

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

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

«До захисту в ЕК»
Директор інституту(декан факультету)
Наталія ГРЕГІРЧАК
(підпис) (ім'я та прізвище)

« ___ » лютий 2023 р.

«До захисту допущено»
Завідувач кафедри
Віктор СТАБНІКОВ
(підпис) (ім'я та прізвище)

« ___ » лютий 2021 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ МАГІСТРА

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код та назва спеціальності)

освітньо-професійної програми «Фармацевтична біотехнологія»

на тему: Мікробні олігосахариди як компоненти пребіотиків

Виконав: здобувач 2 курсу, групи 2

Максимець Олександра Олександрівна
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник Грегірчак Наталія Миколаївна
(прізвище, ім'я та по батькові повністю) (підпис)

Консультанти _____
(ім'я та прізвище) (підпис)

_____ (ім'я та прізвище) (підпис)

_____ (ім'я та прізвище) (підпис)

Рецензент Галина КУЗНЄЦОВА
(ім'я та прізвище) (підпис)

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

Здобувач _____
(підпис)

Київ – 2023 р

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь магістр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

Освітньо-професійна програма «Фармацевтична біотехнологія»

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і
мікробіології

Віктор СТАБНІКОВ

“ 01 ” листопада 2022 року

З А В Д А Н Н Я НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

Максимець Олександра Олександрівна

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Мікробні олігосахариди як компоненти
пребіотиків

керівник роботи Грегірчак Наталія Миколаївна, к.т.н., доцент,
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від 31 жовтня 2022 року № 780-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 03.02.2022

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент *Aureobasidium pullulans* іре-3,
олігосахариди, пребіотичний препарат на основі
фруктоолігосахаридів

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

РОЗДІЛ 1. Характеристика мікробних олігосахаридів як пребіотиків. РОЗДІЛ
2. Біотехнологія одержання мікробних олігосахаридів. РОЗДІЛ 3. Техніко-
економічне обґрунтування виробництва лікарського засобу. РОЗДІЛ 4.
Обґрунтування вибору технологічної схеми. РОЗДІЛ 5. Підбір
технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях
отримання субстанції. РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання. РОЗДІЛ 7. Опис
технологічної схеми (субстанція та ЛЗ). РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва
субстанції для ЛЗ. РОЗДІЛ 9. Опис лікарського засобу згідно АНД (проект
АНД).

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема виробництва – 1 аркуш формату А1 та Апаратурна схема
виробництва – 1 аркуш формату А1

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 01 листопада 2022 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Огляд літератури. Характеристика мікробних олігосахаридів як пребіотиків	01.11.22-13.12.22	
2	Огляд літератури. Біотехнологія одержання мікробних олігосахаридів	14.12.22-04.12.22	
3	Техніко-економічне обґрунтування виробництва лікарського засобу	04.12.22-11.12.22	
4	Обґрунтування вибору технологічної схеми	12.12.22-25.12.22	
5	Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях отримання субстанції та ЛЗ	25.12.22-28.12.22	
6	Специфікація обладнання	28.12.22-31.12.22	
7	Опис технологічної схеми (субстанція та ЛЗ)	01.01.23-05.01.23	
8	Контроль виробництва субстанції для ЛЗ	05.01.23-09.01.23	
9	Опис лікарського засобу згідно АНД (проект АНД)	09.01.23-12.01.23	
10	Висновки. Оформлення пояснювальної записки	12.01.23-14.01.23	
11	Графічна частина проекту. Технологічна схема	14.01.23-22.01.23	
12	Графічна частина проекту. Апаратурна схема	22.01.23-31.01.23	

Здобувач

(підпис)

Олександра МАКСИМЕЦЬ

(ім'я та прізвище)

Керівник роботи

(підпис)

Наталія ГРЕГІРЧАК

(ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Дипломний проєкт присвячено розробці біосинтезу олігосахаридів з використанням продуцента *Aureobasidium pullulans* для одержання пребіотичного препарату для підтримання нормальної мікрофлори кишківника.

Технологічний процес складається з допоміжних робіт (підготовка вентиляційного повітря, санітарна підготовка виробництва (мийних та дезінфікуючих засобів), підготовка виробничих приміщень, обладнання, персоналу та приготування розчину магній оксиду), технологічний процес (зберігання культуральної рідини, центрифугування, концентрація та очищення за допомогою хроматографії, змішування з розчином магній оксиду, сушіння в киплячому шарі, подрібнення та просіювання), етап пакування маркування та відвантаження цільового продукту та стадії знешкодження рідких, твердих та газоподібних відходів. Було проведено техніко-економічний розрахунок потреби у пребіотичному препараті на основі фруктоолігосахаридів для населення Європи, які мають хворобу Крона. Особливістю виділення фруктоолігосахаридів є етапи використання SMB-хроматографії та додавання магнію оксиду до розчину з ФОС перед пневматичною сушаркою з киплячим шаром..

Дипломний проєкт складається з вступу, дев'яти розділів, п'ятнадцяти таблиць, восьми рисунків та графічної частини (однієї технологічної схеми – формату A1, однієї апаратурної схеми – формату A1), списку використаних джерел (167), висновків та додатків. Загальний обсяг роботи – 147 сторінок.

Ключові слова: олігосахариди, фруктоолігосахариди, пребіотик, *Aureobasidium pullulans*, виділення, хроматографія, магній оксид, сушіння.

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	3
ВСТУП	8
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА МІКРОБНИХ ОЛІГОСАХАРИДІВ ЯК ПРЕБІОТИКІВ.....	10
1.1. Роль олігосахаридів у формуванні нормальної мікрофлори людини	10
1.2. Застосування олігосахаридів в якості пребіотика для людини.....	14
РОЗДІЛ 2. БІОТЕХНОЛОГІЯ ОДЕРЖАННЯ МІКРОБНИХ ОЛІГОСАХАРИДІВ	18
2.1 Особливості одержання фруктоолігосахаридів	18
2.2. Роль мікробних β -галактозидаз в отриманні галактоолігосахаридів	23
2.3. Продукція ксилоолігосахаридів та мананоолігосахаридів на різних джерелах вуглецю.....	27
2.4. Стан дослідження пребіотиків вітчизняними вченими	31
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВА ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ.....	36
3.1. Обґрунтування біосинтетичної здатності біологічного агента для отримання субстанції.....	36
3.2. Аналіз фармакологічних властивостей цільового ЛЗ, галузей використання, потреби у ЛЗ.....	43
3.3 Розрахунок потреби у субстанції для випуску ЛЗ та розрахунок річної потреби у культуральній рідині для одержання розрахованої кількості субстанції.....	47
3.4. Розрахунок річної потужності виробництва ЛЗ та кількості серій на рік.	49
РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	50
4.1 Обґрунтування стадій виділення та очищення цільового продукту	50
4.2. Вибір способу відокремлення біомаси та відповідного обладнання	51

4.3. Вибір способу очищення та концентрування фруктоолігосахаридів та відповідного обладнання.....	53
4.4. Вибір способу сушіння фруктоолігосахаридів та відповідного обладнання.....	56
4.4.1. Обґрунтування стадії змішування фруктоолігосахаридів з допоміжними речовинами.....	60
4.5. Вибір способу подрібнення та відповідного обладнання.....	63
4.6. Обґрунтування способу просіювання.....	64
4.7. Обґрунтування вибору форми випуску лікарського засобу.....	65
4.7.1 Обґрунтування форми випуску ЛЗ.....	65
4.7.2.Обґрунтування вибору первинної і вторинної упаковки ЛЗ.....	71
4.8. Обґрунтування санітарної підготовки виробництва та допоміжних робіт.....	81
4.8.1. Обґрунтування вибору класів чистоти виробничих приміщень.....	81
4.8.2.Обґрунтування підготовки вентиляційного повітря.....	83
4.8.3. Обґрунтування водопідготовки.....	85
4.8.4. Підготовка персоналу.....	86
4.8.5. Обґрунтування миючих та дезінфікуючих засобів.....	87
РОЗДІЛ 5. ПІДБІР ТЕХНОЛОГІЧНОГО ОБЛАДНАННЯ З ВРАХУВАННЯМ МАТЕРІАЛЬНИХ ПОТОКІВ ПО СТАДІЯХ ОТРИМАННЯ СУБСТАНЦІЇ ТА ЛЗ.....	91
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ.....	98
РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ (СУБСТАНЦІЯ ТА ЛЗ).....	102
7.1. Опис технологічної схеми післяферментаційного виділення і очищення субстанції для одержання ЛЗ.....	102
РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА СУБСТАНЦІЇ ДЛЯ ЛЗ.....	110
8.1. Опис субстанції для лікарського засобу згідно АНД.....	110

РОЗДІЛ 9. ОПИС ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ЗГІДНО АНД (ПРОЄКТ АНД)	116
9.1. Опис лікарського засобу згідно АНД	116
9.1.1. Зовнішній вигляд пребіотика «F.O.S»	116
9.1.2. Кольоровість препарату пребіотика «F.O.S»	116
9.1.3. Розчинність препарату пребіотика «F.O.S»	116
9.1.4. Мікробіологічна чистота	116
9.1.5. Специфічна нешкідливість препарату пребіотика «F.O.S»	118
9.1.6. Однорідність дозованих одиниць	118
9.1.7. Однорідність вмісту	119
9.1.8. Однорідність маси	120
9.1.9. Термін придатності	120
ВИСНОВКИ	121
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	123

ВСТУП

Актуальність проєкту

У сучасному світі відомо багато шляхів боротьби з різноманітними захворюваннями людини. Найвідоміший з них, це масове використання все більш сучасних і сучасних антибіотиків при перших симптомах запалення тканин чи підвищення температури. Вагомим сектором у медицині є лікування хвороб шлункового кишкового тракту: запальні захворювання кишечника, закрепи, погіршена нормальна мікрофлора кишечника. Основною причиною цих станів у людини є розвиток патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів. Для боротьби з небезпечними мікроорганізмами, та для збільшення корисних, використовують пребіотики. Цікавим є те, що концепію використання пребіотиків з метою модуляції мікрофлори кишечника було обґрунтовано зовсім нещодавно (1995 р) [1,2,3].

Пребіотики – це харчові речовини, що переважно складаються з некрохмальних полісахаридів і олігосахаридів, які не перетравлюються у шлунково-кишковому тракті господаря та чинять сприятливу дію на його здоров'я, впливаючи на власні корисні для господаря мікроорганізми [3].

Основними цільовими мікроорганізмами для пребіотичної дії є біфідобактерії і лактобацили. Ефекти пребіотиків щодо екосистеми кишечника полягають у впливі на імунні механізми в слизовій оболонці, взаємодії із симбіотичними або потенційно патогенними мікроорганізмами, виробленні продуктів метаболічного обміну, таких як коротколанцюгові жирні кислоти, комунікації з клітинами господаря через хімічні сигнали [3].

Пребіотичні речовини знаходяться у рослинах (злаки, бобові, банани, цибуля, спаржа), грудному молоці. На цей час тільки вуглеводні сполуки є предметом досліджень пребіотичної активності. Більшість досліджень були проведені на фруктанах (інулін або фруктоолігосахариди ФОС) [4].

					НУХТ БТЕК 02.02.08 КР ПЗ			
Змн	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Вступ	Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.		Макимець О.О.					7	147
Перевір.		Грегірчак Н.М.						
Консультант								
Н.Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						Кафедра БТМ⁸

Олігосахариди (ОС) виконують пребіотичну функцію завдяки тому, що вони підлягають процесу ферментації біфідобактеріями у товстих кишках і слугують останнім факторами росту. Це надзвичайно важливо, тому що нормальна мікрофлора кишок виконує безліч важливих функцій, включаючи процеси метаболічної адаптації, ферментації компонентів їжі, синтезу вітамінів і біологічно активних речовин. Вона бере участь у трофічній функції, конкурує з патогенними мікроорганізмами за харчові речовини і ділянки зв'язування, виробляє субстанції, що інгібують ріст патогенів, реалізує імунологічні захисні механізми, стимулює експресію генів, які відповідають за транскрипцію і трансляцію молекул цитокінів, забезпечує синтез факторів росту, необхідних для стимуляції проліферації і відновлення пошкоджених ділянок слизової оболонки [5].

Новизна проєкту

Новизною даної роботи є використання високопродукуючого штаму *Aureobasidium pullulans* іре-3, який порівняно з іншими продуцентами виробляє найбільше фруктоолігосахаридів ($548,3 \pm 37,4$ г/л) завдяки підтримці розчиненого кисню в середовищі культивування на рівні 5% [6]. Також під час технологічних стадій виділення фруктоолігосахаридів пропонується додавати у розчин з ФОС магній оксид задля ефективнішого процесу сушіння та одержання високоякісної субстанції для приготування лікарського засобу [7].

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА МІКРОБНИХ ОЛІГОСАХАРИДІВ ЯК ПРЕБІОТИКІВ

1.1. Роль олігосахаридів у формуванні нормальної мікрофлори людини

Олігосахариди-це вуглеводи, до складу яких входять від двох до десяти моносахаридів, з'єднаних глікозидними зв'язками. Вони відрізняються один від одного складом моносахаридів і типом глікозидних зв'язків. Джерелами для отримання олігосахаридів є реакції часткового (хімічного або ферментативного) розщеплення природних полісахаридів, гліколіпідів і глікопротеїнів на олігомерні фрагменти. Окрім кислотного гідролізу для отримання олігосахаридів використовують ферментативне розщеплювання за допомогою ферментів ендоектолітичної дії. Принциповою перевагою ферментативного гідролізу перед кислотним є його специфічність. Олігосахариди в природі піддаються розщеплюванню за допомогою ферментів глікозидаз, які каталізують розщеплювання глікозидних зв'язків. Ці ферменти зазвичай індуюються, тобто їх вироблення стимулюється додаванням субстрату до ферментів. Мікроорганізми кишечника утилізують олігосахариди за допомогою глікозидаз, і введення олігосахаридів приводить до посилення активності цих ферментів [7, 9].

