / 24 \approx 2500 \text{ л,}$$

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

Геометричний об'єм ферментера для отримання 2500 л культуральної рідини з коефіцієнтом заповнення 0,5 має становити:

$$V_{г} = V_{крц} / K_{зап} = 2500 / 0,5 = 5\,000 \text{ л} = 5 \text{ м}^3,$$

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

2.4.1. Розрахунок кількості стадій отримання посівного матеріалу для вирощування культури у ферментері 5 м³

За виробничий цикл отримують $V_{кр} = 2,5 \text{ м}^3$ культуральної рідини.

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

$$V_{роб.1} = \frac{2,5}{1 - 0,1} \approx 2,7 \text{ м}^3$$

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

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері з робочим об'ємом $V_{роб.1} = 2,7 \text{ м}^3$.

При вибраному коефіцієнті заповнення $K_{зан} = 0,5$ можливий геометричний об'єм ферментера $V_{ф.1} = 2,7/0,5 = 5,4 \text{ м}^3$. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{сф} = 5 \text{ м}^3$ та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{зан.1} = \frac{2,7}{5} = 0,54$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах, оскільки оптимальним коефіцієнтом заповнення для аеробних ферментерів є 0,5-0,55.

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

$$V_{пс1} = \frac{V_{роб.1}}{1 + X_{ф}} = \frac{2,7}{1 + 0,1} = 2,45 \text{ м}^3$$

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

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить:

$$V_{пм1} = V_{роб.1} - V_{пс1} = 2,7 - 2,45 = 0,25 \text{ м}^3$$

2.4.2. Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в інокуляторі 500 л

Для одержання $0,25 \text{ м}^3 = 250 \text{ л}$ посівного матеріалу кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі (з урахуванням втрат в результаті краплиносу через колектор відпрацьованого повітря) становитиме:

$$V_{роб.2} = \frac{250}{1 - 0,1} = 277,7 \text{ л}$$

Можливий геометричний об'єм інокулятора $V_{ін.} = 277,7/0,5 = 555,4 \text{ л}$. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний інокулятор $V_{сін} = 500 \text{ л}$ та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{зан.2} = \frac{277,7}{500} = 0,55$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах.

Кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{пс}2} = \frac{277,7}{1 + 0,1} = 252,45 \text{ л}$$

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{\text{пм}2} = V_{\text{роб.}2} - V_{\text{пс}2} = 277,7 - 252,45 = 25,25 \text{ л}$$

2.4.3. Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в інокуляторі 50 л

Для одержання 25,25 л посівного матеріалу кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі (з урахуванням втрат в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря) становитиме:

$$V_{\text{роб.}3} = \frac{25,25}{1 - 0,1} = 28 \text{ л}$$

Можливий геометричний об'єм інокулятора $V_{\text{ін.}} = 28/0,5 = 56 \text{ л}$.
Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний інокулятор $V_{\text{сін}} = 50 \text{ л}$ та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап.}3} = \frac{28}{50} = 0,56$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах.

Кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{пс}3} = \frac{28}{1 + 0,1} = 25,45 \text{ л}$$

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{\text{пм}3} = V_{\text{роб.}3} - V_{\text{пс}3} = 28 - 25,45 = 2,55 \text{ л}$$

2.4.4. Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в інокуляторі 5 л

Для одержання 2,55 л посівного матеріалу кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі (з

урахуванням втрат в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря) становитиме:

$$V_{\text{роб.4}} = \frac{2,55}{1 - 0,1} = 2,8 \text{ л}$$

Можливий геометричний об'єм інокулятора $V_{in.} = 2,8/0,5 = 5,6$ л. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний інокулятор $V_{cin} = 5$ л та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап.4}} = \frac{2,8}{5} = 0,56$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах.

Кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{пс4}} = \frac{2,8}{1 + 0,1} = 2,54 \text{ л}$$

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{\text{пм4}} = V_{\text{роб.4}} - V_{\text{пс4}} = 2,8 - 2,54 = 0,26 \text{ л}$$

Таку кількість інокуляту можна отримати в колбах на качалці.

2.4.5. Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в колбах на качалці

Для одержання 0,26 л = 260 мл посівного матеріалу використовують качалочні колби об'ємом 750 мл. Таку кількість посівного матеріалу можна отримати у 2 качалочних колбах, які міститимуть по 130 мл культури.

Таким чином, провівши розрахунки встановили, що вирощування інокуляту для біосинтезу амілази при культивуванні *Bacillus* sp. WangLB у ферментері об'ємом 5 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,5 буде проходити у чотири етапи.

РОЗДІЛ 3. ПІДБІР ТЕХНОЛОГІЧНОГО ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ СТАДІЙ ОТРИМАННЯ СУБСТАНЦІЇ ТА ЛІКАРСЬКОГО ПРЕПАРАТУ

Оскільки α -амілаза у більшості мікроорганізмів є позаклітинним ферментом, то операції з її виділення й очищення зводяться до такого:

- 1) відділення клітинної біомаси від культуральної рідини;
- 2) очищення і концентрування розчинів, які містять вихідний фермент, за допомогою вакуум-концентрування, осадження з розчинів органічними розчинниками та нейтральними солями, діаліз, ультрафільтрація, гель-фільтрація, електрофорез, хроматографія тощо [72].

У статті [73] описано спосіб виділення та очищення амілази, який включає наступні стадії:

- Відділення біомаси
- Висолювання сульфатом амонію
- Розділення суспензії та отримання супернатанту
- Повторне додавання сульфату амонію
- Ресуспендування осаду
- Діаліз
- Іонообмінна хроматографія
- Очищення за допомогою гель-фільтрації.

Разом з тим, у статті [72] згадується метод виділення та очищення α -амілази, що включає такі етапи:

- Осадження спиртом,
- Стабілізація іонами Ca^{2+} ,
- Висолювання сульфатом амонію,
- Діаліз

Даний метод дозволяє отримати фермент з виходом 50–60 % за

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	НУХТ БТЕК 02.02.07 КР ПЗ		
Розроб.		Харченко О.Г.			Літ.	Арк.	Аркушів 64
Перевір.		Старовойтова С.О.				63	6
Реценз.					Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Затверд.		Стабніков В.П.					
РОЗДІЛ 3. ПІДБІР ТЕХНОЛОГІЧНОГО ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ СТАДІЙ ОТРИМАННЯ СУБСТАНЦІЇ ТА ЛІКАРСЬКОГО ПРЕПАРАТУ							

активністю, що в 3–4 рази перевищує вихід у разі кристалізації. Запропонований спосіб може стати основою виробничого одержання ферменту з метою його використання в медицині і в деяких інших галузях промисловості. Препарати високоочищеної α -амілази мали амілолітичну активність 5 040–5 400 одиниць, містили 70–71% білка, 12–13% вуглеводів, 8–10% пептидів, 6–7% вологи і 3–4% золи [72].

Оскільки перший метод [73] включає більше стадій очищення і на виході можна отримати більш чистий продукт, то обираємо його для виділення та очищення амілази *Bacillus sp. WangLB*. Однак останні дві стадії іонообмінної хроматографії та очищення гель-фільтрацією проводять з метою визначення амілази, тому діаліз буде заключною стадією очищення амілази.

Отже, процес відділення біомаси можна ефективно провести з використанням центрифугування.

Центрифугування - це поділ механічних сумішей на складові частини дією відцентрової сили. Прилади, застосовувані для цієї мети, називають центрифугами. Основною частиною є ротор центрифуги з вмонтованими в ньому гніздами для центрифугальних пробірок. Ротор обертається з великою швидкістю, внаслідок чого створюються значні за величиною відцентрові сили, під дією яких відбувається поділ механічних сумішей, наприклад осадження зважених в рідині частинок [74].

Тому для реалізації цієї стадії обираємо промислову центрифугу.

Додавання сульфату амонію здійснюється до одержаного супернатанту, процес проводять у звичайному збірнику з перемішувачем та сорочкою, оскільки температура має становити 4°C.

Для розділення суспензії та отримання супернатанту також застосуємо центрифугування на промисловій центрифугі з режимом роботи 14000 об/хв

при температурі 4°C. У даному випадку центрифуга має бути рефрижераторною, тобто з можливістю охолодження.

Повторне додавання сульфату амонію проводять у збірнику з перемішуючим пристроєм.

Отриманий осад ресуспендують 0,05М Tris-HCl буфером з рН 7,5. Далі проводять діаліз проти цього ж буферу.

Діаліз – це очищення ультрамікрогетерогенних дисперсних систем від електролітів та інших низькомолекулярних домішок водою або іншим розчинником за допомогою напівпроникної мембрани. Для проведення діалізу між дисперсною системою і розчинником, частіше очищеною водою, розміщують пористу перегородку — мембрану, пори якої проникні для іонів і молекул низькомолекулярної речовини і непроникні для частинок дисперсної фази. У нашому випадку в якості розчинника виступає 0,05М Tris-HCl буфер.

Цей процес можна реалізувати на ультрафільтраційній установці, оскільки на даній установці власне відбувається процес розділення іонів та молекул через напівпроникну мембрану.

Для ультрафільтрації, як правило, використовують пористі полімерні мембрани на основі поліуретанів, складних ефірів целюлози, полівінілового спирту і ін. Такі мембрани отримують шляхом опромінювання зарядженими частинками полімерної плівки з подальшим її травленням. Для забезпечення механічної міцності в умовах гідравлічного тиску основну тонку мембрану прикріплюють до грубішої підкладки товщиною 125—250 мкм. Після ультрафільтраційної установки отримуємо вже сконцентрований розчин, який необхідно висушити [75]. Обираємо для ультрафільтрації порожнисті мембрани з волокнистого матеріалу, такий матеріал володіє ефективною пропускною здатністю для іонів і молекул низькомолекулярних речовин.

Сушіння є кінцевою стадією виробництва багатьох продуктів мікробного синтезу, іноді її застосовують як проміжний процес при

отриманні високоочищених препаратів. Для сушки біологічних об'єктів застосовують різноманітні способи і установки. Вони розрізняються по агрегатному полягання вологи у висушуваному матеріалі (сушка з рідкого стану або з твердого), а також за способом підведення теплоти (контактна, конвективна і радіаційна).

Виділяють ефективні способи сушіння, що реалізуються на розпилювальних, сублімаційних сушарках та у вакуум-випарних шафах.

Розпилювальні сушарки найбільш широко застосовують для сушіння продуктів мікробіологічного синтезу, оскільки забезпечують найшвидше сушіння, не потребують точного забезпечення і витримки потоку теплоносія, температура якого може бути порівняно невисокою. Сушарки цього типу почали застосовувати ще на початку ХХ століття для сушіння молока, крові. Завдяки високій ефективності сьогодні їх застосовують для сушіння будь-яких розчинів, в тому числі розчинів мінеральних солей.

Однак розпилювальні сушарки є досить складними і небезпечними апаратами, оскільки усередині може утворитись вибухонебезпечна суміш органічного порошку і повітря. Тому їх роботу намагаються автоматизувати, використовувати інертні гази, розташовувати їх поза цехом на відкритому повітрі.

Сушіння сублімацією — один з найефективніших способів зневоднення живої біомаси дріжджів, бактерійних препаратів та інших термолабільних біологічних об'єктів. За такого способу сушіння молекулярна структура матеріалу зберігається майже без змін і висушений матеріал характеризується доброю дисперсністю і пористістю, тим часом як за звичайного сушіння відбувається значне зменшення об'єму матеріалу.

Як і сублімаційні сушарки, *вакуум-сушильні шафи* призначені для сушіння термолабільних продуктів, але процес відбувається за кімнатної або підвищеної температури, яку витримує матеріал. Сушіння відбувається періодично, тобто у шафу на полиці закладають вологий матеріал,

створюють вакуум, починають обігрівання шафи парою через порожнини в плитах або електричним струмом. Але ці апарати призначені для сушіння порівняно невеликих кількостей вологого матеріалу.

Таким чином, порівнявши вищезазначені апарати для висушування, обираємо метод сушіння сублімацією для висушування концентрату амілази.