Для багатьох глікозидаз характерна також і трансферазна дія, вони здатні каталізувати не лише гідроліз глікозидного зв'язку, але і перенесення моносахаридного залишку з утворенням нового олігосахариду. Порівняльне вивчення олігосахаридів як пребіотиків показало, що чим коротший ланцюг полісахариду, тим менша специфічність ферментації певними мікроорганізмами кишечника [9, 10, 11].

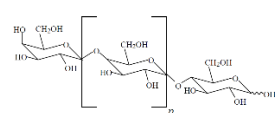
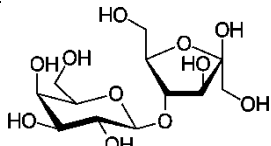
Загалом, відомі такі олігосахариди як: фруктоолігосахариди (ФОС), галактоолігосахариди (ГОС), лактулоолігосахариди, отримані з

					НУХТ БТЕК 02.02.08 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 1. Характеристика мікробних олігосахаридів як пребіотиків	Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.		Максимець О.О.					9	147
Перевір.		Грегірчак Н.М.						10
Консультант						Кафедра БТМ		
Н.Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

галактоолігосахаридів (LDGOS), ксилоолігосахариди (XOS), арабіноолігосахариди, отримані з морських водоростей (ADMO), мананоолігосахариди (MOS), лактулоза. Характеристика деяких з них наведена у табл.1.1.

Таблиця 1.1

Хімічна будова, методи синтезу та ферменти, необхідні для біотрансформації різних олігосахаридів

Олігосахариди		Хімічна структура	Глікозидні зв'язки	Синтез	Ферменти необхідні для біотрансформації
$\beta(1-4)$ ГОС	Галактоолігосахариди		$\beta(1-4)$ глікозидні зв'язки	Біологічний	β -галактозидази, β -глюкозидази
ФОС	Фруктоолігосахариди		$\alpha(1,2)$ глікозидні зв'язки	Біологічний	фруктозидаза
Лактулоза	Лактулоза		$\beta(1-4)$ глікозидні зв'язки	Хімічний	β -галактозидази

Після аналізу таблиці, можна сказати, що всі олігосахариди мають глікозидний тип зв'язку. Відмінністю між наведеними сполуками є їх одержання: для галакто-та фруктоолігосахаридів це біологічний синтез, а для лактулози-хімічний.

Щоб краще розібратися яку роль відіграють ОС у формуванні нормальної мікрофлори людини, потрібно описати окремих представників.

Так, фруктоолігосахариди містяться в різних концентраціях як природний компонент, у пшениці, медові, цибулі, часнику і банані. Ячмінь і томат містять 0,15 % фруктоолігосахаридів. Банан і коричневий цукор містять 0,30% фруктоолігосахаридів. Мед містить 0,75 % фруктоолігосахаридів (рис.1.1) [12].



Рис. 1.1. Поширення фруктоолігосахаридів у різних натуральних продуктах

ФОС подібні до харчових волокон у протистоянні травленню в кишечнику і перетворенню в ацетат, пропіонат, бутират і газ у товстій кишці. У шлунково-кишковому тракті вони сприяють розмноженню біфідобактерій і, з іншого боку, мають інгібуючий вплив на *Clostridium perfringes* у товстій кишці. Фруктоолігосахариди виявляють стійкість до основних ферментів, які беруть участь у травленні, таких як альфа-амілаза, сахараза та мальтаза [12].

Фруктоолігосахариди та їх мономерні похідні забезпечують стійкість до шкідливого впливу жовчних солей. *Bifidobacterium* у їх присутності у середовищі підвищили свою стійкість та продемонстрували кращий ріст при наявності жовчних солей. Також перевагами для здоров'я людини є: протиракові властивості, поглинання мінералів, ліпідний обмін, протизапальні та інші імунні ефекти (атопічна хвороба) [12].

Крім усього перерахованого вище, фруктоолігосахариди також мають штучну солодкість і низьку калорійність. Штучні підсолоджувачі постійно користуються попитом через потреби діабетиків і споживачів, які піклуються про своє здоров'я. Спочатку попит задовольнявся аспартамом або

натуральними підсолоджувачами, такими як палатиноза. Через їх популярне використання всі типи олігосахаридів залишалися погано експлуатованими, незважаючи на їх функціональні властивості [12].

Іншими не менш відомими олігосахаридами є галактоолігосахариди. ГОС – це складні суміші олігосахаридів від двох до восьми частин з різними глікозидними зв'язками: β -(1,1), β -(1,2), β -(1,3), β -(1,4) і β -(1,6). Природним джерелом галактоолігосахаридів є молоко ссавців. Альтернативою одержання ГОС є промислове трансгалактозилювання лактози, присутньої в сироватці, що каталізується β -галактозидазами [12].

ГОС є найдешевшою альтернативою, яку часто додають до дитячих сумішей, щоб імітувати сприятливий вплив олігосахаридів, присутніх у грудному молоці людини, і є одним із найбільш ретельно оцінених пребіотиків. β (1–4) галактоолігосахариди зазвичай отримують шляхом ферментативного трансглікозилювання з використанням β -галактозидаз або β -глюкозидаз і мають загальну формулу β (1–4) [D -галактоза]_n- D - глюкоза, де n коливається від 3 до 10 частини цукру. Завдяки глікозидному зв'язку вони не метаболізуються в тонкій кишці, досягаючи неушкодженою товстої кишки, де вони служать субстратом для певних членів мікробіоти, здатних гідролізувати зв'язки галактоза-глюкоза [12,13].

Лактулоза – вуглевод, що відноситься до класу олігосахаридів, підкласу дисахаридів, що має назву β -D-галактопіранозил-(1,4)- β -D-фруктофураноза (β -D-Gal-(1-4)- β -D-Fru). Лактулоза є ізомером лактози [β -D-галактопіранозил-(1,4)-D-глюкопіранози], має таку ж брутто-формулу (C₁₂H₂₂O₁₁). Даний олігосахарид не зустрічається в природі і вважається синтетичним дисахаридом, який можна отримати з лактози, використовуючи недорогу вторинну молочну сировину. Промислове виробництво лактулози засноване на ізомеризації лактози в лужних середовищах, внаслідок якої відбувається LA-трансформація її глюкозного залишку на фруктозний. Основна, найбільш вивчена властивість лактулози - здатність проходити верхні відділи шлунково-кишкового тракту (ЖКТ) людини в

нерозщепленому вигляді і, досягаючи товстої кишки, стимулювати ріст біфідобактерій. Цей вуглевод стійкий до кислого середовища шлунка та жовчі, не гідролізується в тонкій кишці через відсутність необхідних для цього ферментів, тому не підвищує рівень глюкози в крові та має калорійність близько 2 ккал/г (в 2 рази нижче, ніж у сахарози). Потрапляючи в товсту кишку, лактулоза викликає зміни у складі окремих популяцій мікробіоти та їх метаболізмі, які можуть сприятливо впливати на організм людини [14,15].

Отже, проаналізувавши різні види олігосахаридів (фруктоолігосахариди, галактоолігосахариди та лактулозу), можна сказати, що вони відіграють важливу роль у формуванні нормальної мікрофлори кишківника людини.

1.2. Застосування олігосахаридів в якості пребіотика для людини

У даний час в світі стрімко розвивається біотехнологія пробіотиків - препаратів, що містять живі мікроорганізми, представники нормальної мікрофлори людини: лакто-, коли- і біфідобактерії. Пробіотики відрізняються за своєю стійкістю до кислот, жовчних кислот, мікроорганізмів, які колонізують шлунково-кишковий тракт, і до дії цитокінів, що секретуються епітеліальними клітинами. Слід зазначити, що бактерії, які входять до складу препарату нормофлори повинні володіти рядом характеристик, серед яких слід виділити високу адгезію, тобто здатність колонізувати кишковий епітелій. Фіксація бактерій на поверхні залежить від багатьох факторів: поверхневий натяг, деформація бактеріальної клітини, нерівномірний розподіл електричного заряду, температури, рН, наявність антибіотика або пребіотичних компонентів в навколишньому середовищі. Пребіотики - це неперетравлювані харчові компоненти, як правило, природні вуглеводи, які стимулюють розмноження і розвиток пробіотичних мікроорганізмів (інулін, фруктозоолігосахариди, трансгалактозировані олігосахариди, лактулоза тощо) [16].

Згідно існуючого визначення, до пребіотиків відносяться вуглеводи, які відповідають таким вимогам:

- не гідролізуються травними ферментами і не всмоктуються у верхніх відділах шлунково-кишкового тракту;
- є селективним субстратом для одного або декількох родів корисних бактерій;
- володіють здатністю змінювати баланс кишкової мікрофлори в сторону більш сприятливого для організму складу;
- індукують корисні ефекти не лише на рівні шлунково-кишкового тракту, а й на рівні організму загалом, тобто мають системний ефект [17].

Ключовим моментом у характеристиці пребіотиків є їх вибіркоче стимулювання корисних для організму представників кишкової мікрофлори, до яких у першу чергу відносяться біфідобактерії і лактобацили [17, 18, 19].

Існує багато видів пребіотиків. Більшість з них це вуглеводні групи і в основному, і являють собою олігосахаридні вуглеводи (OSC) [20].

Три комерційно доступні дієтичні інгредієнти: галактоолігосахариди (GOS), лактулоза та фруктоолігосахариди (FOS) використовуються як харчові добавки в Японії та Європі [13].

Пребіотики відіграють важливу роль у здоров'ї людини. Вони присутні в різних харчових продуктах, таких як: спаржа, буряк, часник, цикорій, топінамбур, пшениця і т.д. Але через низьку концентрацію в продуктах, їх синтезують у промислових масштабах [20].

На даний час існує чотири принципово різних напрями промислового отримання пребіотиків:

- виділення з природних джерел;
- ферментативний або кислотний гідроліз;
- хімічний синтез;
- ферментативний синтез [19].

Оскільки, найвідомішими пребіотиками є ФОС та ГОС існує багато досліджень щодо їх виробництва (рис. 1.2.)

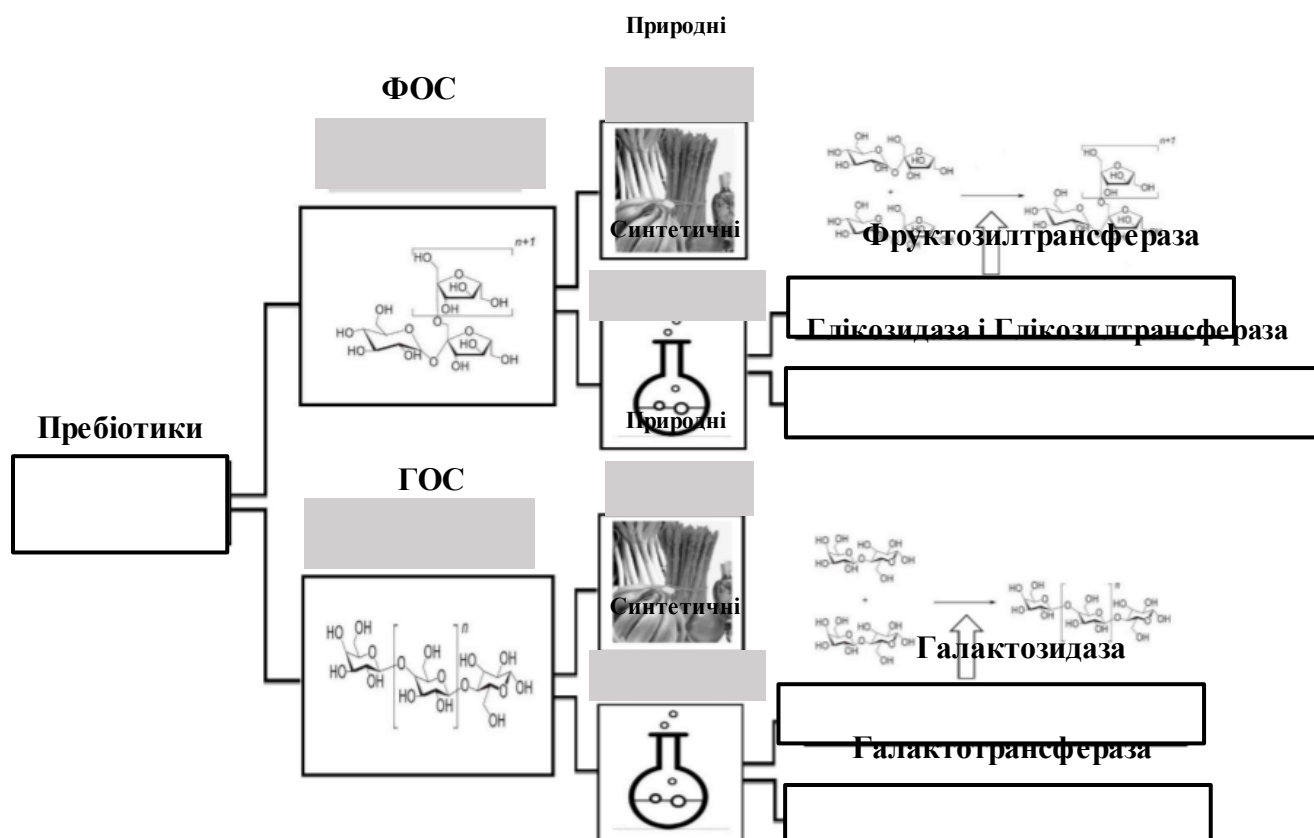


Рис.1.2. Джерела та виробництво основних пребіотиків (фруктоолігосахаридів (ФОС) та галактоолігосахаридів (ГОС))

Олігосахариди як пребіотики можуть змінювати мікробіом кишечника: модулювати склад, функцію цих мікроорганізмів. Інколи, побічний продукт ферментації складного пребіотика слугує субстратом для іншого мікроорганізму, що називається перехресним харчуванням. Також пребіотики можуть змінювати рН середовище кишечника. Продукти ферментації являють собою кислоти, які знижують рН з 6,5 до 5,5, що впливає на склад і популяцію кишкової мікробіоти [20].

Споживання пребіотиків призводить до тимчасового збільшення лактату і бутирату в товстій кишці, що вважається важливим для профілактики колоректального раку (КРР). Даний тип раку, займає третє місце серед найрозповсюджених злочи́сних новоутворень в світі. Іншою хворобою, яку можуть попередити пребіотики є некротичний ентероколіт (НЕК), що є невідкладним станом шлунково-кишкового тракту у недоношених немовлят, у яких ділянки кишечника піддаються некрозу. ФОС

та ГОС, стимулюють ріст *Bifidobacteria* і зменшують кількість патогенних бактерій у недоношених дітей [11,20].

Пребіотики не тільки мають захисний ефект на шлунково-кишковий тракт, але також і на інші частини тіла, такі як центральна нервова система, імунна система, серцево-судинна система (рис. 1.3) [20].

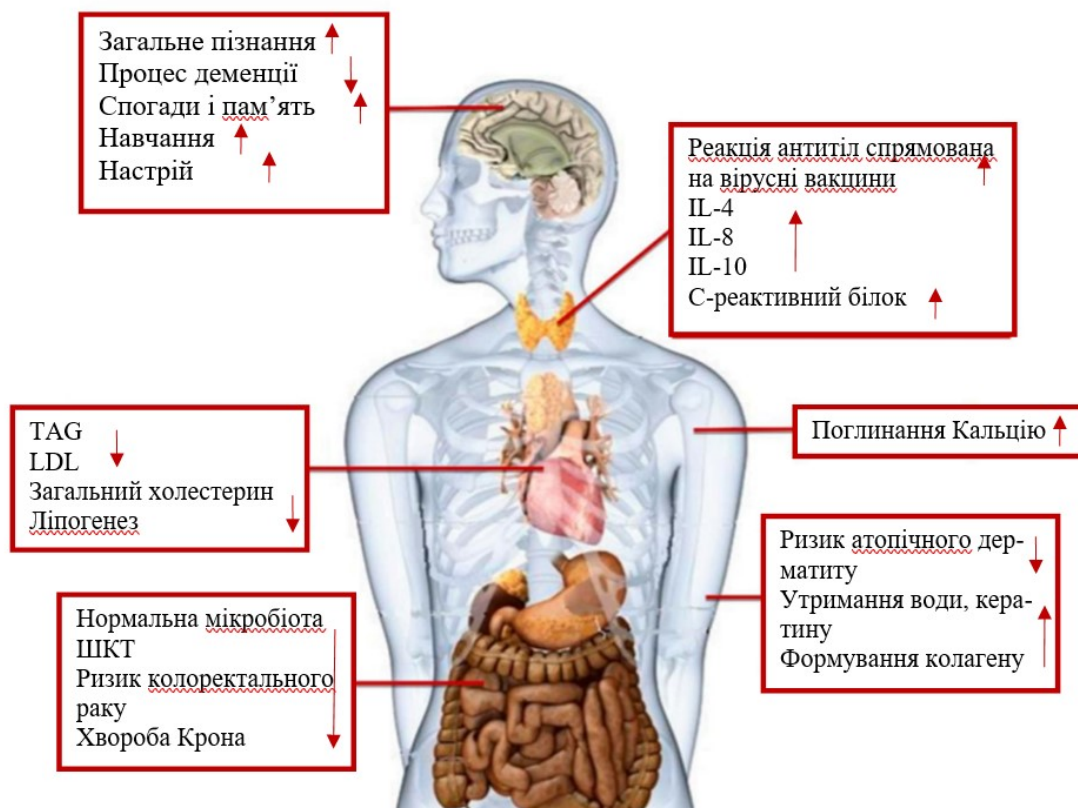


Рис.1.3. Ефекти пребіотиків для підтримки здоров'я і захисту від хвороб

Отже, пребіотики вживаються людьми вже протягом тисячоліть. Більше того, загальні переваги для здоров'я, пов'язані з вживанням пребіотиків були чітко визнані в минулому столітті. Тим не менш, саме зараз, з появою технології секвенування наступного покоління та інструментів, ми маємо можливість аналізувати дієтичні ефекти та ідентифікувати ключових бактеріальних гравців, компоненти мікробіоти кишечника, що впливають на ферментацію та утворення вторинних метаболітів. Проаналізувавши всі корисні властивості олігосахаридів як пребіотиків не тільки на нормальну мікрофлору кишківника, а й і на інші органи людини, можна з впевненістю сказати що їх подальше промислове виробництво буде мати попит на фармацевтичному ринку.

РОЗДІЛ 2. БІОТЕХНОЛОГІЯ ОДЕРЖАННЯ МІКРОБНИХ ОЛІГОСАХАРИДІВ

За останні 10 років у світі досить широко вивчалася здатність до синтезу олігосахаридів різними мікроорганізмами. Учені досліджували різні біотехнології для того щоб вихід кінцевого продукту був максимальний.

2.1 Особливості одержання фруктоолігосахаридів

За аналізом літературних джерел [6, 21-30] відмічено, що при виченні синтезу фруктоолігосахаридів використовувалося як твердофазне так і глибинне культивування. Так, у дослідженнях [21, 22] використовували твердофазне культивування грибів роду *Aspergillus* на різних агровідходах.

У дослідженні Ganaie у співавтор. було описане твердофазне культивування *Aspergillus flavus* NFCCI 2364 для виробництва Фтази (фруктозилтрансферази). Найкращий синтез ФОС при твердофазному культивуванні відбувається за використання як субстрату цукрового очерету. Також непогані результати виявили і на субстратах з пшеничними висівками, банановими шкірками, відповідно $97,44 \pm 2,37$ та $102,6 \pm 0,219$ Од/г сухого субстрату. Збільшення отримання ФОС (фруктоолігосахаридів) на даних субстратах збільшилося на 35,95% (w/w). Покращує вихід фермента, додавання в середовище 0,2 г/г сухого субстрату дріжджового екстракту в середовище. Найбільша трансфруктозилююча активність ($196,84 \pm 1,02$ Од/г сухого субстрату) при температурі 28 °С [21]. У іншій статті [22] описується твердофазне культивування *Aspergillus japonicus* ATCC 20236 на таких субстратах як: качани кукурудзи, срібляста плівка кави (coffee silverskin) та дубові пробки. Відмічено, що на кавовій сріблястій шкірці вихід ФОС (128,7 г/л) є найвищий при активності β -фруктофуранозідази (71,3 Од/мл).

					НУХТ БТЕК 02.02.08 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Піліпис	Дата	РОЗДІЛ 2. Біотехнологія одержання мікробних олігосахаридів	Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.		Макимець О.О.					17	147
Перевір.		Грегірчак Н.М.				Кафедра БТМ¹⁸		
Консультант								
Н.Контр.								
Затверд.		Стабніков В.Л.						

Інші вчені проводили скрінінг різних штамів [23] та видів [24] грибів роду *Aspergillus* з кращою здатністю до синтезу ФОС. Так, у статті [23] описували три штами гриба *Aspergillus tubingensis*: XG11, XG12, XG21. Джерелом вуглецю слугувала меляса цукрового очерету у різній концентрації (2, 5, 10, 15 і 20%). Найкращим продуцентом виявився *Aspergillus tubingensis* XG21. У цій роботі також описали, що виробництво Ффази (β -фруктофуранозидази) помітно збільшується з використанням меляси з цукрового очерету ніж при використанні сахарози як джерела вуглецю. Так, при 2% концентрації меляси Ффаза становить - 365,8 Од/г, а при 8% сахарози - 295,6 Од/г [21]. Проаналізувати 20 різних мікроорганізмів для одержання олігосахаридів вирішили вчені Ganaie та Gupta і ін. [24]. Оцінку утворення ФОС досліджуваними мікроорганізмами здійснювали шляхом інкубування зразків ферментів з 50% (мас./об.) сахарозою на різних часових інтервалах (48, 72, 96 та 120 год). *A. flavus* 2364 дає високу активність Ффази та відповідно високий вихід ФОС 63,40% за 120 год ферментації. Тим часом як інші гриби *A. flavus* NFCCI 2785, *P. islandicum*, *A. flavus* 2783, *A. terreus* та *F. solani* показали 44,61%, 42,51%, 28,98%, 24,38% і 15,12% (мас/об.) фруктоолігосахаридів [22].

Для збільшення виходу фруктоолігосахаридів у роботах [19-26] порівнювалися різні джерела вуглецю. Ning у співавтор. [25] використовували такі субстрати як (глюкоза, фруктоза, сахароза, мальтоза) для синтезу G-FFase (6G - фруктофуранозидаза) за допомогою продуцента *Xanthophyllomyces dendrohous*. Виявилось, що найкращим джерелом вуглецю була фруктоза (вихід G-FFase= 52 ОД./мл), тоді як сахароза - 40 ОД./мл. Але автори пропонують разом з ферментом отримувати при культивуванні ще і атаксантин. Найбільш ефективним субстратом для одночасного одержання цих метаболітів є сахароза, при концентрації 30 г/л (поліпшує вихід фермента в 1,09 раз), а при більшій концентрації - 70 г/л атаксантин перестає продукуватися. Найкращим джерелом азоту став кукурудзяний екстракт (вихід ферменту становив 99 ОД/мл), тоді як при

дріджовому екстракті всього 59 ОД/мл. Було встановлено оптимальний рівень рН не вище 8,5 (220 ОД/мл). Даний мікроорганізм при обраних оптимальних умовах продукує найбільшу кількість ферменту (242,57 ОД/мл). Оптимізація процесу призвела до 6,5 кратного виходу ферменту, що в подальшому збільшує вихід ФОС [23].

Виробництво фруктоолігосахаридів за допомогою *Penicillium expansum* вивчали у праці [26]. Завдання полягало у виявленні на яких середовищах найкраще розмножується мікроорганізм (декстроза або сахароза) для утворення ФОС. Після експериментів, стало відомо, що ФОС формується після 12 год культивування. У проміжку від 12 до 24 год починає активно споживатися сахароза з утворенням 117,7 г/л олігосахаридів і повністю споживається джерело вуглецю. Після 36 год культивування і повним вичерпанням сахарози, мікроорганізм починає споживати вироблені ФОС (що зменшує вихід кінцевого продукту) [24].

Цікаві експерименти описували у статтях [27-29]. Задля високого виходу фруктоолігосахаридів, вчені іммобілізували клітини на різних носіях [27], проводили двоетапну ферментацію [28] та генетично змінювали біологічних агентів [29].

Так, Castro з співавтор. [27] в якості недорогих субстратів для іммобілізації *Aureobasidium pullulans* ССҮ 27-1 використовували волоський горіх та сігчасту піну поліуретану для виробництва ФОС (фруктоолігосахаридів). Після порівняння обох носіїв виявлено, що сігчастий пінополіуретан найкраще на собі іммобілізує клітини мікроорганізму (75% мас./об) [25].

Методом двоетапної ферментації отримувати олігосахариди пропонує Nobre. Так, під час першого етапу синтезуються ФОС *A. pullulans*, а під час другого - дрібні сахариди метаболізуються *S. cerevisiae*. Найоптимальнішим часом бродіння для одержання ФОС виявлено 47,8 год і 53,5 год. У середньому максимальна концентрація ФОС 101 ± 3 г/л була отримана при 51 ± 2 год [28].

Зустрічаються роботи присвячені вивченню геномодифікованих продуцентів. Так, Zhang генетично змінювали біологічний агент *Aspergillus niger* ATCC 20611 для одержання високого виходу ФОС на середовищі з сахарозою (55-60% мас./об.). Щоб досягти такого результату у дослідженні використовувалася система трансформації протопласту, опосередкована ПЕГ та встановлена в самий мікроорганізм [29].

Головним фактором для одержання високої концентрації фруктоолігосахаридів та високої активності ферменту Ффази є підбір оптимальних умов культивування. Тому, Nascimento у співавтор. дослідили, що наявність чи відсутність у середовищі дріжджового екстракту ніяк не впливає на вихід кінцевого продукту. Продуцент *Penicillium citreonigrum* UMR 4459 був обраний як потенційний виробник β -фруктофуранозидази (Ффази). У досліді досягнуто продуктивності фермента 6,11 ОД/мл.год, що виробляв 58,7 г/л фруктоолігосахаридів [30]. Щоб покращити виробництво ФОС, у дослідженні авторів Xinquan Lian, Chenglin L та ін, було досліджено вплив концентрації розчиненого кисню DO і режиму ферментації, біологічним агентом виступав *Aureobasidium pullulans* іре-3. Виявилось, що концентрація DO та субстрату є двома основними факторами, які впливають на продукцію ФОС. Так, при підтримці концентрації DO вище 5% під час культивування (при повторному завантаженні), концентрація фруктоолігосахаридів становила $548,3 \pm 37,4$ г/л [6].

Узагальнена інформація у табл 2.1.