Після висушування отриману масу слід подрібнити. Дробарки класифікують за багатьма критеріями: за призначенням, за функціями, за принципом (особливостями) роботи та за типом сировини, яку вони здатні переробляти. Отже, дробарки бувають: щоківі, конусні, валкові, молоткові та роторні.

Щоківі дробарки: призначені для дроблення твердих матеріалів. Вони не займають багато місця та мають просту конструкцію. Працюють дробарки за принципом роздавлювання та стирання сировини між двома щоківими механізмами. При цьому, одна щока рухома, а інша - нерухома. Таким чином здійснюється подрібнення матеріалу. Такі дробарки застосовують для дроблення твердих матеріалів. Призначені для великого та середнього дроблення.

Конусні дробарки: подрібнюють сировину методом роздавлювання. Процес подрібнення у таких дробарках відбувається завдяки нерухомій конічній чаші та рухомим подрібнюючим конусом, який розташований всередині чаші. Вони найкраще підходять для дроблення в'язкої та твердої сировини. Можуть здійснювати велике, середнє та дрібне дроблення.

Валкові дробарки: принцип роботи даної дробарки пов'язаний із наявністю валків. Сировина для подрібнення закидається в дробарку зверху, а далі, при проходженні між валками, сировина роздроблюється. Валки в такій дробарці рухаються один одному на зустріч. Валкові дробарки бувають двох видів: з гладкими та зубчастими валками. Перший вид застосовують для середнього та дрібного подрібнення сировини, а другий призначений для крупного та середнього дроблення. Найкраще для дроблення м'яких та

крихких матеріалів здійснюється саме дробарками з зубчатими валками. Валкові дробарки мають просту конструкцію, вони компактні та надійні в експлуатації, однак є малопродуктивними та електрозатратними.

Молоткова дробарка: такі дробарки виконують велике, середнє та дрібне дроблення матеріалів будь-якої міцності. Процес дроблення в таких дробарках здійснюється за допомогою ударів молотків по матеріалу. Таким чином, матеріал дробиться та розтирається молотками. Молоткові дробарки мають безліч переваг: простота конструкції, висока продуктивність, надійність, компактність, високий ступінь дроблення.

Роторні дробарки: принцип дії аналогічний молотковим дробаркам. Вони призначені для великого та середнього дроблення. Дроблення здійснюється ротором, який дуже швидко обертається. Ударами молотків матеріал руйнується до потрібної крупності [76].

Отже, обираємо молоткову дробарку, зважаючи на її здатність до дрібного подрібнення сировини та просту конструкцію.

Після подрібнення порошок поступає на стадію просіювання для отримання гомогенної маси. У фармацевтичній промисловості використовують відцентрові просіювачі, які дозволяють здійснити ефективне просіювання субстанцій. Оскільки для капсулювання субстанції мають володіти малим розміром частинок для однорідного дозування, обираємо відцентровий просіювач з розміром пор 0,5-1 мкм.

Сухий просіяний порошок амілази використовують для наповнення твердих желатинових капсул [77].

Детальніше характеристики обладнання розглянемо нижче у розділі 4.

РОЗДІЛ 4. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Специфікацію обладнання, зображеного на апаратурній схемі, для здійснення виділення й очищення амілази наведено у табл. 4.1.

Таблиця 4.1

Основні характеристики обладнання для отримання препарату амілази

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
1	2	3	4
3-1 3-5 3-9	Збірник 3,2 м ³	3	Реактор об'ємом 3,2 м ³ , пропелерна мішалка 200 об/хв, матеріал нержавіюча сталь. Компанія: «Маклаков В., ФЛП» (Україна) ¹
Н-2 Н-6 Н-10 Н-14 Н-17	Насос	5	Насос ВЗ 32-160/1.5 відцентровий моноблочний з нержавіючої сталі. Продуктивність 12 м ³ /год, висота подачі 24,5 м. Виробник: «BTS Engineering» (Китай) ²
Ц-3 Ц-7 Ц-11	Центрифуга	3	Центрифуга рефрижераторна РС-6, с частотою обертання до 6000 об/хв. Оснащена холодильним агрегатом, таймером, термометром, тахометром. Компанія: «Медтехника ZENET» (Україна) ³
Д-4 Д-8	Дозатор об'ємно-ваговий	2	Дозатор ваговий ДВСВ-М, межі зважування 5-70 кг, ціна поділки 0,005 кг. Виробник: «Політехнік» (Україна) ⁴
Д-12	Дозатор рідин	1	Дозатор об'ємний електричний FOYER КС-280 для рідин. Продуктивність 3,2 л/хв. Компанія: «КОЗАК+» (Україна) ⁵
3-13 3-16	Збірник 1 м ³	2	Реактор об'ємом 1 м ³ , основний матеріал нержавіюча сталь AISI 304 (товщина 2,5 мм). D = 1000 мм, H = 2400 мм. Компанія: «Wise Master» (Україна) ⁶

					НУХТ БТЕК 02.02.07 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Харченко О.Г.			РОЗДІЛ 4. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Старовойтова С.О.					69	3/0
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Продовження табл. 4.1.

УФУ-15	Ультрафільтраційна установка	1	НФМ-053 ультрафільтраційна пілотна установка з порожнистими волокнистими мембранами. Потік рідини 2-20 л/год. Матеріал AISI 304. Виробник: «EXW - Jiangsu» (Китай) ⁷
СС-18	Сублимаційна сушка	1	Сушарка ліофільна промислова. Дана сушарка має кілька ступенів програмування і роботи, може управлятися дистанційно за допомогою WI-FI блоку і завантажується сирим продуктом до 300 кг. Компанія: «ФЛП Куликова Н.Д.» (Україна) ⁸
Д-19	Молоткова дробарка	1	Молоткова дробарка подрібнювач YF8-1. Продуктивність 10-50 кг/годину. Кількість оборотів 2800 об/хв. Компанія: «Чумаки в Китаї» (Україна) ⁹
ВП-20	Відцентровий просіювач	1	Відцентровий просіювач. Площа сітки 0,7 м ³ . Компанія: «Альянс - КМ» (Україна) ¹⁰
КНМ-21	Капсуло-наповнювальна машина	1	Автоматична машина для наповнення капсул. Продуктивність 12500 шт / год. Вихід готового продукту сягає понад 97%. Компанія: «Шанхай NPACK Machinery Co., Ltd.» (Китай) ¹¹
ФПМ-22	Фасувально-пакувальна машина	1	Фасувально-пакувальна машина DXDP-40П. Машина розроблена для дозування та пакування таблеток, капсул в упаковку з термозварювальних матеріалів: папір / PE, целюфан / PE, алюмінієва фольга / PE, ВОРР / PE і нейлон / PE. Продуктивність 50-90 пакетів/хв. Виробник: «Clever Machinery» (Китай) ¹²

1 – <https://flagma.ua/reaktor-nerzhaveyushchiy-3-2-m3-o12118954.html>

2 – https://prom-nasos.com.ua/ua/catalog/pumps-by-type/console_pumps/bz-32-160-15-v-dcentroviy-monoblochniy-nasos-z-nerzhav-yucho-stal-/?gclid=Cj0KCQjwqPGUBhDwARIsANNwjV6Z2Z2wmVNB7IIqY71-Ubh5XONYhYYCrZE5FT0qzbzKN0dlWY6oLZMaAsgBEALw_wcB

3 – https://zenet-kharkov.com.ua/p1555980665-tsentrifuga-refrizheratornaya.html?source=merchant_center&utm_source=a5o5_adwords&utm_medium=cpc&utm_campaign=cid_19040738398_search&utm_term=

- 4 – https://polytechnic.in.ua/ua/p698199032-dozator-vesovoj-dvsv.html?source=merchant_center&gclid=Cj0KCQiAt66eBhCnARIsAKf3ZNHQVH--alr5oRtf55egushIBCI8343m1e1efYKyr-912G7-c6no5l8aAsjCEALw_wcB
- 5 – <https://kozakplus.ua/products/granule-packaging-machines/kc-280>
- 6 – <https://wise-master.com.ua/ua/p1001183919-reaktor-aisi-304.html>
- 7 – https://bts.net.ua/ua/membrane_filter/membrane-pilot-plants/hfm-053-ultraf-ltrac-yna-p-lotna-ustanovka-z-porozhnistimi-voloknistimi-membranami/
- 8 – <https://agroteplo.com.ua/sushilka-sublimatsionnaja-promyshlennaja>
- 9 – <https://chumaki.in.ua/ua/p606012619-izmelchitel-yf8-melnitsa.html>
- 10 – <https://alyans-km.com.ua/ru/proseivatel-sweco-centrifugal-sifters>
- 11 – <https://uk.nicefiller.com/automatic-pharmaceutical-capsule-filling-machine-semi-automated-capsule-filler-equipment-medicines-making.html>
- 12 – <https://clever-machinery.com/ua/p645478201-fasovochno-upakovochnaya-mashina.html>

РОЗДІЛ 5. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНОГО ВИДІЛЕННЯ І ОЧИЩЕННЯ СУБСТАНЦІЇ ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ ЛЗ

Технологічна схема виділення та очищення амілази, синтезованої штамом *Bacillus* sp. WangLB, включає в себе технологічний процес, який складається з таких стадій: відділення біомаси, додавання сульфату амонію, розділення суспензії та отримання супернатанту, повторне додавання сульфату амонію, ресуспендування осаду, ультрафільтрацію, сублімаційне висушування, подрібнення, просіювання, фасування та пакування.

ТП 1. Зберігання культуральної рідини

ТП 1.1. Зберігання культуральної рідини

Культуральну рідину після виробничого біосинтезу за допомогою перистальтичного насоса подають в збірник (З-1) об'ємом 3,2 м³, де відбувається зберігання за температури 20 °С до початку стадій виділення та очищення.

ТП 2. Відділення біомаси

ТП 2.1. Центрифугування

Культуральну рідину (від ТП 1.1) за допомогою відцентрового насоса (Н-2) подають до центрифуги (Ц-3). Режим роботи центрифуги – 14000 об/хв при температурі 20°С протягом 20 хв.

Отриманий супернатант надходить на наступну стадію виділення.

ТП 3. Висолювання

ТП 3.1. Висолювання сульфатом амонію

Супернатант поступає у збірник З-5, після чого за допомогою об'ємно-вагового дозатора Д-4 подають сульфат амонію у кількості до 60% від повного насичення – 1500 кг. Висолювання проводять протягом 30 хв за

НУХТ БТЕК 02.02.07 КР ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.		Харченко О.Г.		
Перевір.		Старовойтова С.О.		
Реценз.				
Н. Контр.				
Затверд.		Стабніков В.П.		
РОЗДІЛ 5. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНОГО ВИДІЛЕННЯ І ОЧИЩЕННЯ СУБСТАНЦІЇ ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ ЛЗ				
		Літ.	Арк.	Аркушів 73
			71	4
Кафедра БТМ				

температури 4°C, температуру підтримують шляхом подачі у рубашку збірника холодної води.

ТП 4. Відділення осаду

ТП 4.1. Центрифугування

Розчин від *ТП 3.1* за допомогою насоса Н-6 поступає до центрифуги Ц-7, де відбувається відділення утворюваного в процесі висолювання осаду. Осад вивантажується автоматично та утилізується. Режим роботи центрифуги – 14000 об/хв при температурі 4°C протягом 20 хв.

ТП 5. Висолювання

ТП 5.1. Висолювання сульфатом амонію

Супернатант від *ТП 4.1* надходить у збірник 3-9, після чого за допомогою об'ємно-вагового дозатора Д-8 подають сульфат амонію у кількості до 60% від повного насичення – 1320 кг. Висолювання проводять протягом 30 хв за температури 4°C, температуру підтримують шляхом подачі у рубашку збірника холодної води.

ТП 6. Відділення осаду

ТП 6.1. Центрифугування

Розчин від *ТП 5.1* за допомогою насоса Н-10 поступає до центрифуги Ц-11, де відбувається відділення утворюваного в процесі висолювання осаду. Режим роботи центрифуги – 14000 об/хв при температурі 4°C протягом 20 хв. Відділений осад автоматично вивантажують у збірник 3-13, ресуспендують у збірнику 3-13 додаванням буфера Tris-HCl у кількості 800 л за допомогою рідинного дозатора Д-12 з рН 7,5 та передають за допомогою насоса Н-14 на наступну стадію *ТП 7.1*.

ТП 7. Концентрування

ТП 7.1. Ультрафільтрація

Розчин від *ТП 6.1* надходить за допомогою насоса Н-14 на ультрафільтраційну установку з порожнистими волокнистими мембранами

УФУ-15. В якості розчинника по трубопроводу надходить 0,05М Tris-HCl буфер. Тиск 1,5 бар. Концентрований розчин надходить по трубопроводу від УФУ-15 до збірника З-16.

ТП 8. Висушування

ТП 8.1. Сублімаційна сушка

Концентрований розчин від ТП 7.1 за допомогою насоса Н-17 надходить на сублімаційну сушку СС-18. Температура становить -60°C, висушування проводять близько 30-35 хв до вологості 10%.

ТП 9. Подрібнення та просіювання

ТП 9.1. Подрібнення субстанції

Висушену субстанцію від ТП 8.1 збирають у пересувну ємність, передають на молоткову дробарку YF8-1 Д-19 та подрібнюють матеріал при кількості оборотів 2800 об/хв. Після чого подрібнену субстанцію збирають у пересувну ємність та передають на стадію просіювання.

ТП 9.2. Просіювання субстанції

Подрібнений порошок від ТП 9.1 вивантажують з пересувної ємності на відцентровий просіювач ВП-20. Розмір частинок 0,5-1 мм.

ТП. 10. Фасування

ТП 10.1. Наповнення капсул

Просіяний порошок від ТП 9.2 вивантажують з пересувної ємності та передають на капсулонаповнювальну машину КНМ-21, де порошок поміщають у тверді желатинові капсули та направляють на наступну стадію.

ПМВ 11. Пакування, маркування, відвантаження

ПМВ 11.1. Пакування та маркування

Після наповнення готові тверді желатинові капсули передають на фасувально-пакувальну машину ФПМ-22, де відбувається фасування капсул з амілазою по 10 капсул у 1 блістері, по 2 блістера пакується у вторинну упаковку разом з листівкою-вкладкою, проходить автоматичне маркування.

ПМВ 11.2. Відвантаження

Запаковані та промарковані капсули з амілазою вручну поміщають у групові коробки та відвантажують на склад.

РОЗДІЛ 6. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ

Опис. Двокольорові тверді желатинові капсули розміру 2 з коричневою непрозорою кришкою і безбарвним прозорим тілом. Капсули повинні мати гладку поверхню без пошкоджень і видимих повітряних і механічних вкраплень (домішок).

Ідентифікація. Препарат володіє амілолітичною активністю.

Розчин сірчаної кислоти. Сірчана кислота концентрована – вода 1:4.

Випробувана суспензія. Точну наважку вмісту капсул, що відповідає заявленій кількості амілази, поміщають в охолоджену до температури від 0 до 4 °С ступку і розтирають з 3 мл охолодженого до температури 5±3 °С фосфатного буферного розчину рН 6,8 (1) до отримання суспензії. За допомогою того ж буферного розчину отриману суспензію кількісно переносять у мірну колбу місткістю 100 мл, додають 60 мл охолодженого фосфатного буферного розчину рН 6,8 (1), ретельно перемішують протягом 15 хв, доводять об'ємний суспензії (1) до позначки.

Стандартна суспензія. Точну наважку стандартного зразка панкреатину, що відповідає заявленій кількості амілази, поміщають в охолоджену до температури від 0 до 4 °С ступку і розтирають з 3 мл охолодженого до температури 5±3 °С фосфатного буферного розчину рН 6,8 (1) протягом хв до отримання тонкої суспензії. За допомогою того ж буферного розчину отриману суспензію кількісно переносять у мірну колбу місткістю 100 мл, додають 60 мл охолодженого фосфатного буферного розчину рН 6,8 (1), ретельно перемішують протягом 15 хв, доводять об'ємний суспензії. (1) до позначки.

У конічну колбу місткістю 250 мл з притертою скляною пробкою поміщають 25 мл 1% розчину крохмалю, 10,0 мл фосфатного буферного

					НУХТ БТЕК 02.02.07 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Харченко О.Г.			РОЗДІЛ 6. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ	Літ.	Арк.	Аркушів 77
Перевір.		Старовойтова С.О.					76	3
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

розчину рН 6,8 (1) та 1,0 мл 0,2 М розчину натрію хлориду. Колбу закривають, струшують і витримують у водяній бані за температури 25 ± 1 °С. Через 10 хв у колбу додають 1,0 мл випробуваної суспензії, перемішують і повертають на водяну баню. Через 10 хв (точний час) додають 2,0 мл 1 М розчину хлористоводневої кислоти. При безперервному перемішуванні додають 10,0 мл 0,05 М розчину йоду і 45,0 мл 0,1 М розчину натрію гідроксиду. Суміш витримують у темряві за кімнатної температури протягом 15 хв. Додають 4,0 мл розчину сірчаної кислоти. Надлишок йоду титрують 0,1 М розчином натрію тіосульфату.

Паралельно проводять контрольний досвід за описаною методикою, але 2,0 мл 1 М розчину хлористоводневої кислоти додають перед внесенням суспензії.

Аналогічно проводять визначення зі стандартною суспензією.

Однорідність дозованих одиниць. Капсули мають витримувати випробування на однорідність дозованих одиниць (ДФУ 2.9.40) або, в обґрунтованих і дозволених випадках, випробування на однорідність вмісту і/або однорідність маси діючої речовини в одиниці дозованого лікарського засобу [78].

Однорідність вмісту (ДФУ 2.9.6). Капсули з вмістом діючої речовини менше 2 мг або менше 2 % від маси вмісту мають витримувати випробування на однорідність вмісту діючої речовини в одиниці дозованого лікарського засобу (тест В), якщо немає інших зазначень в окремій статті. Якщо лікарський засіб містить більше однієї діючої речовини, вимоги поширюються лише на ті речовини, вміст яких відповідає вищезазначеним умовам.

Однорідність маси (ДФУ 2.9.5). Капсули мають витримувати випробування на однорідність маси для одиниці дозованого лікарського

засобу. Випробування на однорідність маси не вимагається, якщо випробування на однорідність вмісту передбачене для всіх діючих речовин.

Розчинення. Випробування може бути проведене для підтвердження відповідного вивільнення діючої речовини або речовин, наприклад, одним із способів, описаних у статті «Тест «Розчинення» для твердих дозованих форм (ДФУ 2.9.3.).

Мікробіологічна чистота (ДФУ 5.1.4). Випробування мікробіологічної чистоти нестерильних лікарських засобів проводять згідно з методами, наведеними в статті 2.6.12. Для нестерильних лікарських засобів критерії прийнятності, що базуються на загальному числі аеробних мікроорганізмів (ТАМС) та загальному числі дріжджових та плісневих грибів (ТҮМС).

Загальне число аеробних мікроорганізмів (ТАМС) – не більше 10^3 КУО/г. Загальне число дріжджових та плісневих грибів (ТҮМС) – не більше 10^2 КУО/г. Відсутність *Escherichia coli* в 1 г [78].

РОЗДІЛ 7. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОДЕРЖАННЯ ЛЗ

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

При вирощуванні *Bacillus* sp. WangLB протягом 48 год отримують 26 670 Од/л амілази, тоді для отримання 814 968 000 Од амілази необхідна кількість культуральної рідини становить:

$$x = \frac{814\,968\,000}{26\,670} = 30\,557 \text{ л}$$

Враховуючи сумарні втрати цільового продукту при виробництві (20 %), необхідна кількість культуральної рідини складає :

$$V_{кр} = 30\,557 \text{ л} / (1-0,2) = 38\,196 \text{ л}$$

Приймаємо кількість робочих трудоднів ($T_{рд}$) 38. Тоді кількість продукту на добу ($V_{д}$) становитиме:

$$V_{д} = V_{кр} / T_{рд} = 38\,196 / 38 = 1005 \text{ л}$$

Протягом інших 292 робочих днів підприємство буде працювати для біосинтезу інших мікробних ферментів.

Визначаємо кількість виробничих циклів на рік:

$$N_{ц} = V_{кр} / ((V_{д} \times T_{цф}) / 24) = 38\,196 / ((1005 \times 54) / 24) = 17 \text{ циклів,}$$

де $T_{цф}$ – цикл роботи ферментера (мийка та огляд – 1,5 год, перевірка на герметичність – 0,5 год, підігрів та стерилізація апарату – 1,5 год, охолодження ферментера – 0,5 год, завантаження поживного середовища – 1,5 год, засів культурою – 0,5 год та ферментація – 48 год).

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

					НУХТ БТЕК 02.02.07 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Харченко О.Г.			РОЗДІЛ 7. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОДЕРЖАННЯ ЛЗ	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Старовойтова С.О.					79	11
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

$$V_{\text{крц}} = K1 \times V_d \times T_{\text{цф}} / 24 = 1,1 \times 1005 \times 54 / 24 \approx 2500 \text{ л},$$

де $K1$ – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій.

Геометричний об'єм ферментера для отримання 2500 л культуральної рідини з коефіцієнтом заповнення 0,5 має становити:

$$V_{\text{г}} = V_{\text{крц}} / K_{\text{зап}} = 2500 / 0,5 = 5000 \text{ л} = 5 \text{ м}^3,$$

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

7.2. Обґрунтування вибору класів чистоти виробничих приміщень

Обґрунтування підготовки персоналу

Працюючі в приміщеннях різного ступеня чистоти повинні одягати рекомендований та придатний для таких цілей технологічний одяг (відповідно до вимог системи GMP). Так, у приміщеннях першого класу, де кратність обміну повітря в годину 600-200, одягають стерильний костюм, головний убір повинен повністю закривати волосся, включаючи бороду, і загортатися під комір костюма; на особу одягається маска щоб уникнути влучення часток і краплі в навколишнє середовище; на руки одягають стерилізовані без сипучих матеріалів рукавички з каучуку або пластичних матеріалів, на ступні - стерилізоване або продезінфіковане взуття, включаючи бахіли. Низ штанів підвертають у взуття (як і рукава костюма - у рукавички). Від захисного одягу не повинні попадати в повітря частки й волокна, а сама вона повинна затримувати частки, що надходять від тіла оператора. Зазначений одяг повинен бути разового використання або використатися протягом одного дня, якщо результати перевірки підтверджують таку можливість. Рукавички рекомендується постійно дезінфікувати під час операцій, маски й рукавички необхідно міняти перед кожною робочою процедурою [79].

Обґрунтування підготовки дезінфікуючих засобів

Дезінфекція - це знищення патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів на виробничих об'єктах та в навколишньому середовищі чи видалення їх з них.

В Україні на сьогодні в «Державному реєстрі дезінфекційних засобів» вже зареєстровано понад 800 дезінфектантів та антисептиків. І все ж аналіз показує, що перелік активно-діючих речовин, використаних у рецептурі всього цього переліку – залишається досить обмеженим. Останнім часом при створенні і виробництві дезінфектантів основна увага приділяється розробці багатокомпонентних рецептур, у яких діючі речовини поєднані в оптимальних співвідношеннях, мають широкий спектр антимікробної активності, що забезпечує знищення збудників вірусних та бактеріальних (включаючи вегетативні та спорові форми) інфекцій. Введення у рецептуру дезінфектантів нових модифікованих складових синергічно посилюють антимікробну активність засобів та поліпшують їх миючі властивості, запах, і при цьому не спричиняють руйнування конструктивних матеріалів об'єктів, які обробляються [80].

Згідно із «Державним реєстром лікарських засобів України» за 2020 рік на ринку України зареєстровано 876 дезінфекційних засобів, що використовуються для обробки виробничого устаткування, приміщень, персоналу в різних сферах промисловості, закладах охорони здоров'я та фармацевтичних підприємствах. Частка дезінфекційних засобів, що дозволені до використання на фармацевтичних підприємствах становить 42,46 % (372 найменування з 876), що свідчить про те що, фармацевтична галузь в переважній більшості для обробки виробничих приміщень, устаткування та персоналу використовує засоби іноземного виробництва. Ефективність, безпечність і ціна (доступність) – основний триангулярний трикутник раціонального використання дезінфектантів та ефективного забезпечення належної чистоти фармацевтичного виробництва.