**Характеристика одержання фруктоолігосахаридів різними
продуцентами**

№	Продуцент	Джерело вуглецю	Фермент	Активність ферменту	Вихід/концентрація фруктоолігосахаридів	Джерело
1	<i>Aspergillus flavus</i> NFCCI 2364	5 г субстрату (цукровий очерет, пшеничні висівки, бананові шкірки)	Фтаза	198,6 ±1,31 Од/г сухого субстрату	-	21
2	<i>Aspergillus japonicus</i> ATCC 20236	Сахароза 200 г/л	β - фруктофуранозидаз а	71,3 ОД/мл	128,7 г/л	22
3	<i>Aspergillus tubingensis</i> XG21	(% мас./об.) м'яса 20	Ффаза	558,3 ОД/г (62,3 ОД/мл)	-	23
4	<i>Aspergillus flavus</i> 2364	(% мас./об.) сахароза 50	Фтаза	-	63,40% (% мас./об.)	24
5	<i>Xanthophyllo myces dendroohous</i>	Фруктоза	6G - фруктофуранозидаз а	242,57 ОД/мл	-	25
6	<i>Penicillium expansum</i>	(% мас./об.): сахароза 20	Ффаза	-	0,58 г ФОС/г сахарози (3,25 г ФОС/л/го д)	26
7	<i>Aureobasidium pullulans</i> CCY 27-1	Сахароза 200 г/л	Ффаза	-	108,17 ± 8,83 г/л	27

8	<i>A. pullulans</i> , <i>S. cerevisiae</i> .	Сахароза 200 г/л	Ффаза	-	101±3 г/л	28
9	<i>Aspergillus niger</i> ATCC 20611 (генетично змінений)	Сахароза 20 г/л	β - фруктофу ранозидаз а	507 ОД/г	55-60% (% мас./об.)	29
10	<i>Penicillium citreonigrum</i> UMR 4459	(% мас./об.): сахароза 20	Ффаза	301,84 ОД/мл	58,7 г/л	30
11	<i>Aureobasidium pullulans</i> іре-3	Сахароза 200 г/л	Фтаза фруктози лтрансфе раза	268,6± 14,1 ОД/(г/л біомас и)	548,3 г/л	6

Примітка: «-» - дані не наведено

2.2. Роль мікробних β -галактозидаз в отриманні галактоолігосахаридів

В дослідженнях [31-39], описується здатність до синтезу галактоолігосахаридів (ГОС) різними продуцентами. Основним джерелом вуглецю в даних роботах є лактоза.

Учені у своїх дослідах задля отримання галактоолігосахаридів використовували дріжджі роду *Kluyveromyces* [31, 32]. Для синтезу ГОС з пермебілізованими клітинами у статті [31] описували біологічний агент *Kluyveromyces marxianus* NCIM 3551, як найактивніший. На середовищі з лактозою з масовою/об'ємною часткою 20%, вихід масової частки ГОС становив 36% та мав продуктивність 23 г/л/год. Щодо значення рН, то воно залежить від наявності джерела β -галактозидази в середовищі і може корегулюватися [30]. Іншими вченими Sun H. та You S. у співавтор. використовувалися клітини *Kluyveromyces lactis*, які були пермебілізовані етанолом (р-клітини 18,9 г/л), що підвищувало вихід ГОС. На стадіях очищення галактоолігосахаридів, дріжджі споживали лактозу і інші побічні продукти. Вихід кінцевого продукту становив 23,6 г/л (21%). Сирий розчин після ферментації складався з 35% ГОС, 27,4% лактози, 25,2% глюкози,

12,4% галактози. Етап очищення проводили з непермібілізованими клітинами, тому що вони найкраще споживають глюкозу, галактозу та лактозу, а наявний в розчині ГОС споживати не можуть. Чистота кінцевого продукту становила 85% масової частки. Під час очищення утворювався етанол, який можна повторно використовувати для одержання пермебілізованих клітин [32].

Головним при отриманні галактоолігосахаридів є продукція ферменту β -галактозидази. Під час дослідів [34-37] використовували мікроорганізми роду *Kluyveromyces*, які продукують мікробні галактозидази.

У 2017 році вченими була вивчена кінетика реакцій комерційних мікробних β -галактозидаз *Kluyveromyces lactis* та *Aspergillus oryzae* у порівнянні з рекомбінатною *Bacillus circulans* виражена в *E.coli* та їх здатність до утворення ГОС. Для виробництва галактоолігосахаридів у поживне середовище, яке складалося з лактози додавали 37 ОД/г ферменту β -галактозидази. При цьому результати показали: максимальний вихід ГОС становив для β -галактозидази *Bacillus circulans*- 48,3% \pm 1,2% ГОС при споживанні 88% \pm 0,4% лактози за 8 год; для β -галактозидази *Kluyveromyces lactis* 34,9% \pm 1,8% ГОС з витратою 91,8 \pm 0,8% лактози за 6 год; та для β -галактозидази з *Aspergillus oryzae* 19,5% \pm 2,2% ГОС з споживанням лактози 69,6 \pm 1,1% за 8 год [33].

В іншому дослідженні одержання ГОС проводилося *Kluyveromyces lactis* на лактозі з подальшим додаванням ферменту β -галактозидази (Lactozym ТМ Pure 6500л). Вчені вивчали різні параметри задля кращого одержання ГОС (температура, концентрація ферменту, рН, концентрація лактози та час реакції). Відомо, що максимальний вихід ГОС становив 12,18% протягом 3 год [34].

Біотехнологічний прийом одночасного синтезу та очищення ГОС розглядали у роботі [35]. Вчені використовували комерційну β -галактозидазу *Aspergillus oryzae* і *Kluyveromyces lactis* з *Saccharomyces cerevisiae* та клітини

Kluyveromyces marxianus (для видалення вуглеводів). Найкращий вихід ГОС (50 г/л) на середовищі з лактози показав продуцент *Saccharomyces cerevisiae*.

Далі вчені виконували дослідження де перевірявся синтез на 40% масовій частці лактози. Було виявлено, що після 24 год культивування вихід ГОС становив, при цьому перетворення лактози у 40,3%. Даний розчин ГОС містить 0,8% глюкози та 19,2% галактози. Чистоту ГОС близько 100% одержали використовуючи β -галактозидазу *Aspergillus oryzae* разом з *Kluyveromyces marxianus* [34]. Вивчали вплив β -галактозидази дріжджів *Kluyveromyces lactis* на синтез олігосахаридів в молочній сироватці вчені Сеуірбева, Кукишева та Турумбетова. Дослідження направленні на знаходження мінімальної дози фермента при якому вихід галактоолігосахаридів буде найвищим. Результати показали, що при дозі 20 Од/мл концентрація олігосахаридів в сироватці збільшується, однак при подальшому підвищенні дози фермента починають відбуватися гідролітичні процеси (синтез олігосахаридів з 12% знижується до 7,5%, а вміст глюкози та галактози збільшується відповідно 15 і 12,8%) [36].

Також фермент β -галактозидазу продукують і гриби роду *Aspergillus oryzae*. Щоб оптимізувати процес синтезу ГОС дослідники на чолі Golowczyc використовували сироватковий пермеат разом з β -галактозидазою від *Aspergillus oryzae* як біокатализатор, а також збережені клітини *Lactobacillus plantarum* (для пробіотичних властивостей). Отримані ГОС щеплювалися з *Lactobacillus plantarum*. Максимальний вихід ГОС/лактози - 27,3 г/100г, отримані з вихідного розчину 40 г твердих речовин/100 г суспензії. Дане дослідження найкраще описує одержання продукту одночасно з пребіотичними та пробіотичними властивостями [37].

Варто відмітити, що зустрічаються поодинокі роботи стосовно ферментативної іммобілізації, як, наприклад, у роботі [38]. Родрігес-Колінас та ін. описали безперервний процес виробництва галактоолігосахаридів за допомогою ферментативної іммобілізації. Дослідники використовували ковалентні зв'язки між β -галактозидазою *Bacillus circulans* та альдегід-

активовані (глюкозальні) намистини з агарози в реакторі з повним шаром. Активність ферменту після іммобілізації становила 97,4 ОД/г. Безперервне виробництво підтвердилося тим, що після 14 циклів повторного використання ефективність іммобілізованого фермента залишалася близькою до 100%, а при такому культивуванні концентрація ГОС досягла 24,2 г/л [38].

Оптимізація середовища культивування є головною задачею при отриманні ГОС. Тому, у дослідженні Fai та ін. були описані такі ендофітні мікроорганізми як *Pseudozyma tsukubaensis* та *Pichia kluyveri*. Після оптимізації середовища для кращого синтезу ГОС, були отримані такі результати: на середовищі лактози 28,35 г/100 г за 24 год, концентрація ГОС була 73,71 г/л. Паралельно виявлені максимальні виходи на різних субстратах таких як: лактоза (28г/100мл), екстракт дріжджів (0,8 г/100 мл) та сечовина (91,8 г/100 мл) при 30 °С і 150 об/хв з обраним рН 8 [39]. Узагальнена інформація у табл. 2.2

Таблиця 2.2

Характеристика одержання галактоолігосахаридів різними продуцентами

№	Продуцент	Джерело вуглецю	Фермент	Активність ферменту	Вихід/концентрація галактоолігосахаридів	Джерело
1	<i>Kluyveromyces marxianus</i> NCI M 3551	Лактоза	β-галактозидаза	-	36% та мала продуктивність 23 г/л/год	31
2	<i>Kluyveromyces lactis</i>	400 г/л лактози		-	23,6 г/л (21%)	32
3	<i>Bacillus circulans</i>	88%±0,4% лактози		-	48,3%±1,2% ГОС	33
4	<i>Kluyveromyces lactis</i>	Розчин лактози 250 г/л		5 ОД/мл	12,18%	34
5	<i>Aspergillus oryzae</i> разом з <i>Kluyveromyces marxianus</i>	Лактоза 50 г/л		-	у 40%	35
6	<i>Kluyveromyces lactis</i>	Концентрація лактози 42%		20 ОД/мл	22% вихід	36

7	<i>Aspergillus oryzae</i>	20-60 г твердих речовин/г суспензії сироваткового пермеату, 100 МО/г лактози з ферментом.	-	ГОС/лактози 27,3 г/100г,	37
8	<i>Bacillus cicrulans</i>	розчин лактози 100 г/л	97,4 ОД/г.	24,2 г/л	38
9	<i>Pseudozyma tsukubaensis</i> та <i>Pichia kluyveri</i> .	Лактоза	-	73,71 г/л	39

Примітка: «-» - дані не наведено

2.3. Продукція ксилоолігосахаридів та мананоолігосахаридів на різних джерелах вуглецю

Відомо, що для виробництва ксилоолігосахаридів (КОС) використовуються три основні шляхи:

- хімічний;
- ферментативний;
- процес автогідролізу [40].

Під час досліджень за останні роки стосовно отримання ксилоолігосахаридів, джерелами вуглецю виступали ксилан, зерна від пивоварень, стебла кенафу та кукурудзяні качани [41-44]. Також, у роботах описують одержання та вплив рекомбінантної ксиланази на утворення ксилоолігосахаридів [41-44].

У недавніх дослідженнях Milessi задля одержання ксилоолігосахаридів, культивування здійснювали на середовищі з звичайного березового ксилану та його розчинної фракції разом з іммобілізованою рекомбінантною ксиланазою *Bacillus subtilis*. Іммобілізована рекомбінантна ксиланаза, яку одержали на агарозі активованою гліюксальними групами, показує високий

вихід іммобілізації (100%). При застосуванні 1,95 ОД/мл фермента протягом 24 год максимальний вихід КОС становив 2,9 та 3,2 г/л з використанням звичайного та розчинного ксилану відповідно. Дані результати були схожі до результатів одержаних за допомогою розчинної рекомбінантної ксиланази щоб гідролізувати ці субстрати [41].

Науковці Amorim та ін. також досліджували вплив рекомбінантних ферментів на утворення ксилоолігосахаридів. У дослідженні використовувався дикий штам *Bacillus subtilis* та його клон з геном ксиланази від *Trichoderma reesei*. Після проведення експерименту вихід олігосахаридів становив 824 мг/г для дикого штаму та 997 мг/г клону (на 16% збільшився вихід КОС) [42].

Отримувати ксилоолігосахариди зі стебл кенафу пропонують Wan Azelee у співавтор. Стебла кенафу піддавалися послідовним двом ферментативним реакціям - спочатку ксиланазою від *Pichia pastoris*, а потім сумішшю ксиланази з арабінфуранозидазою. Результат показав вихід ксилоолігосахаридів - 351,46 мг/г [43].

Для збільшення концентрації ксилоолігосахаридів, науковці Mingchun Zhou, Guangsen Fan та ін. пропонують використовувати фізичні методи під час культивування. Так, на субстраті з висівок кукурудзяних качанів гриб *Penicillium janthinellum* XAF01 продукував ксиланазу. Далі, фермент обробляли ультразвуком та визначали найкращу його інтенсивність. Ультразвук низької інтенсивності мав виражений вплив на ферментний гідроліз з висівок та збільшив вихід ксилоолігосахаридів на 61,80% порівняно з необробленою ксиланазою [44]. Узагальнена інформація про отримання ксилоолігосахаридів у табл. 2.3.

**Характеристика одержання ксилоолігосахаридів різними
продуцентами**

№	Продуцент	Джерело вуглецю	Фермент	Активність ферменту	Вихід/концентрація ксилоолігосахаридів	Джерело
1	<i>Bacillus subtilis</i>	13 мг/мл розчинний та звичайний ксилан,	Рекомбінантна ксиланаз а	1,95 ОД/мл фермент а	2,9 та 3,2 г/л відповідно з використанням звичайного та розчинного ксилану	41
2	<i>Bacillus subtilis</i> та його клону з геном ксиланазиди від <i>T. reesei</i> .	20 г/л виробничого зерна від пивоварень	Ксиланаз а	-	824 мг/г для дикого штаму та 997 мг/г клону	42
3	<i>Pichia pastoris</i>	Хімічно оброблений кенаф	Ксиланаз и з арабінфуранозидазою	-	351,46 мг/г	43
4	<i>Penicillium janthinellum</i> XAF01	60 г/л кукурудзяний качан	Ендо-β-D-ксиланаз а	1807,9 ОД/мл	-	44

Примітка: «-» - дані не наведено

Окрім, ксилоолігосахаридів також ретельно вивчалися і мананоолігосахариди. Безперечно, головним у одержанні мананоолігосахаридів, науковці вважають одержання ферменту β-мананазиди. У всіх проаналізованих статтях джерелом вуглецю виступають камедь, пшеничні висівки та кукурудзяний порошок [45-47].

Для одержання мананоолігосахаридів дослідники Jian та ін. використовували комерційно доступну очищену мананазу *Aspergillus niger* на середовищі з галактоманнаною камеддю (*Gleditsia sinensis*). Вибір оптимальних параметрів культивування перебував у таких межах: рН 3-6, концентрація субстрату: 2-8%; кількість ферменту: 5-9 ОД/г; температура: 40-80 °С; та час: 0-48 год. Після досліду, найвища концентрація мананоолігосахаридів становила 29,1 г/л (вихід 75,9%) [45].