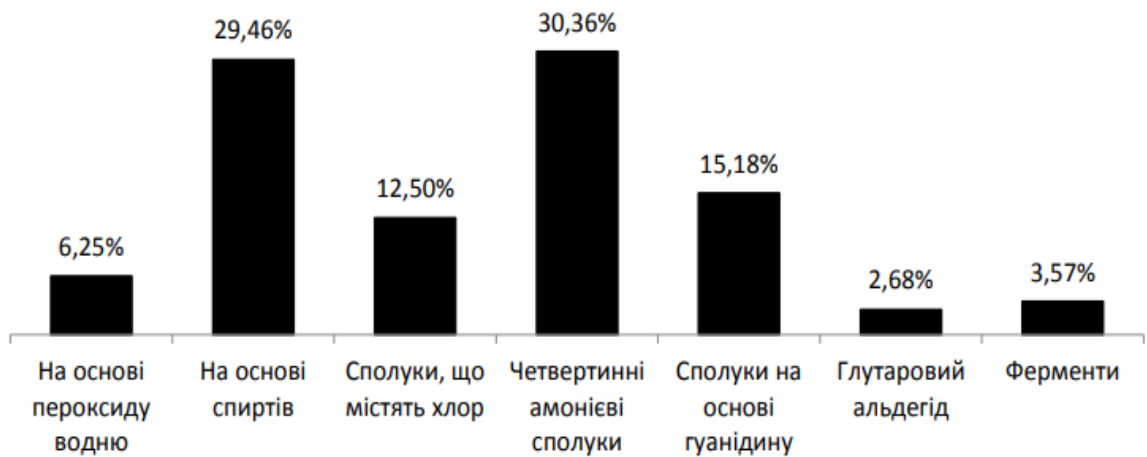


Рис. 7.1. Розподіл продукції дезінфекційних та мийно-дезінфекційних засобів по активним компонентам, % [80].

Тому розглянемо декілька зразків дезінфікуючих засобів з наступним вибором найефективнішого для забезпечення виробництва лікарського препарату з амілазою.

У таблиці 7.1 представлено дезінфекційні засоби, активні речовини яких представляють різні групи дезінфікуючих речовин – додецилбіспропілентриамін, алкілдиметилбензиламоній хлорид, дихлорізоціанурат натрію, дихлор-5,5-диметилгідантоїн, етанол. Незважаючи на те, що згідно із статистикою, представленою на рис. 7.1., продукції на основі спирту найбільше на ринку, такі засоби здебільшого використовують для дезінфекції рук персоналу.

Тому, зважаючи на спектр антимікробної, антифунгальної та антивірусної дії, а також на зручність роботи із засобом (приготування робочого розчину), для дезінфекції обладнання, поверхонь на приміщеннях обираємо засіб Дезактін ТОВ «Делана» на основі 1,3-дихлор-5,5-диметилгідантоїну та 5,5-диметилгідантоїну, адже даний засіб містить дві діючі речовини, що комплексно та ефективно діють на патогенну мікрофлору. Оскільки за використання одного розчину при дезінфекції може виникнути резистентність мікроорганізмів, слід підібрати другий дезінфектант. Обираємо засіб «Хлорель» на основі дихлорізоціанурату

натрію, зважаючи на зручність та економічність його використання – з 1 таблетки виходить 15 л робочого розчину. Також цей засіб ефективний проти збудників туберкульозу, дифтерії, скарлатини, менінгіту, дизентерії, черевного тифу, паратифів та інших сальмонельозів; легіонельозів, лістеріозів, умовно патогенних мікроорганізмів – збудників ВІЛ.

Таким чином, для дезінфекції обладнання, поверхонь на приміщенях обираємо засоби Дезактін та Хлорель.

Порівняльна характеристика дезінфікуючих засобів для забезпечення виробництва лікарського препарату з амілазою

Назва, виробник	Склад засобу	Призначення	Форма випуску	Література
Засіб дезінфікуючий Бланідас Актив, 5000 мл, ТОВ "Лізоформ Медікал"	Додецилбіспропілентриамін (1,3-пропандіамін) – 15,0-20,0%, алкілдиметилбензиламоній хлорид – 10,0-15,0%; допоміжні речовини	Засіб має активність до збудників внутрішньолікарняних інфекцій, інфекцій бактеріальної етіології, інфекцій вірусної етіології, інфекцій грибової етіології, має спороцидні властивості. Дезінфекція, ПСО, ДВР та стерилізація виробів медичного призначення, дезінфекція та очищення всіх видів поверхонь, посуду, санітарно-технічного обладнання тощо.	Концентрат в каністрах	[81]
Дезінфікуючий засіб "Хлорель" 300 таблеток	Дихлорізоціанурат натрію – 99,5 (діюча речовина)%; допоміжна речовина – 0,5%.	Бактерицидні властивості, (включаючи збудників туберкульозу, дифтерії, скарлатини, менінгіту, дизентерії, черевного тифу, паратифів та інших сальмонельозів; легіонельозів, лістеріозів, умовно патогенних мікроорганізмів – збудників ВІЛ). Призначений для дезінфекції поверхонь приміщень (підлога, стіни, у т.ч. з плитковим покриттям, тверді меблі, предмети умеблювання), зовнішніх поверхонь медичних приладів, апаратів та обладнання з лакофарбовим, гальванічним та полімерним покриттям. Норма витрати: 1 таблетка – 15 літрів робочого розчину.	Таблетки 300 шт у банках 1 кг.	[82]

Продовження таблиці 7.1

<p>Дезактін, ТОВ «Делана»</p>	<p>1,3-дихлор-5,5-диметилгідантоїн- 21-23%; 5,5-диметилгідантоїн 12,4-16,4%; диспергатор 9,0-12,%; аніонні поверхнево-активні речовини 3,2-5,0%; інгібітор корозії до 10,0%; наповнювач до 100,0.</p>	<p>Засіб виявляє вірулуцидні, бактерицидні, спороцидні та фунгіцидні властивості. Препарат призначений для дезінфекції та очищення поверхонь усіх видів (приміщення, меблі, прилади, інвентар, посуд, санітарно-технічне обладнання тощо); для дезінфекції, передстерилізаційної очистки, а також суміщених процесів дезінфекції та передстерилізаційної очистки медичних інструментів (у тому числі хірургічних, стоматологічних та ін) з металів, стійких до корозії. Має миючі якості. Зручний для персоналу при приготуванні та використанні. Норма витрати: 100 мл робочого розчину на 1 кв. м оброблюваної площі. Використовується для дезінфекції та одночасного очищення та миття при бактеріальних та вірусних інфекціях у 0,1-0,2% концентраціях при експозиції 60 хвилин, грибкових інфекціях та туберкульозі в 1% концентрації при експозиції 60-90 хвилин.</p>	<p>Порошок у мішках по 10 кг.</p>	<p>[83]</p>
<p>Дезінфекційний засіб "КЛІН СТРИМ" для поверхонь та інструментів, ТОВ «Він Стрім»</p>	<p>Етанол - 70%, 2-пропанол - 2%, бензалконій хлорид - 0,020-0,030%</p>	<p>Засіб виявляє бактерицидні (включаючи збудників внутрішньолікарняних інфекцій, мікобактерій туберкульозу, мульти-резистентного стафілококу (MRSA), ентерогеморагічну кишкову паличку (<i>Escherichia coli</i>), синьогнойну паличку. Засіб призначений для швидкої у часі дезінфекції невеликих за розмірами, а також важкодоступних для обробки об'єктів та інструментів при проведенні поточної та заключної дезінфекції в закладах охорони здоров'я.</p>	<p>Рідина в каністрах по 5 л</p>	<p>[84]</p>

Обґрунтування підготовки вентиляційного повітря

Виробничі приміщення фармацевтичних та медичних підприємств обладнують системами турбулентної і ламінарної вентиляції. У системі подачі вентиляційного повітря у виробничих приміщеннях класів чистоти С 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 [85].

Проектування турбулентно вентильованих чистих приміщень відрізняється від проектування звичайних приміщень з кондиціонуванням повітря деякими особливостями:

- Подавання значно більших об'ємів повітря;
- Використовуються високоефективні 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.

При виробництві стерильної продукції використовують системи ламінарної вентиляції, що забезпечують спрямовані до робочої зони приміщення потоки стерильного повітря (які попередньо проходять через фільтри різного ступеня очищення) і витискують всі механічні і мікробні контамінанти, що знаходяться в повітрі приміщення. Системи ламінарного повітряного потоку повинні забезпечувати рівномірну швидкість руху

повітря: близько 0,30 м/с для вертикального і близько 0,45 м/с для горизонтального потоків. Приміщення з ламінарним потоком — приміщення, у яких повітря подається в напрямку до робочої зони через фільтри, що займають всю стіну або стелю, і видаляється через поверхню, протилежну входів повітря.

Розрізняють дві системи : вертикальний ламінарний потік, при якому повітря рухається вгору через стелю і виходить через ґратчасту підлогу, і горизонтальний ламінарний потік, при якому повітря надходить через одну, а виходить через протилежну перфоровану стінку.

Повітряний потік такого типу здатний відразу видалити аерозольні забруднення, джерелами яких є персонал і процеси виробництва, тоді як система з турбулентної вентиляцією заснована на змішуванні і розведенні самих забруднень [85].

7.3. Обґрунтування вибору підготовки первинної упаковки

Тверді лікарські форми складають приблизно 70% від загального випуску готових лікарських засобів. Тверді лікарські форми пакують в саму різноманітну тару, в тому числі в паперову (конвалют), скляну (банки і флакони), металеву та ін. Найбільш перспективною вважається контурно-чарункове пакування (блістери) [70].

Блістери - це контурно-чарункове пакування, яке виконане з полімерної плівки та фольги алюмінієвої, і має форму близьку до форми капсули. Основна частина капсул і таблеток пакуються тільки таким чином. Блістери виготовляють з полімерної плівки, яка, як правило, утворює достатньо жорсткий каркас. Завдяки таким властивостям вона захищена від механічних пошкоджень, потрапляння вологи і забруднень. Матеріали для виготовлення полімерної плівки можуть бути різні: поліпропілен, поліетилен, полівінілхлорид, полівінілденхлорид та ін., що дає простір для оптимального рішення в залежності від результатів вивчення стабільності лікарських засобів.

В Україні набули подальшого розвитку різні види упаковок. Для збереження якості готових лікарських засобів (ГЛЗ) застосовується первинна та вторинна упаковки. Головний вплив на ГЛЗ має первинна упаковка, оскільки вона безпосередньо контактує з лікарським засобом [70].

За основу було обрано препарат «Креон» (рис. 1.1), що випускається у формі твердих желатинових капсул у флаконі з поліетилену високої щільності (по 1 флакону в картонній коробці) або по 10 капсул у блістері (по 1, 2 чи 3 блістери в картонній коробці) [71].

З огляду на зручність використання зі споживчої точки зору, флакон поступається блістеру, оскільки капсули в блістері краще захищені від механічного впливу, навколишнього середовища, не контактують з повітрям та вологою.

Таким чином, оптимальним варіантом є пакування капсул з амілазою *Bacillus sp. WangLB* є по 10 капсул у 1 блістері, упаковка міститиме по 2 блістера відповідно.

7.4. Обґрунтування вибору підготовки води

Виробництво всіх типів води у фармацевтичній промисловості відноситься до найбільш відповідальних та складних, так званих критичних стадій технологічного процесу [86].

Вода очищена призначена для виготовлення лікарських засобів, крім тих, які мають бути стерильними та апірогенними, якщо немає інших розпоряджень та дозволів компетентного уповноваженого органу. Очищену воду *in bulk* отримують з питної в 99,9% випадків методом зворотного осмосу.

Для забезпечення мікробіологічної чистоти важливо, щоб у системі водопідготовки підтримувався максимальний тиск за мінімальних навантажень. Таким чином у системі створюється перешкода зворотному потоку води. Крім того, виробник повинен забезпечити поточне очищення води такими шляхами: вплив ультрафіолетового випромінювання, що

інактивує ДНК мікробної клітини, що призводить до її загибелі; фільтрація, завдяки якій видаляються частки; підвищення чи зниження температури; озонування циркулюючого потоку [86].

Воду питну отримують з води природних джерел шляхом очищення за допомогою методів, що полягають у коагуляції, осадженні й фільтрації нерозчинних домішок та видалення патогенних мікроорганізмів шляхом аерації, хлорування або кип'ятіння [87].

Вода питна не описана у монографії фармакопеї, але вона має відповідати вимогам щодо якості води, затвердженим компетентним уповноваженим органом. Для підтвердження якості води на виробничій ділянці слід проводити випробування. Вода питна може бути використана у процесах хімічного синтезу та на ранніх стадіях очищення обладнання фармацевтичних виробництв, якщо відсутні особливі технічні вимоги або вимоги щодо застосування води більш високих категорій якості. Вода питна є прийнятним джерелом вихідної води для одержання води фармакопейної якості [88].

Вода очищена – це вода для виготовлення лікарських препаратів, при виробництві яких до води не висувають вимоги щодо стерильності та/або апірогенності. Вода очищена, що задовільно пройшла випробування на ендотоксини, може бути використана при виробництві розчинів для діалізу. Згідно Настанови СТ-Н МОЗУ 42-3.7:2013 «Лікарські засоби. Якість води для застосування у фармації», воду очищену отримують шляхом дистиляції, іонного обміну або іншим підходящим способом з води, що відповідає вимогам затверджених компетентним уповноваженим органом нормативних документів стосовно якості води, призначеної для споживання людиною.

Протягом виробництва та подальшого зберігання належним чином контролюють і відстежують кількість мікроорганізмів. Для простежування несприятливих тенденцій установлюють підходящу межу, що попереджає, і підходящу межу, що вимагає вживання заходів. У нормальних умовах

підхожою межею, що вимагає вживання заходів, є вміст 100 КУО/мл. Визначення проводять методом мембранної фільтрації, використовуючи фільтр із номінальним розміром пор не більше 0.45 мкм, густе живильне середовище R2A агар. Інкубацію проводять при температурі від 30 °С до 35 °С протягом не менше 5 діб [88].

РОЗДІЛ 8. ОПИС ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ЗГІДНО АНД

Основні фізико-хімічні властивості: двокольорові тверді желатинові капсули розміру 2 з коричневою непрозорою кришкою і безбарвним прозорим тілом.

Склад: 1 капсула містить: амілази 5600 од. ЄФ, ліпази 10000 од. ЄФ, протеази 600 од. ЄФ; допоміжні речовини: макрогол 4000, гіпромелози фталат, спирт цетиловий, триетилцитрат, диметикон 1000; капсула тверда: желатин, заліза оксид (Е 172), титану діоксид (Е 171), натрію лаурилсульфат.

Форма випуску. Капсули тверді.

Фармакологічна група. Препарати, що поліпшують травлення, включаючи ферменти. Поліферментні препарати. Код АТХ А09А А02.

Фармакологічні властивості. Містить амілазу мікробного походження у формі вкритих кишковорозчинною оболонкою (стійкою до кислого середовища) мінімікросфер у желатинових капсулах. Капсули швидко розчиняються у шлунку, вивільняючи велику кількість мінімікросфер за мультидозовим принципом, що забезпечує добре перемішування із вмістом шлунка, транспорт зі шлунка разом з його вмістом та після вивільнення гарний розподіл ферментів у вмісті кишечника. Коли мінімікросфери потрапляють до тонкого кишечника, оболонка швидко розчиняється (при рН > 5,5), вивільняючи ферменти з ліполітичною, амілолітичною та протеолітичною активністю, що забезпечує розщеплення жирів, вуглеводів та білків. Продукти панкреатичного травлення після цього всмоктуються або одразу, або після подальшого гідролізу кишечними ферментами.

Фармакокінетика. Дослідження на тваринах не виявили ознак всмоктування ферментів у незміненому вигляді, і тому класичних

					НУХТ БТЕК 02.02.07 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Харченко О.Г.			Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Старовойтова С.О.				91	1192
Реценз.					Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Затверд.		Стабніков В.П.					
РОЗДІЛ 8. ОПИС ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ЗГІДНО АНД							

фармакокінетичних досліджень не проводилося. Добавки ферментів підшлункової залози не потребують всмоктування для досягнення свого ефекту. Навпаки, їхня повна терапевтична дія проявляється у просвіті шлунково-кишкового тракту. Більше того, як білки вони піддаються протеолітичному травленню, проходячи через шлунково-кишковий тракт, перш ніж абсорбуватися у вигляді пептидів та амінокислот.

Дані доклінічних досліджень не вказують на відповідну гостру, субхронічну або хронічну токсичність. Досліджень генотоксичності, канцерогенності або токсичного впливу на репродуктивність не проводилося.

Показання для застосування. Лікування екзокринної недостатності підшлункової залози у дорослих і дітей, яка спричинена різними захворюваннями, в тому числі зазначеними нижче, але не обмеженими цим переліком:

- муковісцидоз;
- хронічний панкреатит;
- панкреатектомія;
- гастректомія;
- операції з накладенням шлунково-кишкового анастомозу (наприклад, гастроентеростомія за Більротом II);
- синдром Швахмана-Даймонда;
- стан після атаки гострого панкреатиту та відновлення ентерального або перорального харчування.

Протипоказання. Гіперчутливість до діючої речовини або до будь-якого іншого компонента препарату. Взаємодія з іншими лікарськими засобами та інші види взаємодій. Дослідження взаємодії не проводилися.

Спосіб застосування та дози. Дозування препарату базується на індивідуальних потребах хворого і залежить від ступеня тяжкості захворювання та складу їжі. Препарат рекомендується приймати під час або

одразу після вживання їжі. Капсули і мінімікросферичні гранули слід ковтати цілими, не розламуючи та не розжовуючи, і запивати достатньою кількістю рідини під час або після прийому їжі, у т. ч. легкої закуски. Якщо пацієнт не може проковтнути капсулу цілою (наприклад, діти і пацієнти літнього віку), її можна обережно розкрити і додати мінімікросферичні гранули до м'якої їжі з кислим середовищем ($\text{pH} < 5,5$), що не вимагає розжовування, або до рідини з кислим середовищем ($\text{pH} < 5,5$).

Це може бути яблучне пюре або йогурт, або фруктовий сік з $\text{pH} < 5,5$, наприклад, яблучний, апельсиновий або ананасовий сік. Таку суміш не слід зберігати. Розламування та розжовування мінімікросферичних гранул або додавання їх до їжі або рідини з $\text{pH} > 5,5$ може руйнувати їх захисну кишкову оболонку. Це може призвести до передчасного вивільнення ферментів у ротовій порожнині, а також до зниження ефективності препарату та подразнення слизових оболонок.

Необхідно контролювати, щоб препарат не залишився у ротовій порожнині. Під час лікування дуже важливим є вживання достатньої кількості рідини, особливо в період її підвищеної втрати. Дефіцит рідини може посилити запори. Будь-яку суміш мінімікросферичних гранул з їжею або рідинами слід прийняти негайно і не зберігати.

Дозування при муковісцидозі.

Базуючись на рекомендаціях Погоджувальної конференції з муковісцидозу (МВ), досліджень “випадок-контроль” Асоціації МВ США та досліджень “випадок-контроль” у Великобританії, можна запропонувати такі загальні рекомендації дозування для замісної терапії ферментами підшлункової залози:

- початкова доза для дітей віком до 4-х років становить 1000 од. ліпази на кілограм маси тіла під час кожного прийому їжі і для дітей віком від 4-х років – 500 од. ліпази на кілограм маси тіла під час кожного прийому їжі;

- дозу слід підбирати індивідуально, залежно від тяжкості захворювання, контролю стеатореї і підтримки належного поживного статусу;

- підтримуюча доза для більшості пацієнтів не повинна перевищувати 10000 од. ліпази на кілограм маси тіла на добу або 4000 од. ліпази на грам спожитого жиру.

Дозування при інших видах екзокринної недостатності підшлункової залози:

- дозу слід підбирати індивідуально, залежно від ступеня порушення травлення і жирового складу їжі. При прийомі їжі необхідними є дози від 25000 до 80000 од. ЄФ ліпази та половина індивідуальної дози при легкій закусці.

Можна застосовувати дітям.

Побічна дія. У ході клінічних досліджень вплив препарату вивчався більше ніж у 900 пацієнтів. Найчастіше повідомлялося про розлади шлунково-кишкового тракту, переважно від легкого до помірного ступеня тяжкості. Побічні реакції, що спостерігалися протягом клінічних досліджень, та їх частота, представлені далі.

З боку шлунково-кишкового тракту: дуже часто ($\geq 1/10$) – біль у животі*; часто ($\geq 1/100$ до $<1/10$) – нудота, блювання, запор, здуття живота, діарея*; невідомої частоти – звуження ілеоцекального відділу кишечника і товстої кишки (фіброзуюча колонопатія).

*Розлади шлунково-кишкового тракту головним чином були пов'язані з існуючим захворюванням. Про діарею та біль у животі повідомлялося з частотою, подібною або меншою, ніж при застосуванні плацебо.

З боку шкіри і підшкірної клітковини: нечасто ($\geq 1/1\ 000$ до $< 1/100$) – висипання; невідомої частоти – свербіж, кропив'янка. З боку імунної системи: невідомої частоти – гіперчутливість (анафілактичні реакції). Повідомлялося про звуження ілеоцекального відділу кишечника і товстої

кишки (фіброзуюча колонопатія) у хворих на муковісцидоз, які приймали високі дози препаратів панкреатину.

Більшість алергічних реакцій, що проявлялися з боку шкіри, але не тільки, були виявлені як побічні реакції протягом післяреєстраційного застосування. Оскільки повідомлення про ці реакції були спонтанними та одержані від невизначеної кількості пацієнтів, точну частоту цих реакцій оцінити неможливо.

Специфічних небажаних реакцій у дітей встановлено не було. Частота, тип та тяжкість небажаних реакцій у дітей, хворих на муковісцидоз, були подібними до таких у дорослих.

Особливості застосування. У хворих на муковісцидоз, які приймали високі дози препаратів панкреатину, спостерігалися звуження ілеоцекального відділу кишечника і товстої кишки (фіброзуюча колонопатія).

Як запобіжний захід рекомендовано у разі появи незвичних абдомінальних симптомів або зміни характеру абдомінальних симптомів звернутися за медичною консультацією, щоб виключити можливість фіброзуючої колонопатії, особливо якщо пацієнт приймає більше 10000 од. ліпази/кг/добу. Препарат слід з обережністю застосовувати у пацієнтів з нирковою недостатністю, гіперурикемією, пацієнтів з алергією до білків свинячого походження.

Умови та термін зберігання. Зберігати при температурі не вище 25 °C у щільно закритій упаковці. Зберігати у недоступному для дітей місці. Термін придатності – 3 роки. Термін придатності після першого розкриття – 6 місяців.

Умови відпуску. Без рецепта.

Упаковка. По 10 капсул у блістері, по 2 блістери в картонній коробці.

Специфікація

на Амілази капсули тверді

Таблиця 8.1

Найменування показника	Допустимі межі	Методи контролю
Опис	Двокольорові тверді желатинові капсули розміру 2 з коричневою непрозорою кришкою і безбарвним прозорим тілом.	За п.1, візуально
Ідентифікація	Препарат володіє амілолітичною активністю	За п. 2
Однорідність дозованих одиниць	Допустиме відхилення 10%	За п. 3, ДФУ, 2.9.40
Супровідні домішки	Не більше 3%	За п.4, ДФУ, 2.2.29
Однорідність маси	Має витримувати випробування	За п.5, ДФУ, 2.9.5
Розчинення	Не менше 75 % від заявленого вмісту	За п.6, ДФУ, 2.9.3
Мікробіологічна чистота	Загальна кількість дріжджових і цвілевих грибів - не більше 10^2 КУО в 1 г (мл) Відсутність <i>Escherichia coli</i> в 1 г (мл) Загальна кількість аеробних мікроорганізмів - не більше 10^4 КУО в 1 г (мл)	За п. 7, ДФУ, 2.6.12
Кількісне визначення	Не менше 90% від заявленої активності	За п. 8
Зберігання	Зберігати при температурі не вище 25 °С у щільно закритій упаковці.	
Термін придатності	Термін придатності – 3 роки. Термін придатності після першого розкриття – 6 місяців.	