Інші дослідники спочатку вирішили завдання із знаходженням максимально активного фермента β-маннанози, щоб в подальшому вихід мананоолігосахаридів був найбільший. Мікроорганізм *Penicillium chrysogenum* QML-2, який виділили з ґрунту, взяли для подальших досліджень. Вміст вологи, рН, температура піддавалися оптимізації. Визначено, що восьмикратне збільшення активності ферменту β-маннанози (з 928,41 до 8479,82 ОД/г) було досягнуто при вологості 74% [46].

Описати штаб мікроорганізму *Bacillus nealsonii* PN-11, що продукує β-манназу, взявся вчений Chauhan. Спочатку науковці здійснювали її очищення та визначали такі параметри як стабільність, активність та здатність до утворення мананноолігосахаридів. З субстратів порівнювали сахарозу, бобову камедь. Виявилось, що найкращим джерелом маннану є бобова камедь (8 г/л). Вихід мананоолігосахаридів становив 3 мг/мл [47]. Узагальнена інформація про отримання мананоолігосахаридів у табл. 2.4.

Характеристика одержання мананоолігосахаридів різними продуцентами

№	Продуцент	Джерело вуглецю	Фермент	Активність ферменту	Вихід/концентрація мананоолігосахаридів	Джерело
1	<i>Aspergillus niger</i>	5% галактоманнанової камедді	мананаза	8,1 ОД/г ферменту	29,1 г/л (вихід 75,9%)	45
2	<i>Penicillium chrysogenum</i> QML-2	пшеничні висівки, кукурудзяний порошок	β -мананаза	8479,82 ОД/г	-	46
3	<i>Bacillus nealsonii</i> PN-11	рожева камедь 8 г/л	β -мананаза	-	3 мг/мл	47

Примітка: «-» - дані не наведено

2.4. Стан дослідження пребіотиків вітчизняними вченими

Дослідженню та вивченню пребіотиків українські науковці майже не займалися, проте вдалося знайти деякі поодинокі роботи, в яких описані методи одержання та використання пребіотичних речовин.

Так, у статті [48] описується нова В-галактозидаза, з недавно виділеного штаму *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171, яка перетворює лактозу в суміш галактоолігосахаридів. Фрагменти ДНК виділяли з *B. bifidum* та піддавалися лігуванню з вектором. Далі у досліді проводили синтез з клонованим ферментом В-галактозидази, виділеним з *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171 в клітинах-хазях *E. coli*. При 40 % масовій частці лактози, концентрація (% від загальної кількості цукру) становила ГОС 16,25%, лактози 39,40%, глюкози 20,76% та галактози 14,85% .

Штам дріжджів *Williopsis californica* IMV Y-5076, який продукує позаклітинну В-мананазу пропонує використовувати Борзова та ін. Продуцент виділили з ризосфери томату. Перевагою запропонованого продуцента є його здатність синтезувати високоактивну β -мананазу, відсутність сезонності та токсичності, що є технологічно ефективним. Ензимний препарат, одержаний з культуральної рідини *Williopsis californica* здатний ефективно деградувати монооліго- та полісахариди при значеннях рН середовища (4,0-6,0) з помітним піком активності при рН 5,0. Фермент стабільний при зазначених значеннях рН. Ензимний препарат ефективно гідролізує галактоманан гуару при 45 °С [49].

Також у патенті на винахід описується штам *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171, що продукує фермент В-галактозидазу, за допомогою якого лактоза перетворюється в суміш галактоолігосахаридів. Було виявлено, що продуцент також може зростати на таких субстратах відмінних від лактози як мальтоза, рафіноза, ксилан та фруктоза. Відповідно індукується експресія α -глюкозидази, α -галактозидази, ксилозидази, і В-фруктофуранозидази та продукуються глюкоолігосахариди, галактоолігосахариди, ксилоолігосахариди, та фруктоолігосахариди. Після культивування *B. bifidum* NCIMB 41171 на середовищі з лактозою, за допомогою ВЕРХ було визначена та галактоолігосахаридна суміш зі складом 25% Gal-Gal, 35% Gal-Gal-Glc, 24% Gal-Gal-Gal-Glc і 16% Gal-Gal-Gal-Gal-Glc [50].

На жаль, в Україні майже не розглядається біотехнологія одержання олігосахаридів мікробного походження. Зазвичай, в літературних джерелах описується синтез олігосахаридів за допомогою ферментних препаратів без опису їх продуцентів. Також в деяких статтях просто описуються ферменти такі як В-галактозидаза, В-фуранозидаза і ін. та їх використання в різних галузях промисловості.

З висівок злакових культур отримувати препарати ксилоолігосахаридів як пребіотики пропонує у тезі Журлова та Капрельянц. Висівки спочатку оброблювали парою, далі подрібнювали та знекрахмалювали ферментними

препаратами глюкоамілаз. Далі ферментним препаратом, що містить ксиланазу, оброблювали висівки. Вихід КОС становив 65,4 -68% [51].

Пребіотики з геміцелюлоз кукурудзяних початків пропонує одержувати Озоліна С. Геміцелюлози спочатку вилучали з сировини лужним розчином, далі додавали ферментний препарат «Вілізим», якому притаманна ксиланазна активність. Паралельно визначали оптимум рН для найбільшої активності ферменту. Досліди показали що в інтервалі від 4,6-7,5 активність не змінювалася. Під час проведення гідролізу без буферних систем у дистильованій воді, активність фермента також не змінюється [52].

Дослідниками Борзовою, Варбанець та ін. були виявлені штами *Penicillium aculeatum*, *P. tardum* і *P. rugulosum*, що продукують комплекс із β -мананазою та α -галактозидазою. Також були виявлені штами термофільних мікроміцетів видів *Corynascus sepedonium*, *Scytalidium thermophilum* та *Rhizomucor tauricus*, у культуральній рідині яких відмічали високу мананазну активність (10–130 од/мл). Два штами *P. aculeatum* та *P. tardum* проявляли β -мананазну, β -манозидазну й α -галактозидазну активності. Був показаний високий потенціал актинобактерій, оскільки мананазну активність проявляли 70 % усіх досліджених штамів (їх активність складала від 2 до 55 од/мл) [53].

Поширеним є застосування ферменту В-фруктофуранозидози в різних галузях промисловості. В хлібопекарстві (покращує якість хліба), кондитерському виробництві (цукерки «П'яна вишня»). Але цікавим для нас є застосування В-фруктофуранозидози для синтезу пребіотичних олігосахаридів (фосфоолігосахариди чи лактулоза) [54].

Галактуроноолігосахариди одержують ферментативним гідролізом пектинвмісної сировини (яблучних вичавок) за допомогою ферменту ендопектолітичної дії (Фруктозим ВЕ, активність 22,000 ПГ/мл). Було визначена оптимальна тривалість дії ферменту- 120 хв, температура- 40 °С та концентрація 0,55 мг/100 г, при яких відбувається зниження в'язкості 2 %-го розчину пектину на 79%. Дані результати вказують, що при обраних

параметрах проведення гідролізу вміст олігосахаридів в екстракті буде найвищим [55].

Використовувати мікробну В-галактозидазу у виробництві молочних ферментованих продуктів пропонують Мінорова А.В., Даниленко С.Г. та ін. У світі постає проблема лактазної недостатності у людей. Видалити лактозу з молочних продуктів можливо за допомогою мікроорганізмів, які володіють В-галактозидажною активністю (тобто розщеплюють лактозу на глюкозу та галактозу). Було розглянуто використання біфідобактерій, фермент яких не тільки розщеплює лактозу, а й утворює суміш галактоолігосахаридів, яка містить до 35% дисахаридів галабіози (запобігає адгезії токсинів) [56].

Узагальнені дані літературного огляду робіт вітчизняних вчених представлені в табл. 2.5.

Таблиця 2.5

№	Продуцент	Джерело вуглецю	Фермент	Активність ферменту	Вихід	Джерело
1	<i>Bifidobacterium bifidum</i> NCIMB 41171, <i>E.coli</i> DH5a	8 г 50%-ний лактози	В-галактозид аза	735 Од./мл	16,25% від заг.к-сті цукру	48
2	<i>Williopsis californica</i> IMV Y-5076	рідке середовище сусло, яке містить 1 % галактоманану камеді гуару	В-мананаза	70 Од./мл	-	49

3	<i>Bifidobacterium bifidum</i> NCIMB 41171	Лактоза	В- галактозид аза	40 Од./мл	Суміш галакто олігоса харидів	50
4	<i>Corynascus sepedonium</i> , <i>Scytalidium thermophilum</i> та <i>Rhizomucor tauricus</i>	Галактоман ан гуару	В- мананаза	10–130 Од./мл	-	53

Примітка: «-» - дані не наведено

Отже, проаналізувавши дослідження за останні 10 років, можна сказати, що проблема отримання мікробних олігосахаридів вітчизняними та закордонними вченими вивчалася досить широко. Багато наукових праць направлено на одержання фруктоолігосахаридів, галактоолігосахаридів, ксилоолігосахаридів та мананоолігосахаридів. Науковці вивчали вплив різної активності ферментів на різні субстрати та вихід або концентрацію кінцевого продукту- олігосахаридів, оптимізували параметри культивування, проводили скрінінг найкращих біологічних агентів, здійснювали іммобілізацію клітин на носіях, двоетапну ферментацію і т.д. За допомогою даного аналізу статей, в подальшому можна вибрати найкращого біологічного агента для отримання олігосахаридів як пребіотиків.

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВА ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ

3.1. Обґрунтування біосинтетичної здатності біологічного агента для отримання субстанції

Пребіотики представляють собою функціональні (дієтичні) інгредієнти, які вибірково стимулюють ріст і біологічну активність мікроорганізмів в кишечнику людини, позитивно впливаючи на склад мікробіоценозу [57].

Пребіотичні речовини реалізуються самостійно у вигляді збагачених добавок до різноманітних продуктів харчування або у вигляді синбіотиків - добавки, що включають крім пребіотиків пробіотичні мікроорганізми [57].

Найбільш добре вивчені та часто використовувані пребіотики: олігофруктоза, інулін, фруктоолігосахариди (ФОС), лактулоза [58].

Фруктоолігосахариди містяться в таких рослинах, як цибуля, цикорій, часник, спаржа, банан, артишок та багато інших. Вони складаються з лінійних ланцюгів фруктози (кількість одиниць фруктози коливається від 2 до 60), сполучених бета зв'язками [58].

За структурою ФОС є нетрадиційними цукрами, а саме кестозою (GF 2), ністозою (GF 3) і фруктофуранозилністозою (GF 4), що складається з $\beta(2\rightarrow1)$ пов'язаних одиниць фруктози (F), приєднані до кінцевої частини глюкози (G) за допомогою $\alpha(2\rightarrow1)$ зв'язку [30].

Ці олігосахариди є важливими пребіотиками, оскільки їх щоденне споживання є пов'язаним з багатьма перевагами для здоров'я, такими як: зниження захворюваності кишечником інфекції, захист від раку товстої кишки, покращення засвоєння мінералів, зниження загального холестерину та ліпідів у сироватці крові та загальне покращення здоров'я людини [59, 60].

					НУХТ БТЕК 02.02.08 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Максимець О.О.			РОЗДІЛ 3. Техніко- економічне обґрунтування виробництва лікарського засобу	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Грегірчак Н.М.					35	147
Консультант								36
Н.Контр.						Кафедра БТМ		
Затверд.		Стабніков В.П.						

З цієї причини останнім часом відбулося стрімке зростання ринку ФОС років у всьому світі. Нині найбільшим світовим ринком пребіотичних продуктів є Європа. Щоб задовольнити потреби ринку, важливо продовжувати пошук нових мікроорганізмів з потенціалом продукування FFase та ферментативного синтезу ФОС [61].

На основі аналізу літературних джерел в попередніх розділах (див. розділ 1 та 2), узагальнюємо інформацію про найкращих біологічних агентів та умови їх культивування у табл. 3.1.