Методи контролю

1. Опис. Двокольорові тверді желатинові капсули розміру 2 з коричневою непрозорою кришкою і безбарвним прозорим тілом.

2. Ідентифікація. Препарат володіє амілолітичною активністю.

Розчин сірчаної кислоти. Сірчана кислота концентрована – вода 1:4.

Випробувана суспензія. Точну наважку вмісту капсул, що відповідає заявленій кількості амілази, поміщають в охолоджену до температури від 0 до 4 °С ступку і розтирають з 3 мл охолодженого до температури 5 ± 3 °С фосфатного буферного розчину рН 6,8 (1) до отримання суспензії. За допомогою того ж буферного розчину отриману суспензію кількісно переносять у мірну колбу місткістю 100 мл, додають 60 мл охолодженого фосфатного буферного розчину рН 6,8 (1), ретельно перемішують протягом 15 хв, доводять об'ємний суспензії (1) до позначки.

Стандартна суспензія. Точну наважку стандартного зразка панкреатину, що відповідає заявленій кількості амілази, поміщають в охолоджену до температури від 0 до 4 °С ступку і розтирають з 3 мл охолодженого до температури 5 ± 3 °С фосфатного буферного розчину рН 6,8 (1) протягом хв до отримання тонкої суспензії. За допомогою того ж буферного розчину отриману суспензію кількісно переносять у мірну колбу місткістю 100 мл, додають 60 мл охолодженого фосфатного буферного розчину рН 6,8 (1), ретельно перемішують протягом 15 хв, доводять об'ємний суспензії. (1) до позначки.

У конічну колбу місткістю 250 мл з притертою скляною пробкою поміщають 25 мл 1% розчину крохмалю, 10,0 мл фосфатного буферного розчину рН 6,8 (1) та 1,0 мл 0,2 М розчину натрію хлориду. Колбу закривають, струшують і витримують у водяній бані за температури 25 ± 1 °С. Через 10 хв у колбу додають 1,0 мл випробуваної суспензії, перемішують і повертають на водяну баню. Через 10 хв (точний час) додають 2,0 мл 1 М розчину хлористоводневої кислоти. При безперервному перемішуванні

додають 10,0 мл 0,05 М розчину йоду і 45,0 мл 0,1 М розчину натрію гідроксиду. Суміш витримують у темряві за кімнатної температури протягом 15 хв. Додають 4,0 мл розчину сірчаної кислоти. Надлишок йоду титрують 0,1 М розчином натрію тіосульфату.

Паралельно проводять контрольний досвід за описаною методикою, але 2,0 мл 1 М розчину хлористоводневої кислоти додають перед внесенням суспензії.

Аналогічно проводять визначення зі стандартною суспензією.

3. Однорідність дозованих одиниць. Визначають середню масу зважуванням 20 одиниць дозованої лікарської форми або вмісту 20 індивідуальних упаковок однодозових лікарських форм: зважують кожну одиницю окремо з точністю до 0,001 г, якщо не зазначено інакше у фармакопейній статті або нормативної документації, та розраховують середню.

Зважують непокриту капсулу. Розкривають капсулу і видаляють якомога повніше її вміст. Оболонку м'яких капсул промивають розчинником, зазначеним у фармакопейній статті або нормативній документації, і залишають на повітрі до видалення запаху розчинника. Зважують оболонку. Масу вмісту кожної капсули розраховують як різницю між зважуваннями. Повторюють визначення на 19 капсулах, що залишилися.

4. Супровідні домішки. Рідинна хроматографія (2.2.29). Розчинник В. Розчин 1.73 г/л амонію дигідрофосфату Р, доведений до рН 10.0 аміаку розчином Р, – метанол Р1 – ацетонітрил Р1 (35:35:30).

Випробовуваний розчин. До наважки вмісту капсул, еквівалентної 0.2 г азитроміцину, додають 15 мл розчинника В, струшують, доводять тим самим розчинником до об'єму 25.0 мл і фільтрують крізь нейлоновий фільтр із розміром пор 0.45 мкм.

Розчин порівняння (а). 1.0 мл випробовуваного розчину доводять розчинником В до об'єму 100.0 мл.

Розчин порівняння (b). Вміст віали з ФСЗ азитроміцину для перевірки придатності хроматографічної системи (містить домішки F, H і J) розчиняють у 1.0 мл розчинника В.

Розчин порівняння (c). Готують розчин із концентрацією 8 мг/мл ФСЗ азитроміцину для ідентифікації піка (містить домішки A, B, C, E, F, G, I, J, L, M, N, O й P) у розчиннику В.

Розчин порівняння (d). 1.0 мл розчину порівняння (a) доводять розчинником В до об'єму 10.0 мл.

Колонка:

— розмір: 0.25 м × 4.6 мм;

— нерухома фаза: полімер кремнієорганічний для маспектрометрії аморфний, октадецилсилільний, ендкепований Р (5 мкм)(2);

— температура: 60 °С.

Рухома фаза:

— рухома фаза А: розчин 1.80 г/л динатрію гідрофосфату безводного Р, доведений до рН 8.9 фосфорною кислотою розведеною Р або натрію гідроксиду розчином розведеним Р;

— рухома фаза В: метанол Р1 – ацетонітрил Р1 (25:75);

Швидкість рухомої фази: 1.0 мл/хв. Детектування: спектрофотометрично за довжини хвилі 210 нм. Інжекція: 50 мкл.

Ідентифікація домішок:

— використовують хроматограму, що додається для ідентифікації піка, і хроматограму розчину порівняння (c) для ідентифікації піків домішок A, B, C, E, F, G, I, J, L, M, N, O й P;

— використовують хроматограму, що додається для перевірки придатності хроматографічної системи, і хроматограму розчину порівняння (b) для ідентифікації піка домішки H.

Відносне утримування (час утримування — приблизно 45 хв): домішки L — приблизно 0.29; домішки M — приблизно 0.37; домішки E — приблизно

0.43; домішки F — приблизно 0.51; домішки D — приблизно 0.54; домішки J — приблизно 0.54; домішки I — приблизно 0.61; домішки C — приблизно 0.73; домішки N — приблизно 0.76; домішки H — приблизно 0.79; домішки A — приблизно 0.83; домішки P — приблизно 0.92; домішки O — приблизно 1.23; домішки G — приблизно 1.26; домішки B — приблизно 1.31.

Придатність хроматографічної системи: розчин порівняння (b):

— відношення «пік/западина»: не менше 1.4, де H_p — висота піка домішки J над екстрапольованою базовою лінією; H_v — висота найнижчої точки кривої, яка розділяє пік домішки J і пік домішки F, над екстрапольованою базовою лінією.

Нормування:

— поправкові коефіцієнти: для розрахунку вмісту домішок F, G, H, L, M, N площу піка цих домішок на хроматограмі випробовуваного розчину множать на відповідний поправковий коефіцієнт: для домішки F — 0.3; домішки G — 0.2; домішки H — 0.1; домішки L — 2.3; домішки M — 0.6; домішки N — 0.7;

— домішка B: на хроматограмі випробовуваного розчину площа піка домішки B не має перевищувати двох площ основного піка на хроматограмі розчину порівняння (a) (2.0 %);

— домішки A, C, E, F, H, I, L, M, N, O, P: на хроматограмі випробовуваного розчину площа піка кожної домішки не має перевищувати 0.5 площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (a) (0.5 %);

— сума домішок D і J: на хроматограмі випробовуваного розчину сума площ піків домішок D і J не має перевищувати 0.5 площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (a) (0.5 %);

— будь-яка інша домішка: на хроматограмі випробовуваного розчину площа піка будь-якої іншої домішки не має перевищувати двох площ основного піка на хроматограмі розчину порівняння (d) (0.2 %);

— сума домішок: на хроматограмі випробовуваного розчину сума площ піків усіх домішок не має перевищувати трьох площ основного піка на хроматограмі розчину порівняння (a) (3.0 %);

— не враховують: будь-який пік, що елюється перед домішкою L і після домішки B, і будь-який пік, площа якого не перевищує площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (d) (0.1 %).

5. Однорідність маси.

Капсули мають витримувати випробування на однорідність маси для одиниці дозованого лікарського засобу. Випробування на однорідність маси не вимагається, якщо випробування на однорідність вмісту передбачене для всіх діючих речовин.

6. Розчинення.

Випробування може бути проведене для підтвердження відповідного вивільнення діючої речовини або речовин, наприклад, одним із способів, описаних у статті «Тест «Розчинення» для твердих дозованих форм (ДФУ 2.9.3.).

7. Мікробіологічна чистота. Субстанція повинна бути мікробіологічно чиста. 10,0 г зразка переносять у 100 мл буферного розчину, що містить не більше 5 % твина-80 і нагрітого до температури не вище 40 °С. Після суспендування капсул у буферному розчині проводять кількісне та якісне визначення мікроорганізмів.

8. Кількісне визначення. Визначення проводять методом титриметрії.

Розчин сірчаної кислоти. Сірчана кислота концентрована – вода 1:4.

Випробувана суспензія. Точну наважку вмісту капсул, що відповідає заявленій кількості амілази, поміщають в охолоджену до температури від 0 до 4 °С ступку і розтирають з 3 мл охолодженого до температури 5±3 °С фосфатного буферного розчину рН 6,8 (1) до отримання суспензії. За допомогою того ж буферного розчину отриману суспензію кількісно переносять у мірну колбу місткістю 100 мл, додають 60 мл охолодженого

фосфатного буферного розчину рН 6,8 (1), ретельно перемішують протягом 15 хв, доводять об'ємний суспензії (1) до позначки.

Стандартна суспензія. Точну наважку стандартного зразка панкреатину, що відповідає заявленій кількості амілази, поміщають в охолоджену до температури від 0 до 4 °С ступку і розтирають з 3 мл охолодженого до температури 5 ± 3 °С фосфатного буферного розчину рН 6,8 (1) протягом хв до отримання тонкої суспензії. За допомогою того ж буферного розчину отриману суспензію кількісно переносять у мірну колбу місткістю 100 мл, додають 60 мл охолодженого фосфатного буферного розчину рН 6,8 (1), ретельно перемішують протягом 15 хв, доводять об'ємний суспензії. (1) до позначки.

У конічну колбу місткістю 250 мл з притертою скляною пробкою поміщають 25 мл 1% розчину крохмалю, 10,0 мл фосфатного буферного розчину рН 6,8 (1) та 1,0 мл 0,2 М розчину натрію хлориду. Колбу закривають, струшують і витримують у водяній бані за температури 25 ± 1 °С. Через 10 хв у колбу додають 1,0 мл випробуваної суспензії, перемішують і повертають на водяну баню. Через 10 хв (точний час) додають 2,0 мл 1 М розчину хлористоводневої кислоти. При безперервному перемішуванні додають 10,0 мл 0,05 М розчину йоду і 45,0 мл 0,1 М розчину натрію гідроксиду. Суміш витримують у темряві за кімнатної температури протягом 15 хв. Додають 4,0 мл розчину сірчаної кислоти. Надлишок йоду титрують 0,1 М розчином натрію тіосульфату.

Паралельно проводять контрольний досвід за описаною методикою, але 2,0 мл 1 М розчину хлористоводневої кислоти додають перед внесенням суспензії.

Аналогічно проводять визначення зі стандартною суспензією.

ВИСНОВКИ

1. Зважаючи на високу активність ферменту та найнижчу вартість поживного середовища, найкращим продуцентом амілази серед вищенаведених є штам *Bacillus* sp. WangLB.

2. За результатами експериментальної частини та техніко-економічного розрахунку, потреба в амілазі для лікування 4950 хворих на хронічний панкреатит у м. Києві становить 814 968 000 Од. Річна потужність виробництва становить 38 196 л культуральної рідини за 38 трудоднів. Геометричний об'єм ферментера становить 5 м³ при коефіцієнті заповнення 0,5.

3. Оптимальним варіантом є пакування капсул з амілазою *Bacillus* sp. WangLB є по 10 капсул у 1 блістері, упаковка міститиме по 2 блістера відповідно.