Таблиця 3.1

Особливості одержання фруктоолігосахаридів різних мікроорганізмів

Біологічний агент	Склад поживного середовища, г/л	Тривалість культивування, год	Концентрація фруктоолігосахаридів, г/л	Особливості процесу біосинтезу	Використана література
<i>Aureobasidium pullulans</i> CCY 27-1	Сахароза-200, NaNO ₃ -5, KH ₂ PO ₄ - 4, KCl - 0,5, H ₂ SO ₄ - 0,35, MgSO ₄ · 7H ₂ O - 0,5, FeSO ₄ · 7H ₂ O - 0,01.	25	108,17 ± 8,83	Імобілізація продуцента на сітчастому пінополіуретані. рН 5,5, температура 28 °С, перемішування 150 об/хв, інокулянт мікроорганізму 1 мл (9*10 ⁷ спор/мл)	Castro CC, Nobre C, Duprez ME, De Weireld G, Hantson AL. Screening and selection of potential carriers to immobilize <i>Aureobasidium pullulans</i> cells for fructooligosaccharides production. <i>Biochem Eng J.</i> 2017; 118:82–90. doi: 10.1016/j.bej.2016.11.011 [27]
<i>Penicillium citreonigrum</i> UMR 4459	Сахароза-200, NaNO ₃ -2, MgSO ₄ · 7H ₂ O - 0,5, K ₂ HPO ₄ - 5, KCl - 0,5	67,8	58,7	рН 6,5, температура 25,5 °С	Nascimento AKC, Nobre C, Cavalcanti MTH, Teixeira JA, Porto ALF. Screening of fungi from the genus <i>Penicillium</i> for production of β-fructofuranosidase and enzymatic synthesis of fructooligosaccharides. <i>J Mol Catal B-Enzym.</i> 2016; 134:70–78. doi:10.1016/j.molcatb.2016.09.005 [30]

Закінчення табл. 3.1

<i>A. pullulans</i> , <i>S. cerevisiae</i> .	Сахароза – 200, KCl 0,5, K ₂ SO ₄ - 0,35 ; MgSO ₄ · 7H ₂ O - 0,5, FeSO ₄ · 7H ₂ O -0,01.	51±2	101±3	Двоетапна ферментація: Спочатку <i>A. pullulans</i> розщеплює сахарозу до глюкози та фруктоолігосахаридів, щоб концентрація фруктоолігосахаридів стала вищою, середовище засівають <i>S. cerevisiae</i> , що розщеплює отриману глюкозу з утворенням фруктоолігосахаридів. 32 °C, 385 об/хв, рН 5,5 ±0,05	Nobre C, Castro CC, Hantson AL, Teixeira JA, De Weireld G, Rodrigues LR. Strategies for the production of high-content fructo-oligosaccharides through the removal of small saccharides by coculture or successive fermentation with yeast. <i>Carbohydr Polym.</i> 2016; 136:274–281. doi:10.1016/j.carbpol.2015.08.088 [28]
<i>Aureobasidium pullulans</i> іре-3	Сахароза – 200, дріжджовий екстракт-10, NaNO ₃ -5, KH ₂ PO ₄ – 4, KCl - 0,5, FeSO ₄ · 7H ₂ O -0,01, K ₂ SO ₄ - 0,35, MgSO ₄ · 7H ₂ O - 0,5	60	548,3±37,4	Підтримка концентрації розчиненого кисню DO вище 5% у культурі з повторним завантаженням, рН 5,5, 25 °C, 600 об/хв	Liang, X.; Li, C.; Cao, W.; Cao, W.; Shen, F.; Wan, Y. Fermentative Production of Fructo-Oligosaccharides Using <i>Aureobasidium pullulans</i> : Effect of Dissolved Oxygen Concentration and Fermentation Mode. <i>Molecules</i> 2021, 26, 3867. [6]

За результатами, наведеними у *табл. 3.1*, показано, що найбільший синтез фруктоолігосахаридів спостерігається у *Aureobasidium pullulans* іре-3-548,3±37,4 г/л, найнижчий у *Penicillium citreonigrum* UMR 44591- 58,7 г/л.

Проте, така порівняльна характеристика технологічного процесу є недостатньою, щоб оцінювати найкращого біологічного агента. Тому на наступному етапі вибору порівнюємо вартість поживних середовищ (*табл. 3.2*) використовуваних усіма продуцентами.

Таблиця 3.2

Вартість компонентів поживного середовища для культивування продуцентів фруктоолігосахаридів

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації (1,2,3)*
<i>Aureobasidium pullulans</i> ССУ 27-1	Сахароза 200	84	16,8	1
	NaNO ₃ 5,0	27,50	0,137	2
	KH ₂ PO ₄ 4,0	53	0,23	3
	KCl 0,5	40	0,212	4
	H ₂ SO ₄ 0,35	80	0,028	5
	MgSO ₄ · 7H ₂ O 0,5	15	0,0075	6
	FeSO ₄ · 7H ₂ O 0,01	7	0,00007	7
Вартість 1 л середовища- 17,4 грн				
<i>Penicillium citreonigrum</i> UMR 4459	Сахароза 200	84	16,8	1
	NaNO ₃ 2	27,50	0,055	2
	MgSO ₄ · 7H ₂ O 0,5	15	0,0075	6
	K ₂ HPO ₄ 5	115	0,575	8
	KCl 0,5	40	0,02	4

	Вартість 1л середовища- 17,5 грн			
<i>A. pullulans, S. cerevisiae.</i>	Сахароза 200	84	16,8	1
	KCl 0,5	40	0,02	4
	K ₂ SO ₄ 0,35	55,70	0,019	9
	MgSO ₄ · 7H ₂ O 0,5	15	0,0075	6
	FeSO ₄ · 7H ₂ O 0,01	7	0,00007	7
	Вартість 1л середовища- 16,8 грн			
<i>Aureobasidium pullulans</i> ірє-3	Сахароза 200	84	16,8	1
	дріжджовий екстракт 10	14	0,14	10
	NaNO ₃ 5	27,50	0,14	2
	KH ₂ PO ₄ 4,0	53	0,23	3
	KCl 0,5	40	0,212	4
	FeSO ₄ · 7H ₂ O 0,01	7	0,00007	7
	K ₂ SO ₄ 0,35	55,70	0,019	9
	MgSO ₄ · 7H ₂ O 0,5	15	0,0075	6
	Вартість 1л середовища- 17,5 грн			

Примітка. * – Ціни наведено станом на листопад 2021 р.

- <https://www.systopt.com.ua/ru/item-saharoz-a>,
- <https://prom.ua/ua/p1335457271-nitrat-natriyu.html?> ,
- <https://prom.ua/ua/p1426572855-monokalij-fosfat-kn2po4.html>
- <https://prom.ua/ua/p1276893716-kalij-hloristyj-melkozernistyj.html?&primelead=Mi4zNw> ,
- <https://prom.ua/ua/p1204911697-sernaya-kislota.html?&primelead=Mi44Mw>,
- <https://tovpaz.com/ru/products/udobreniya/mineralnye/sulfat-magniya-alwernia-mgso47h2o>,
- <https://flagma.ua/zhelezny-kuporos-o2154855.html>,
- <https://prom.ua/ua/p1091383043->

- [monofosfat-kaliya-kalij.html?&primelead=MS4wMQ](https://prom.ua/ua/p1510548814-monofosfat-kaliya-kalij.html?&primelead=MS4wMQ), 9. <https://prom.ua/ua/p1510548814-sulfat-kaliya-kalij.html>. 10. <https://flagma.ua/uk/ekstrakt-drizhdzhiv-drozhzhevoy-ekstrakt-o11604150.html>.

Відмічено, що середовище для одержання ФОС продуцентами *A. pullulans*, *S. cerevisiae*. є дешевшим на 6 коп за *Aureobasidium pullulans* ССҮ 27-1 (17,4), та на 7 коп за середовище для культивування *Penicillium citreonigrum* UMR 4459 та *Aureobasidium pullulans* іре-3 (17,5 грн).

Для того, щоб остаточно обрати найефективніший біологічний агент треба розрахувати умовну вартість 1 г цільового продукту – фруктоолігосахаридів (табл. 3.3).

Таблиця 3.3

Умовна вартість 1 г цільового продукту (фруктоолігосахаридів) при культивуванні продуцентів

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища, грн	Концентрація фруктоолігосахаридів, г/л	Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г	Тривалість культивування, год
<i>Aureobasidium pullulans</i> ССҮ 27-1	17,4	108,17±8,83	0,16	25
<i>Penicillium citreonigrum</i> UMR 4459	17,5	58,7	0,3	67,8
<i>A. pullulans</i> , <i>S. cerevisiae</i>	16,8	101±3 г/л	0,17	51±2
<i>Aureobasidium pullulans</i> іре-3	17,5	548,3	0,032	60

Проаналізувавши отримані результати, можна відмітити, що умовна вартість 1 г цільового продукту є найменшою у *Aureobasidium pullulans* іре-3 – 0,032 грн/г. Найдорожчими для отримання 1 г цільового продукту є *Penicillium citreonigrum* UMR 4459 (0,3 грн/г).

Отже, можна зробити висновок, що найкращим біологічним агентом для одержання фруктоолігосахаридів є *Aureobasidium pullulans* іре-3. Цей мікроорганізм утворює кінцевий продукт за відносно короткий проміжок

часу (60 год) порівняно з 67,8 год та 53 год інших продуцентів. Найголовнішим критерієм для вибору є умовна вартість 1 г продукту і *A. pullulans* іре-3 є найкращим серед взятих продуцентів (0,032 грн/г). Тому для подальшої роботи пропонується використовувати продуцент фруктооліосахаридів *Aureobasidium pullulans* іре-3.

3.2. Аналіз фармакологічних властивостей цільового ЛЗ, галузей використання, потреби у ЛЗ

Опис фармакологічних властивостей олігосахаридів наведено у Розділі 1 «Характеристика мікробних олігосахаридів як пребіотиків» у підрозділах 1.1 «Роль олігосахаридів у формуванні нормальної мікрофлори людини» та у 1.2. «Застосування олігосахаридів в якості пребіотика для людини».

Але також, варто відмітити, що окрім фармацевтичної галузі, олігосахариди знайшли своє використання також і у харчовій промисловості.

Так, фруктоолігосахариди у харчовій галузі зазвичай використовуються як заміник цукру і жиру через їх органолептичні властивості. Відповідно до рекомендацій FAO-ВООЗ (2001) споживання ФОС до 20 г вважається безпечним. У деяких харчових продуктах на водній основі, таких як молочні продукти, заправки, заморожені десерти та м'ясні продукти, замінюють жир на олігофруктозу та інулін. У більшості харчових продуктів 1 г жиру можна замінити приблизно 0,35 г ФОС або інуліну. Олігофруктоза має деякі функціональні властивості з сиропом глюкози і використовується як заміна у молочних та хлібобулочних продуктах [62].

Олігофруктоза також знижує температуру замерзання заморожених десертів і подібного цукру, який служить як сполучна речовина в харчових батончиках. Також показано, що ФОС та інулін впливають на реологічні властивості тіста [62]. Вищий вміст ФОС/инуліну знижував водопоглинання тіста за рахунок різного ступеня полімеризації. Це також підвищило еластичність стійкість тіста. Розроблено рецептуру печива, в якій ФОС

можна використовувати як часткову заміну сахарози. Додавання ФОС призводить до бажаної м'якої текстури печива .

Фармацевтичний ринок України представлений широким асортиментом пребіотиків з фруктоолігосахаридами (табл 3.4).

Таблиця 3.4

Пребіотичні препарати, що містять у своєму складі фруктоолігосахариди

Назва пребіотика	Склад	Виробник	Застосування	Ціна	Ціна за грам, грн	Ціна за курс лікування (6 місяців), грн	Джерело
F.O.S	Клітковина 5 г Фруктоолігосахариди 5 г	NOSOROG, Україна	Дорослим 5 г/день	234 грн/200 г	1,17	1 064,7	67
Stark Inulin & FOS	Інулін-2500 мг Фруктоолігосахариди-2500 мг	Stark Pharm, Україна	1 чайна ложка/день	238 грн/300 г	0,79	718,9	68
Nutra Flora FOS	Фруктоолігосахариди	Now Foods, США	½ чайної ложки/день	531 грн/113 г	4,7	4 277	69
FOS Фруктоолігосахариди	Фруктоолігосахариди 198 г	Source Naturals, США	1 чайна ложка/день	688 грн/200 г	3,44	3 130	70

Після аналізу наявних на фармацевтичному ринку пребіотиків, треба сказати, що препаратів, які містять у своєму складі фруктоолігосахариди є достатньо. Виробниками найчастіше виступають Україна та США, але варто відмітити, що імпорتنі пребіотики мають вищу ціну хоча за складом подібні до вітчизняних.

Щоб розрахувати річну потужність виробництва за основу візьмемо препарат пребіотик «F.O.S». Даний препарат допомагає спростити отримання організмом всіх необхідних для його нормального функціонування компонентів та допомагає отримати оптимальну кількість різноманітних корисних мікроорганізмів [67].

Nosorog F.O.S., 200 грам виготовлений виключно з натуральних рослинних інгредієнтів, які не здатні надавати ніякого негативного або алергічного впливу на людей різної статі або віку [66].

Пребіотик, як було зазначено вище стимулює ріст та активність захисної мікрофлори кишечника. Найпоширенішими хворобами органів травлення є дисбактеріоз, колоректальний рак, виразковий коліт, синдром подразненої товстої кишки з діареєю та хвороба Крона.

Хвороба Крона товстої кишки – гранульоматозне запалення невідомої етіології з початковим ураженням термінального відділу здухвинної кишки з дистальним поширенням, що характеризується стенозом уражених ділянок, утворенням норичь і вираженими позакишковими проявами (артрити, ушкодження шкіри, очей тощо). Лікарі при такій хворобі використовують для лікування патогенетичні засоби (глюкокортикоїди, цитостатики, біологічні препарати), а для профілактики- симптоматичні (пробіотики, пребіотики та спазмолітики). Найпоширенішими препаратами, які приписують пацієнтам з даною хворобою є антибіотики: метронідазол, ципрофлоксацин та рифаксимін. Дані препарати рекомендують приймати протягом 7 днів. Відомо, що разом з антибіотикотерапією варто приймати і засоби для відновлення нормальної мікрофлори кишківника [63-65].

Згідно статистичних даних, станом на 2019 рік кількість хворих на хворобу Крона в Європі становила 2,2 млн осіб [66].

Пребіотик «F.O.S» випускається у формі порошку, який не містить смакових добавок [67].

Склад Nosorog F.O.S., 200 г на порцію:

1 порція - 1 мірна ложка (5 г)

Порцій на упаковку - 40

Кількість на 1 порцію:

Калорій - 10

Всього вуглеводів - 5 г (2%)

Клітковина - 5 г (20%)

Фруктоолігосахаріди (ФОС) - 5000 мг

Рекомендації щодо застосування:

Nosorog F.O.S., 200 грам приймають по 1 мірній ложці в день, змішуючи продукт з водою або їжею. Поступово можливе збільшення дози до 3-х ложок в день. Разова порція містить 5 грам фруктоолігосахаридів.

Добова доза пребіотиків необхідних для людини становить 20 г. Візьмемо до уваги, що значна частка даних речовин надходить в організм разом з продуктами харчування: крупи, овочі, фрукти. Враховуючи цей факт і рекомендації по вживанню пребіотика «F.O.S» обираємо дозу у 5 г [67].

Впродовж всього періоду лікування антибіотиками (7 днів) потрібно вживати пребіотики і обов'язково продовжити прийом після, задля підтримки та профілактики мікробіоти. Період профілактики пребіотиками зазвичай триває до півроку, тому курс лікування обираємо у 182 дні (7 днів курсу антибіотиками + 175 днів) – 6 місяців.

Доза для хворих: 5 г.