4. Розроблено апаратурну та технологічну схеми виділення та очищення субстанції, а також виробництва препарату на основі амілази штаму *Bacillus* sp. WangLB у формі капсул, що передбачають такі стадії як відділення біомаси, висолювання, відділення осаду, концентрування, висушування, подрібнення та просіювання, фасування, пакування, маркування, відвантаження.

5. Здійснено опис капсул з амілазою згідно АНД за такими показниками: опис, ідентифікація, однорідність дозованих одиниць, супровідні домішки, однорідність маси, розчинення, мікробіологічна чистота, кількісне визначення, зберігання та термін придатності.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Bharathiraja S., Suriya J., Krishnan M., Manivasagan P., Kim S.-K. Production of Enzymes From Agricultural Wastes and Their Potential Industrial Applications. *Advances in Food and Nutrition Research*. 2017: 125–148. doi:10.1016/bs.afnr.2016.11.003.
2. Al-Johani N., Al-seeni Madeha N., Ahmed Y. M. Optimization of alkaline α -amylase production by thermophilic *Bacillus subtilis*. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*. 2016, 14(1): 288–301. doi:10.21010/ajtcam.v14i1.31.
3. Кубрак О. І., Лушак В. І. Оптимізація умов іммобілізації α -амілази з *Bacillus* sp. ВКЛ20 у $[\text{Ca}^{2+}]$ -альгінатних кульках. *Український біохімічний журнал*. 2008, 80 (6): 32-41.
4. Кубрак О. І., Лушак В. І. Одержання і властивості α -амілази з *Bacillus* sp. ВКЛ40. *Біотехнологія*. 2009, 2 (1): 69-79.
5. Борзова Н. В., Гудзенко О. В., Варбанець Л. Д. Грибні амілолітичні ензими та їх дія на нерозчинні субстрати. *Biotechnology*. 2010, 3 (6): 36-41.
6. Авдюк Е.В., Варбанець Л.Д., Сафронова Л.А., Харкевич Е.С. Очистка α -амилаз *Aspergillus flavus* var. *oryzae* и *Bacillus subtilis* и их свойства. *Биотехнология*. 2012, 5 (5): 091-099.
7. Авдіюк К.В., Варбанець Л.Д. α -Амілази *Aspergillus flavus* var. *oryzae* і *Bacillus subtilis*: субстратна специфічність та стійкість до низки хімічно активних речовин. *BIOTECHNOLOGIA ACTA*. 2013, 6 (3): 36-45.
8. Авдіюк К.В., Варбанець Л. Д., Зелена П. П., Шепелевич В. В. Фізико-хімічні властивості α -амілази *Achromobacter* sp. 7a. *Мікробіол. журн*. 2016, 78 (1): 23-32.
9. Ma Y., Shen W., Chen X., Liu L., Zhou Z., Xu F., Yang H. Significantly enhancing recombinant alkaline amylase production in *Bacillus subtilis* by integration of a novel mutagenesis-screening strategy with systems-level

fermentation optimization. *Journal of Biological Engineering*. 2016, 10(1). doi:10.1186/s13036-016-0035-2.

10. Salman T., Kamal M., Ahmed M., Siddiqa S.M., Khan R.A., Hassan A. Medium optimization for the production of amylase by *Bacillus subtilis* RM16 in Shake-flask fermentation. *Pakistan J. Of Pharmaceutical Sciences*. 2016, 29(2): 439-444.

11. Wang S., Jeyaseelan J., Liu Y., Qin W. Characterization and Optimization of Amylase Production in WangLB, a High Amylase-Producing Strain of *Bacillus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2016, 180(1): 136–151. doi:10.1007/s12010-016-2089-5.

12. Elumalai P., Lim J.-M., Park Y.-J., Cho M., Shea P. J., Oh B.-T. Enhanced amylase production by a *Bacillus subtilis* strain under blue light-emitting diodes. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*. 2019, 1–8.

13. Ojha S. K., Singh P. K., Mishra S., Pattnaik R., Dixit S., Verma S. K. Response surface methodology based optimization and scale-up production of Amylase from a novel bacterial Strain, *Bacillus aryabhatai* KIIT BE-1. *Biotechnology Reports*. 2020, e00506. doi:10.1016/j.btre.2020.e00506.

14. Zhang K., Tan R., Yao D., Su L., Xia Y., Wu J. Enhanced Production of Soluble *Pyrococcus furiosus* α -Amylase in *Bacillus subtilis* through Chaperone Co-Expression, Heat Treatment and Fermentation Optimization. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2021, 31(4): 570–583.

15. Pasin T. M., Benassi V. M., Heinen P. R., Damasio A. R. de L., Cereia M., Jorge J. A., Polizeli M. de L. T. de M. Purification and functional properties of a novel glucoamylase activated by manganese and lead produced by *Aspergillus japonicus*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2017, 102: 779–788. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.04.016.

16. Izmirliloglu G., Demirci A. Strain selection and medium optimization for glucoamylase production from industrial potato waste by *Aspergillus niger*.

Journal of the Science of Food and Agriculture. 2015, 96(8): 2788–2795. doi:10.1002/jsfa.7445.

17. Hua H., Luo H., Bai Y., Wang K., Niu C., Huang H., Yao B. A Thermostable Glucoamylase from *Bispora* sp. MEY-1 with Stability over a Broad pH Range and Significant Starch Hydrolysis Capacity. *PLoS ONE*. 2014, 9(11): e113581. doi:10.1371/journal.pone.0113581.

18. Luo H., Liu H., He Z., Zhou C., Shi Z. Efficient and Cost-Reduced Glucoamylase Fed-Batch Production with Alternative Carbon Sources. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2015, 25(2): 185–195.

19. Erich S., Kuschel B., Schwarz T., Ewert J., Böhmer N., Niehaus F., Fischer L. Novel high-performance metagenome β -galactosidases for lactose hydrolysis in the dairy industry. *Journal of Biotechnology*. 2015, 210: 27–37.

20. Zhao Q., Liu F., Hou Z., Yuan C., Zhu X. High Level Production of β -Galactosidase Exhibiting Excellent Milk-Lactose Degradation Ability from *Aspergillus oryzae* by Codon and Fermentation Optimization. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2014, 172(6): 2787–2799. doi:10.1007/s12010-013-0684-2.

21. Xu J.-L., Zhao J., Wang L.-F., Sun H.-Y., Song C.-L., Chi Z.-M. Enhanced β -Galactosidase Production from Whey Powder by a Mutant of the Psychrotolerant Yeast *Guehomyces pullulans* 17–1 for Hydrolysis of Lactose. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2011, 166(3): 599–611. doi:10.1007/s12010-011-9451-4.

22. Liu P., Xie J., Liu J., Ouyang J. A novel thermostable β -galactosidase from *Bacillus coagulans* with excellent hydrolysis ability for lactose in whey. *Journal of Dairy Science*. 2019. doi:10.3168/jds.2019-16654.

23. Singh R. S., Singh T., Hassan M., Kennedy J. F. Updates on Inulinases: Structural aspects and biotechnological applications. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020.

24. Nascimento D. S., Valasques Junior G., Fernandes P., Ribeiro G. C. A., Lima D. M., Góes-Neto A., Assis S. A. de. Production, characterization and application of inulinase from fungal endophyte CCMB 328. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*. 2012, 84(2): 443–454. doi:10.1590/s0001-37652012005000035.

25. Mansouri S., Houbraken J., Samson R. A., Frisvad J. C., Christensen M., Tuthill D. E., Lankinen P. *Penicillium subrubescens*, a new species efficiently producing inulinase. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2013, 103(6): 1343–1357. doi:10.1007/s10482-013-9915-3.

26. Paixão S. M., Teixeira P. D., Silva T. P., Teixeira A. V., Alves L. Screening of novel yeast inulinases and further application to bioprocesses. *New Biotechnology*. 2013, 30(6): 598–606. doi:10.1016/j.nbt.2013.02.002.

27. Flores-Gallegos A. C., Contreras-Esquivel J. C., Morlett-Chávez J. A., Aguilar C. N., Rodríguez-Herrera R. Comparative study of fungal strains for thermostable inulinase production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2015, 119(4): 421–426.

28. Rawat H. K., Ganaie M. A., Kango N. Production of inulinase, fructosyltransferase and sucrase from fungi on low-value inulin-rich substrates and their use in generation of fructose and fructo-oligosaccharides. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2015, 107(3): 799–811. doi:10.1007/s10482-014-0373-3.

29. Фермент ліпаза: аналіз галузей використання, продуцентів, способів одержання / Л. О. Пєскова, Н. В. Дехтяренко // Наукові вісті Національного технічного університету України "Київський політехнічний інститут". - 2014. - № 3. - С. 63-72.

30. Tembhurkar V. R., Kulkarni M. B., Peshwe S. A. Optimization of Lipase Production by *Pseudomonas* spp. in submerged batch process in shake flask culture. *Science Research Reporter*. 2012, 2(1):46-50.

31. De Almeida A. F., Tauk-Tornisielo S. M., Carmona E. C. Acid Lipase from *Candida viswanathii*: Production, Biochemical Properties, and Potential

Application. *BioMed Research International*. 2013: 1–10.
doi:10.1155/2013/435818.

32. Asih D. R., Alam Z., Salleh N., Salihu A. Pilot-Scale Production of Lipase Using Palm Oil Mill Effluent as a Basal Medium and Its Immobilization by Selected Materials. *Journal of Oleo Science*. 2014, 63(8): 779–785.
doi:10.5650/jos.ess13187.

33. Ameri A., Shakibaie M., Sahami Z., Khoobi M., Forootanfar H. Statistical optimization of cultural medium composition of thermoalkalophilic lipase produced by a chemically induced mutant strain of *Bacillus atrophaeus* FSHM2. *3 Biotech*. 2019, 9(7). doi:10.1007/s13205-019-1789-2.

34. Wang Y., Chen S., Zhao X., Zhang Y., Wang X., Nie Y., Xu Y. Enhancement of the production of *Bacillus naganoensis* pullulanase in recombinant *Bacillus subtilis* by integrative expression. *Protein Expression and Purification*. 2019. doi:10.1016/j.pep.2019.03.006.

35. Chi L., Wei J., Hou J., Wang J., Hu X., He P., Wei T. Optimizing the DO-stat protocol for enhanced production of thermostable pullulanase in *Escherichia coli* by using oxygen control strategies. *Journal of Food Biochemistry*. 2020. doi:10.1111/jfbc.13173.

36. Meng F., Zhu X., Zhao H., Lu F., Lu Y., Lu Z. Improve Production of Pullulanase of *Bacillus subtilis* in Batch and Fed-Batch Cultures. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2020, 193(1): 296–306. doi:10.1007/s12010-020-03419-2.

37. Kumar R., Singh S., Singh O. V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2008, 35(5): 377–391. doi:10.1007/s10295-008-0327-8.

38. Kshirsagar S. D., Saratale G. D., Saratale R. G., Govindwar S. P., Oh M. K. An isolated *Amycolatopsis* sp. GDS for cellulase and xylanase production using

agricultural waste biomass. *Journal of Applied Microbiology*. 2015, 120(1): 112–125. doi:10.1111/jam.12988.

39. Йовенко АС. Целюлозолітична активність гриба-антагоніста *Chaetomium cochliodes*, біоагента мікробного препарату Хетоміка. *Сільськогосподарська мікробіологія*. 2016, 24: 18-23.

40. Zhang D., Luo Y., Chu S., Zhi Y., Wang B., Zhou P. Enhancement of Cellulase and Xylanase Production Using pH-Shift and Dissolved Oxygen Control Strategy with *Streptomyces griseorubens* JSD-1. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2015, 178(2): 338–352. doi:10.1007/s12010-015-1875-9.

41. Lin C., Shen Z., Qin W. Characterization of Xylanase and Cellulase Produced by a Newly Isolated *Aspergillus fumigatus* N2 and Its Efficient Saccharification of Barley Straw. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2016, 182(2): 559–569. doi:10.1007/s12010-016-2344-9.