Курс лікування: 1 доза на добу протягом 182 днів.

Потреба на курс:

$$P_{\text{дт}} = 1 \text{дз} \times 5 \text{ г} \times 182 \text{ дн} \times 2\,200\,000 \text{ хворих} \approx 2\,000\,000 \text{ кг.}$$

Узагальнені дані про потребу населення Європи у пребіотику «F.O.S» для лікування та профілактики хвороби Крона наведено у табл. 3.5.

Таблиця 3.5

Вихідні дані для розрахунку річної потреби у фруктоолігосахаридях для одержання пребіотика

Захворювання (профілактика)	Доза препарату, г	Кількість прийомів на добу	Кількість хворих за 2019 р	Тривалість прийому, днів	Кількість ФОС на 1 людину, г	Загальна необхідна кількість ФОС, кг
Хвороба Крона	5	1	2 200000	182 дні (6 місяців)	910	2 000 000

3.3 Розрахунок потреби у субстанції для випуску ЛЗ та розрахунок річної потреби у культуральній рідині для одержання розрахованої кількості субстанції

Країна та виробник пребіотика «F.O.S» - NOSOROG (Україна). Фруктоолігосахариди відомі пребіотики і випускаються для профілактики та лікування хвороб органів травлення. Також варто зауважити, що не тільки фруктоолігосахариди як пребіотики існують на фармацевтичному ринку. Конкуренцію їм складають інулін, лактулоза, ксило-, мальто-, галактоолігосахариди [12-20, 62, 67].

Так, як в Україні не проводять аналізу ринку пребіотиків, дані можемо взяти з інших країн. На прикладі Японії (рис.3.1) треба сказати, що фруктоолігосахариди становлять невелику частку у виробництві/споживанні олігосахаридів (лише 5%) [71].

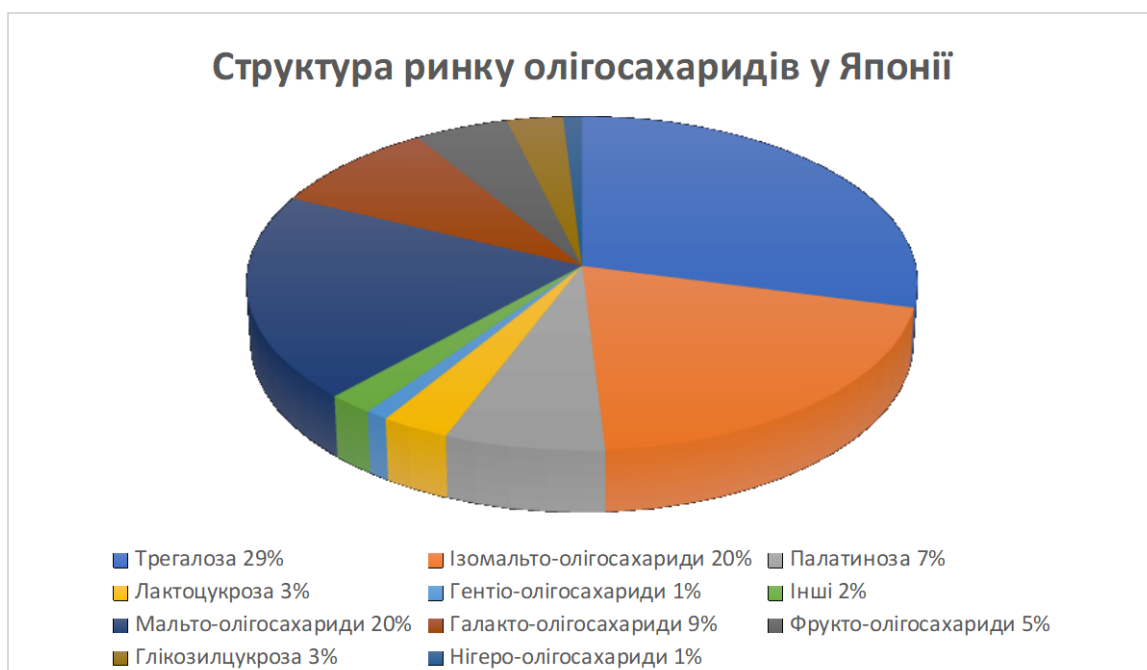


Рис. 3.1. Структура ринку олігосахаридів у Японії

З попередніх розрахунків був вибраний біологічний агент *Aureobasidium pullulans* іре-3, продуктивність якого становить $P_{кр} = 548,3$ г/л = $548,3$ кг/м³ культуральної рідини.

Плануємо, що вибрану кількість субстанції будемо виробляти $T_{рд} = 220$ робочих трудовнів. Для подальших розрахунків необхідно знати тривалість виробничого циклу $T_{ф} = 60$ год.

Враховуючи всі вищезазначені фактори, визначимо потребу у фруктоолігосахаридах при реалізації даного проєкту не більше 1%.

Отже, потужність виробництва складе:

$$G_{нт} = 2\,000\,000 \times 0,01 \approx 20\,000 \text{ кг.}$$

Згідно з ТЕО потреба у ФОС складає $G_{нт} = 20\,000$ кг. За умовами, цю кількість ФОС потрібно виробити за $T_{рд} = 220$ днів. За літературними даними максимальний синтез ФОС ($P_{кр} = 548,3$ г/л за $T_{ф} = 60$ год культивування) досягається за умов росту штаму *Aureobasidium pullulans* іре-3. Відповідно до ТУ вміст сухих речовин в готовому продукті $CP_{гп} = 0,9$.

Для проведення подальших розрахунків приймемо наступні початкові дані: час циклу роботи ферментера $T_{цф} = T_{ф} + T_{по} = 60 + 10,5 = 70,5$ год, де $T_{ф}$ - час культивування; $T_{по}$ - час проведення підготовчих операцій; коефіцієнт запасу (втрати культуральної рідини або посівного матеріалу від нестерильних операцій 1,1-1,5) $K_1 = 1,25$. Сумарні втрати при одержанні готового продукту $E_{св} = 0,175$.

Кількість продукту на добу ($G_{нтд}$) становитиме:

$$G_{нтд} = G_{нт} / T_{рд} = 20\,000 / 220 = 91 \text{ кг/добу.}$$

Кількість фруктоолігосахаридів за цикл:

$$G_{цк} = G_{нтд} \cdot T_{цф} / 24 = 91 \cdot 70,5 / 24 = 267 \text{ кг/цикл.}$$

Об'єм КР, що зливається за одну ферментацію (цикл) з врахуванням втрат при виділенні готового продукту, а також за рахунок можливих нестерильних операцій:

$$V_{кр} = K_1 \cdot G_{цк} \cdot CP_{гп} / P_{кр} (1 - E_{св}) = 1,25 \cdot 267 \cdot 0,9 / 548,3 (1 - 0,175) = 0,66 \text{ м}^3.$$

Щоб розрахувати геометричний об'єм ферментера, обираємо коефіцієнт заповнення $K_3 = 0,6$:

$$V_{гф} = V_{кр} / K_3 = 0,66 / 0,6 = 1,1 \text{ м}^3$$

Обираємо геометричний об'єм ферментера – 1,1 м³.

Кількість ферментацій (циклів) за рік:

$$N_{\text{цик}} = G_{\text{нт}} / G_{\text{цик}} = 20\,000 / 267,3 = 74,9. \text{ Прийmemo } 75 \text{ циклів.}$$

Так як, концентрація фруктоолігосахаридів у КР становить 548,3 кг/м³, а потреба у Європі 20 000 кг, то об'єм культуральної рідини включно з витратами за рік дорівнює:

$$VKP_{\text{річ}} = (20\,000 / 548,3) \cdot 1,25 \cdot 0,9 / (1 - 0,175) = 50 \text{ м}^3.$$

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

Під час процесу виділення та очищення субстанції (з врахуванням втрат) одержують 272 кг фруктоолігосахаридів. Оскільки наш лікарський засіб повністю складається з діючої речовини та пакується по 5 г у саше, то за один цикл виробництва можна одержати (1% втрат) 53 856 пакетиків саше. Кількість виробничих серій препарату за рік дорівнює річній кількості циклів культивування:

$$220 \text{ трудоднів} \cdot 24 \text{ год} / 70,5 \text{ год} = 75 \text{ серій.}$$

Отже, розрахована теоретична річна потужність виробництва порошку фруктоолігосахаридів становить 20 400 кг (4 080 000 пакетиків саше).

РОЗДІЛ 4. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

4.1 Обґрунтування стадій виділення та очищення цільового продукту

Щоб виготовити ефективний та якісний лікарський засіб (у нашому випадку пребіотичний препарат), потрібно підібрати та обґрунтувати вибір усіх необхідних технологічних операцій.

Пребіотики - це неперетравлювані харчові інгредієнти, які вибірково стимулюють ріст корисних бактерій в товстій кишці, що надає ряд переваг для здоров'я людини. Пребіотики повинні досягати товстої кишки без розкладання або гідролізу в процесі і повинні служити харчовим субстратом для сапрофітної мікрофлори товстої кишки. Деякі поширені пребіотики - це фруктоолігосахариди, галактоолігосахариди, ксилоолігосахариди, глікоолігосахариди, ізомальтоолігосахариди, соєві олігосахариди, полідекстроза, арабіноза, маноза, рафіноза, лактулоза, стахіоза, інулін, і так далі [72].

Пребіотик «F.O.S» - NOSOROG» є препаратом біологічного походження, в складі якого містяться фруктоолігосахариди [67].

Даний лікарський засіб застосовується як харчова добавка до їжі, що є додатковим джерелом неперетравлюваних волокон, які не здатні надавати ніякого негативного або алергічного впливу на людей різної статті або віку.

Лікарська форма препарату має вигляд пакетиків саше, всередині яких порошок світлого кольору, масою 5 г. Пребіотик приймають по 1 пакетик у день, змішуючи продукт з водою або їжею. Можливе збільшення дози до 3-х пакетиків в день. Разова порція містить 5 грам фруктоолігосахаридів.

					НУХТ БТЕК 02.02.08 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Максимець О.О.			Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Грегірчак Н.М.				49	147
Консультант					50		
Н.Контр.					Кафедра БТМ		
Затверд.		Стабніков В.П.					
РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми							

Беручи до уваги все вищенаведене, кінцева продукція даного проєкту є готовою лікарською формою, тому оптимальна технологічна схема виділення пребіотичного препарату включає такі стадії як: зберігання культуральної рідини, відокремлення біомаси від культуральної рідини, очищення та концентрація фруктоолігосахаридів, змішування з допоміжними речовинами, сушіння, та стадії фасування, пакування і маркування цільового продукту.

4.2. Вибір способу відокремлення біомаси та відповідного обладнання

Після процесу біосинтезу, отримана культуральна рідина складається із залишків компонентів поживного середовища, метаболітів і біомаси *Aureobasidium pullulans* іре-3. З огляду на це, необхідним етапом є відокремлення супернатанту від біомаси, адже її залишки та метаболіти можуть погіршити якість готового препарату [73].

Варто пам'ятати, що обладнання для процесу відділення біомаси має бути сконструйоване таким чином, щоб поверхні, які контактують із сировиною, не змінювали характеристики АФІ [74].

Відомі різні способи відділення біомаси від необхідного нам супернатанту:

- Сепарація, центрифугування: розподіл під дією центробіжних сил.
- Фільтрація: пропускання суспензії крізь фільтруючий матеріал, на якому затримуються частки твердої фази. Існує ще мікро- та ультрафільтрація (пропускання суспензії крізь мембрани з малим діаметром пор, котрі забезпечують утримання клітин мікроорганізмів).
- Флотація: захоплення біомаси мікроорганізмів кульками піни і виділення їх із пінної фракції.
- Коагуляція: додавання до суспензії реагентів, які допомагають осадженню більш крупних клітинних агрегатів і відділенню їх із рідини шляхом відстоювання [75].

Недоліками флотації та коагуляції є велика втрата біомаси, а також у випадку з коагуляцією – необхідність утилізувати осади, які мають високу вологість (до 99%).

Розглянемо найбільш поширені на виробництвах методи відділення біомаси.

Центрифугування. Концентрування біомаси методом центрифугування ґрунтується на відмінності в щільності клітин і культуральної рідини і відбувається під дією відцентрової сили. Визначальним фактором процесу є швидкість осадження. Вона залежить від таких факторів, як в'язкість середовища, розмір часток і різниця в щільності між частинками і середовищем. Як і будь-який метод, центрифугування має свої переваги та недоліки. Перевагами є можливість отримати середовище і клітини, незабруднені фільтратом, повна автоматизація процесу, компактність конструкції, простота обслуговування, безперервність технологічного процесу розділення суспензій, можливість промивки осаду, високий ступінь осушування, велика продуктивність, можливість включення в автоматичні або безперервно діючі технологічні лінії. Недоліки: енергоємність процесу, зношування шнека та ротора [76-78].

Фільтрація. Найбільш вживаними типами фільтрування клітин мікроорганізмів з культурального середовища є осадова і мембранна фільтрація.

Для проведення *осадової фільтрації* використовують високопористі матеріали з глибокими і звивистими порами. Під час фільтрування, осад, що залишається на фільтрі зіскоблюють з його поверхні. Такий спосіб дозволяє добре очистити фільтрат, але біомаса часто виявляється забруднена. Ще одним значним недоліком є великі втрати біомаси за рахунок проходження частини клітин через пори фільтруючого матеріалу, тобто супернатант залишається «забрудненим» [76].

В процесі мембранної фільтрації при русі біомаси в напірному каналі мембранного елемента відбувається її концентрування за рахунок видалення частини води з розчиненими в ній речовинами: через пори мікрофільтраційних мембран проходять розчинені у воді солі, білки, полісахариди, а клітини молочнокислих бактерій, затримуються, утворюючи при цьому потік концентрату. Безумовно, при високих швидкостях під час руху в напірному каналі мембранного елемента в гідродинамічному потоці клітини будуть травмуватися під дією напруги зсуву. Ще одним суттєвим недоліком є налипання клітин на мембрану і подальше її закупорювання, що призводить до поломки обладнання [77].