42. Anu Kumar, S., Kumar A., Kumar V., Singh B. Optimization of cellulase production by *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* JJBS300 and biocatalytic potential in saccharification of alkaline-pretreated rice straw. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*. 2020: 1–8. doi:10.1080/10826068.2020.1852419.

43. Сучасні ферментні препарати: запорука ефективного лікування ферментної недостатності [Електронний ресурс] // Еженедельник АПТЕКА. – 2016. – № 45 (1066). – Режим доступу: <http://www.apteka.ua/article/391886> .

44. ВЗАЄМОЗАМІНА ФЕРМЕНТНИХ ПРЕПАРАТІВ [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://xn--h1adc2i.xn--j1amb/news/120218-5.html> .

45. Мезим® капсули: сучасна формула комплексу панкреатичних ферментів [Електронний ресурс] Режим доступу: [https://health-ua.com/multimedia/userfiles/files/2020/ZU_17_2020/ZU_17_2020_st3\(1\).pdf](https://health-ua.com/multimedia/userfiles/files/2020/ZU_17_2020/ZU_17_2020_st3(1).pdf) .

46. Маменко М. Є. Застосування препаратів панкреатичної ліпази без ентеросолубільної оболонки в клінічній практиці. *Scientific Journal of the Ministry of Health of Ukraine*. 2014, 2 (6): 135-139.

47. Ефективність штамів з β -галактозидажною активністю у технологіях ферментованих молочних продуктів / С. П. Вежлівцева, А. В. Мінорова, Н. Л. Крушельницька, С. А. Наріжний // Підприємництво, торгівля, маркетинг: стратегії, технології та інновації. електронне видання: матеріали IV Міжнар. наук.-практ. конф. (Київ, 27 травня 2021 р.) / . – Київ: Київський нац. торг.-екон. ун-т, 2021 .– С. 134-136.

48. Потемська О.І., Кігель Н.Ф., Даниленко С.Г., Копилова К.В. β -галактозидазна активність бактерій як критерій відбору штамів до складу бактеріальних препаратів. Харчова наука і технологія. 2017. 11(3). Р. 35-40. doi.org/10.15673/fst.v11i3.604.

49. Патент № 60116 Україна U МПК А23С 21/00 Спосіб виробництва низьколактозного біфідовмісного йогурту функціонального призначення, заявл. 25.11.2010, опубл. 10.06.2011, Бюл.№ 11. Заявник: Одеська національна академія харчових технологій.

50. Патент №115612 Україна С2 МПК А23С 9/12, А23С9/127 Спосіб виробництва продукту кисломолочного низьколактозного, заявл. 09.03.2016, опубл. 27.11.2017, Бюл. № 22 Заявник: Інститут продовольчих ресурсів.

51. Патент № 30077 Україна U МПК (2006) А23С21/00 Композиція для йогурту діабетичного призначення, заявл. 18.10.2007. Заявник: Одеська національна академія харчових технологій.

52. Біотехнологічні аспекти застосування штамів з β -галактозидажною активністю у виробництві ферментованих молочних продуктів / А. В. Мінорова, Т. В. Рудакова, Н. Л. Крушельницька та ін. // Продовольчі ресурси: зб. наук. пр. Ін-т прод. ресурсів НААН України .- К.: ТОВ «БАРМИ», 2021 .- Т. 9, №16 .– С. 117 - 134. doi.org/10.31073/foodresources2021-16-12.

53. Новаковська В. Ю. Вплив мультиензимної композиції целюлозолітичних та амілолітичних ферментів на засвоєння вуглеводів в організмі свиней : автореф. дис. канд. с.-г. наук, спец. 06.02.02 / В. Ю.

Новаковська, наук. кер. Л. П. Чернолата ; Мін-во освіти і науки України, Білоцерків. нац. аграр. ун-т. - Б. Церква, 2020. - 20 с. - Бібліогр. : с. 15-17.

54. Пат. RU2276974C2 Лекарственное средство "гастропек" для улучшения процессов пищеварения и способ его применения/ Бравова Г. Б., Шишкова Э. А., Смирнова Т. Е., Бурмистрова В. В., Нестеренко Е. А., Полетаева О. А. Опубл. 27.05.2006.

55. Клінічна фармакологія лікарських засобів для лікування захворювань органів травлення : навчально-методичний посібник / Яковлева О.О., Півторак К.В., Феджага І.В. – Вінниця : Нова Книга, 2014. – 288 с.

56. Спосіб застосування та відгуки про фестал при вагітності [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://fromus.kiev.ua/?p=38664> .

57. Бруслик Н.Л., Каюмов А.Р., Богачев М.И., Яруллина Д.Р. Сравнительная характеристика амилолитической активности грамположительных бактерий // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2014. – №2. – С. 47-51.

58. Gopinath Subash C. B., Anbu Periasamy, Arshad M. K. Md, Lakshmipriya Thangavel, Voon Chun Hong, Hashim Uda, Chinni Suresh V. Biotechnological Processes in Microbial Amylase Production. *BioMed Research International*. 2017: 1–9. doi:10.1155/2017/1272193.

59. Хронічний калькульозний панкреатит: особливості перебігу на Закарпатті / Коваль В.Ю. // Проблеми клінічної педіатрії. - № 1-2 (31-32). – 2016. – С. 95-98.

60. Панкреатин 8000 таблетки гастрорезист. №50 (10x5) [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://tabletki.ua/%D0%9F%D0%B0%D0%BD%D0%BA%D1%80%D0%B5%D0%B0%D1%82%D0%B8%D0%BD-8000/3950/>.

61. Хронічний панкреатит [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://compendium.com.ua/uk/tutorials-uk/vnutrishnya-meditsina/4-rozdil-zakhvoriuvannia-orhaniv-travlennia/4-13-hronichnij-pankreatit/>.

62. Bharathiraja S., Suriya J., Krishnan M., Manivasagan P., Kim S.-K. Production of Enzymes From Agricultural Wastes and Their Potential Industrial Applications. *Advances in Food and Nutrition Research*. 2017: 125–148. doi:10.1016/bs.afnr.2016.11.003.

63. Сучасні ферментні препарати: запорука ефективного лікування ферментної недостатності [Електронний ресурс] // Еженедельник АПТЕКА. – 2016. – № 45 (1066). – Режим доступу: <http://www.apteka.ua/article/391886> .

64. Мезим® капсули: сучасна формула комплексу панкреатичних ферментів [Електронний ресурс] Режим доступу: [https://health-ua.com/multimedia/userfiles/files/2020/ZU_17_2020/ZU_17_2020_st3\(1\).pdf](https://health-ua.com/multimedia/userfiles/files/2020/ZU_17_2020/ZU_17_2020_st3(1).pdf) .

65. Маменко М. Є. Застосування препаратів панкреатичної ліпази без ентеросолюбильної оболонки в клінічній практиці. *Scientific Journal of the Ministry of Health of Ukraine*. 2014, 2 (6): 135-139.

66. Фермент ліпаза: аналіз галузей використання, продуцентів, способів одержання / Л. О. Пескова, Н. В. Дехтяренко // Наукові вісті Національного технічного університету України "Київський політехнічний інститут". - 2014. - № 3. - С. 63-72.

67. Спосіб застосування та відгуки про фестал при вагітності [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://fromus.kiev.ua/?p=38664> .

68. Чубка М. Б. Вивчення асортименту допоміжних речовин, які використовують у капсулах, зареєстрованих в Україні / М. Б. Чубка // Фармацевтичний часопис. - 2014. - № 3. - С. 113-117.

69. Промислова технологія лікарських засобів: базовий підручник для студ. вищ. навч.закладу (фармац. ф-тів) / Є. В. Гладух, О. А. Рубан, І. В. Сайко [та ін.] - Х. : НФаУ : Оригінал, 2016. - 632 с.

70. Фармацевтичні упаковки на основі фенол-формальдегідного полімеру / І. І. Становська, І. А. Кравченко, Є. О. Науменко, Д. А. Монова // Моделювання в приклад. наук. дослідж. : матеріали XXVIII семінару / Одес. нац. політехн. ун-т. - Одеса, 2020. - С. 35-39.

71. Креон 10000 капсули тв. з гастрорезист. гран. по 150 мг №20 (10x2)
[Електронний ресурс] Режим доступу:
<https://tabletki.ua/uk/%D0%9A%D1%80%D0%B5%D0%BE%D0%BD-10000/31904/#%D0%9F%D0%BE%D0%BA%D0%B0%D0%B7%D0%B0%D0%BD%D0%BD%D1%8F>.

72. Мікробні α -амілази: виділення, властивості, практичне застосування / Л. Д. Варбанець, К. В. Авдіюк, Н. В. Борзова // *Biotechnology*. - 2008. - Vol. 1, № 2. - С. 39-51.

73. Abdullah Roheena; Ikram-ul-Haq. Purification and characterisation of α -amylase produced by mutant strain of *Aspergillus oryzae* EMS-18. *Natural Product Research*. 2015, 29(8): 710–716. doi:10.1080/14786419.2014.982648.

74. Центрифугування [Електронний ресурс] Режим доступу:
<http://medical-enc.com.ua/centrifugation.htm>.

75. Карлаш Ю. В., Омельчук Є. О. Основи проектування біотехнологічних виробництв: конспект лекцій для здобувачів освітнього ступеня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» освітньо-професійної програми «Біотехнологія» денної та заочної форм навчання / Ю. В. Карлаш, Є. О. Омельчук. – К.: НУХТ, 2019. – 252 с.

76. Конспект лекцій до розділу «Механічні процеси» з курсу —Процеси та апарати хімічних виробництв» для студентів III-IV курсів механічних спеціальностей / Укл. С.О. Опарін. – Дніпропетровськ: ДВНЗ УДХТУ, 2012. – 112 с.

77. Лич І.В. Промислова технологія лікарських засобів [Електронний ресурс]: конспект лекцій для студ. освітнього ступеня бакалавр спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» ден. та заоч. форм навч. / І.В. Лич. – К.: НУХТ, 2017. – 323 с.

78. Державна Фармакопея України : в 3 т. / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». —

2-е вид. — Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015. — Т. 1. — 1128 с.

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

80. Шерстюк Л. С. Перспективи розробки вітчизняних миючих та дезінфікуючих засобів для фармацевтичної промисловості [Електронний ресурс] / Л. С. Шерстюк, К. С. Ящук, Р. В. Качан // Технології та дизайн. - 2020. - № 4 (37).

81. Засіб дезінфікуючий Бланідас Актив, 5000 мл [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.dzo.com.ua/tenders/catalog/products/2445-TVLI-4820129630331-867445> .

82. Дезінфікуючий засіб "Хлорель" 300 таблеток [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.dzo.com.ua/tenders/catalog/products/2445-KHLO-4820090750274-637912>

83. Дезактин в мішках, 10 кг [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://hlorka.in.ua/ua/p766601232-dezaktin-meshkah.html>

84. Дезінфекційний засіб "КЛІН СТРИМ" для поверхонь та інструментів каністра 5 л кг [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.dzo.com.ua/tenders/catalog/products/2445-KLIN-4820188175972-646325>

85. Чорний М.В. Система підготовки повітря для медичних та фармацевтичних підприємств [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://conferences.vntu.edu.ua/index.php/all-fbtegp/all-fbtegp-2017/paper/view/2455> .

86. Водоподготовка, подготовка воздуха на фармацевтическом производстве [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://www.apteka.ua/article/30829> .

87. ВОДА ОЧИЩЕНА [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/1785/voda-ochishhena#:~:text=%D0%92%D0%BE%D0%B4%D1%83%20%D0%BF%D0%B8%D1%82%D0%BD%D1%83%20%D0%BE%D1%82%D1%80%D0%B8%D0%BC%D1%83%D1%8E%D1%82%D1%8C%20%D0%B7%20%D0%B2%D0%BE%D0%B4%D0%B8,%2C%20%D1%85%D0%BB%D0%BE%D1%80%D1%83%D0%B2%D0%B0%D0%BD%D0%BD%D1%8F%20%D0%B0%D0%B1%D0%BE%20%D0%BA%D0%B8%D0%BF%D1%8F%D1%82%D1%96%D0%BD%D0%BD%D1%8F>.

88. Настанова СТ-Н МОЗУ 42-3.7:2013.-. Лікарські засоби. Якість води для застосування у фармації.