Отже, взявши до уваги всі переваги та недоліки способів відділення біомаси від супернатанту обираємо метод центрифугування.

Далі необхідно підібрати параметри центрифугування. Час центрифугування і число обертів залежать від розмірів клітин. Чим вони менше, тим більше потрібно обертів і тим тривалішим має бути час центрифугування [79].

Aureobasidium pullulans іре-3- це дріжджоподібний гриб. Середній розмір клітини 9,0–12,0x4,0 мкм. Проаналізувавши всі можливі параметри центрифугування дріжджів, узагальнюємо, що часто використовуваним є - 6000 об/хв упродовж 40 хв [80].

Визначивши параметри центрифугування, обираємо осаджувальну центрифугу зі шнековою вигрузкою осаду.

4.3. Вибір способу очищення та концентрування фруктоолігосахаридів та відповідного обладнання

Під час синтезу фруктоолігосахаридів шляхом мікробної ферментації, виробляється значна кількість неолігосахаридів, такі як глюкоза, фруктоза та сахароза, що впливають на пребіотичну активність кінцевого продукту. Таким чином, щоб одержати якісні ФОС необхідний наступний етап очищення. Існує кілька відомих технік для відділення цукру:

ультрафільтрація, нанофільтрація, використання систем з активованим вугіллям, іонообмінна хроматографія тощо [81].

Так, мікрофільтрація та ультрафільтрація мають великий недолік у вигляді вихідної суміші, що часто містить низькомолекулярні цукри, які можуть вплинути на корисні ефекти високомолекулярних олігосахаридів. Цю проблему може вирішити нанофільтрація, яка з'явилася як метод концентрації та очищення ФОС, який використовує мембрани, що мають розмір пор 200–1000 Да. Зазвичай нанофільтрація поділяється на два етапи: діафільтрація та нанофільтрація. Після концентрування діафільтрацією, пермеат піддають обробці подальшою нанофільтрацією що призводить до виходу ФОС понад 80% і чистотою близько 90%. Загалом є багато досліджень щодо збільшення ефективності виходу та очищення ФОС фільтрацією: застосування, порівняння та модифікація різних типів мембран [82].

Цікавим є спосіб виділення фруктоолігосахаридів за допомогою активованого вугілля. Відомо, що цукор адсорбується на активованому вугіллі завдяки силам Ван-дер-Ваальса. Основна площа поверхні активованого вугілля неполярна або гідрофобна, тому гідрофобні речовини адсорбуються на ньому [83].

Гідрофобність цукру пов'язана зі ступенем СН- груп, тобто цукри адсорбуються відповідно до їх молекулярної маси, за умови, що стереохімія зв'язків сприятлива. Тому, фруктоолігосахариди краще адсорбується на вугіллі, ніж дрібні сахариди (сахароза, фруктоза та глюкоза) [83].

Найпоширеніший процес, який використовується для очищення олігосахаридів за допомогою активованого вугілля, поділяється на три етапи:

- Завантаження суміші олігосахаридів та активованого вугілля у колонки;
- Вимивання неутриманих сполук (моносахариди та солі) чистою водою;

- Адсорбовані цукри вибірково відновлюються за допомогою етанолу [83].

Очищення фруктоолігосахаридів за допомогою такого методу дає їх чистоту 97,8%. Недоліком даного способу є низька ефективність відділення від сахарози та залежність ефективності очищення від типу підбраного активованого вугілля.

Іонообмінна хроматографія. Науковці детально вивчали потенціал використання іонообмінних смол для розділення вуглеводів. Хроматографічне розділення засноване на молекулярних відмінностях вуглеводів. Тому ця методика дозволяє відокремити дуже схожі вуглеводи (ізомери) і демонструє дуже високий потенціал для відділення ФОС [83].

У промислових масштабах іонообмінні смоли використовувалися як адсорбенти в моделюванні руху (SMB) хроматографії. Іонообмінні смоли сульфовані полі(стирол-ко-дивінілбензол) (PS-DVB) широко використовувалися через їхню хімічну інертність, більшу ємність і селективність. Проведення ефективної іонообмінної хроматографії залежить від смоли. Недоліком даного способу є те, що смоли гелеподібного типу є м'якими, стисливими і здатні набухати у розчиннику [83].

Перевагою використання імітованої хроматографії з рухомим шаром (SMB) полягає в тому, що її можна проводити в безперервному режимі з водою як елюентом [84].

SMB хроматографія складається з декількох хроматографічних колонок, з'єднаних послідовно, зі складною системою клапанів, які дозволяють проводити зміщення точок введення та збору. Система працює із безперервним протічечним рухом твердої фази відносно рідкої без руху адсорбенту. Натомість рух адсорбенту імітується клапанами, які переміщують розташування двох вхідних (потік і елюент) і двох вихідних потоків (рафінат і екстракт) шляхом перемикання однієї колонки в напрямку потоку рідкої фази через фіксований інтервал часу (рис.4.1). [83, 85].

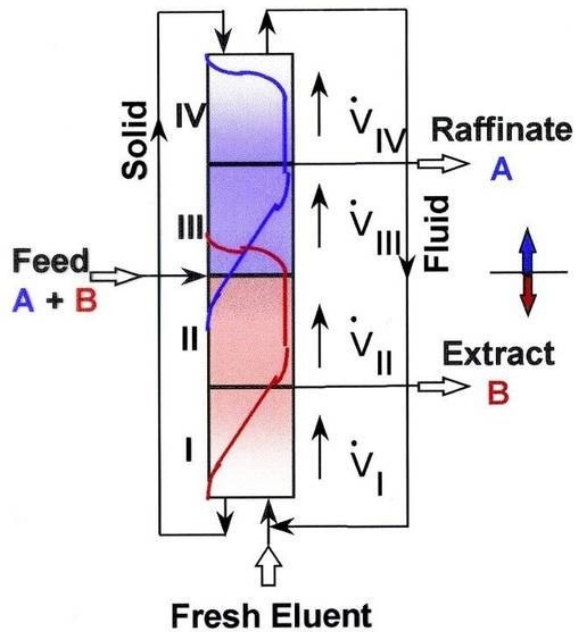


Рис. 4.1. Схематичне зображення принципу дії smb - хроматографа

Основними перевагами цього методу розділення є те, що він працює як безперервна система і забезпечує дуже важке розділення (навіть з компонентами з низькою селективністю). Порівняно з елюційною хроматографією, вищої продуктивності SMB хроматографії досягають із меншим споживанням розчинника і це стає економічно вигідним для великомасштабного розділення. Однак конструкція, функціонування, оптимізація та контроль процесу є складними, вимагає більше часу для запуску [83].

Тому, беручи до уваги всі переваги та недоліки методів очищення та концентрування фруктоолігосахаридів, процес SMB-хроматографії видається найбільш перспективним для його промислового очищення.

4.4. Вибір способу сушіння фруктоолігосахаридів та відповідного обладнання

Після стадії SMB-хроматографії ми отримуємо розчин фруктоолігосахаридів, який необхідно висушити щоб отримати готову діючу речовину.

Сушіння- це процес, який передбачає видалення вологи з твердих, вологих, пастоподібних та рідких матеріалів шляхом її випаровування та видалення пари, що утворюється. Сушіння продуктів проводиться з метою запобігання або уповільнення фізико-хімічних, біологічних та інших процесів; підвищення термінів зберігання; одержання якісно нових продуктів [86].

Загалом, відомі такі методи сушіння:

- Вакуумне сушіння;
- Сублімаційне сушіння (ліофілізація);
- Розпилювальне сушіння.

Розглянемо детальніше кожен з методів.

Вакуумна сушка являє собою метод зневоднення розчину при тиску нижче атмосферного, але вище потрійної точки води. Джерелом тепла при цьому можуть служити інфрачервоні лампи нагріву, що гріють поверхні або СВЧ-генератори. Знижений тиск сприяє збільшенню інтенсивності випаровування вологи з продукту. Цей спосіб має і свої недоліки, такі як: досить великі енерговитрати і високу вартість обладнання [87,88].

Сублімація або ліофілізація – це висушування біоматеріалів із замороженого стану. Цей спосіб широко поширений, при якому вода випаровується в умовах вакууму без відтавання льоду, що дозволяє повністю зберігати первинну структуру об'єкта сушіння.

Перевагами ліофілізації є збереження дисперсної фази препарату, висушений продукт можна зберігати досить тривалий термін та відсутність впливу високих температур [73].

Недоліки: необхідність ретельної підготовки препарату до сушки, створення високого вакууму для повноти висихання, тривалість сушіння, досить високі енерговитрати [89].

Розпилювальне сушіння - спосіб отримання сухого порошку часто використовується у виробництві харчових продуктів і фармацевтичних

препаратів. У цьому процесі розчин, що містить сполуки, що представляють інтерес, спочатку розпилюють у краплі розміром від 10 до 500 мкм. Краплі швидко висихають за допомогою гарячого повітря. Використовуючи розпилювальну сушку, процес можна виконувати швидко і при температурах нижче температури кипіння води, ця методика можлива для сушіння термочутливих субстанцій. Отриманий порошок зручний у транспортуванні та зберіганні за рахунок зменшення ваги та об'єму [72,90].

Спосіб сушіння розпиленням має низку переваг у порівнянні з іншими методами сушіння. Процес сушки протікає надзвичайно швидко (15-30 с), частки в зоні підвищеної температури мають насичену поверхню, температура якої близька до температури адіабатного випаровування чистої рідини. Завдяки миттєвої сушці і невисокій температурі розпорошених частинок матеріалу висушений продукт виходить хорошої якості [91].

Однак розпилювальне сушіння сумішей, багатих цукром, є складним завданням. Процес часто страждає від низького виходу продукту внаслідок високого відкладення цукрів на стінках розпилювальної сушарки. Залишки розчинених речовин на стінках сушильної камери перегріваються через тривалого впливу високих температур і кінцевий продукт має погану якість. Іншою проблемою є спільне зчеплення висушених частинок. Отримані кластери важкі і не транспортуються належним чином до циклону. Обидва явища є наслідком високої клейкості сумішей з високою концентрацією низькомолекулярних цукрів [90].

Сушильний апарат з киплячим шаром - один із перспективних напрямів в удосконаленні сушильного обладнання. У таких апаратах з активним гідродинамічним режимом досягається значна інтенсифікація процесів тепло- і масообміну. Сутність процесу теплової обробки в зазначених апаратах полягає в тому, що при продуванні розміщеного на газорозподільній решітці шару продукту сушильним агентом (гарячим повітрям) продукт переходить в напівзважений стан і набуває властивості

плинності. У цьому стані шар розпушується і інтенсивно перемішується, завдяки чому всі частинки матеріалу рівномірно омиваються сушильним агентом. Внаслідок цього перемішування, а також взаємного контакту окремих частинок відбувається вирівнювання температури в об'ємі шару, що особливо важливо при сушінні термолабільних продуктів [92].

Можна відзначити, що завдяки зазначеним особливостям процесу, ефективність сушіння, а також якісні показники продуктів, що оброблюються в апаратах з киплячим шаром значно вищі, ніж у традиційно використовуваних барабанних, шнекових, тунельних і стрічкових сушарках [92].

Сушарки з киплячим шаром прості в конструктивному оформленні та експлуатації, легко можуть бути автоматизовані, в них можна поєднувати процеси сушіння і сепарації [92].

Переваги сушарок з киплячим шаром: висока вологонапруженість в апараті дозволяє використовувати сушильний агент з температурою до 200°C без ризику перегріти продукт, що висушується; інтенсивне перемішування в киплячому шарі обумовлює високий теплообмін і масообмін, високу швидкість і якість сушіння; відсутність рухомих частин всередині сушильної камери сприяє підвищенню надійності апарату, значно скорочує частоту і складність планово-попереджувальних ремонтів; простота конструкції знижує металоємність і габаритні розміри всієї сушильної установки; сушарки такого типу мають високу продуктивність та відносно короткий час сушіння продукту [92].

Щоб підвищити продуктивність сушіння, продукти, багаті цукром, доповнюються певними підсушуючими добавками, такими як мальтодекстрин або магнієм оксидом, які широко використовуються завдяки невисокій солодкості та легкій засвоюваності [72].

Збагачена фруктоолігосахаридами суміш після smb-хроматографії може містити незначну кількість сахарози та глюкози, яка далі подається в

апарат, тому потрібно вирішити проблему відкладання залишкових цукрів на сушарці.

4.4.1. Обґрунтування стадії змішування фруктоолігосахаридів з допоміжними речовинами

Клейкість цукрів, таких як фруктоза, глюкоза, та сахароза, які містяться в незначні кількості у розчині що подається в сушарку, відбувається через їхню термопластичну поведінку. Ці матеріали стають липкими при нагріванні до температури, яка дорівнює або перевищує температуру липкості, і змінюється зі склоподібного на рідиноподібний гумовий стан. Температура липкої точки приблизно на 10-20 °C вище, ніж температура склування. Високий вміст низькомолекулярних цукрів у суміші знижує температуру склування (T_g) і в сушарці утворюється липкий шар кінцевого продукту. Тобто, чим більша різниця температур між кінцевим продуктом та T_g , тим вищий ступінь липкості, і тим більші втрати через відкладання продукту на стінках сушарки [90].

Так як при сушінні розчину з фруктоолігосахаридами без добавок не вдається отримати сипучий порошок з високим виходом кінцевого продукту, науковці перед сушінням додавали у розчин різні допоміжні речовини.

Найбільш часто використовуваний метод передбачає використання засобів з високим T_g , такі як мальтодекстрин, магнію оксид, камедь акації, магнію сульфат, силікат магнію та діоксид кремнію [7].

Після досліду, було одержано такі результати:

- камедь акації додана у розчин давала після сушіння дрібний порошок але забарвлений у коричневий колір;
- магнію сульфат, силікат магнію та діоксид кремнію утворювали гігроскопічний і липкий порошок з низьким виходом;
- магнію оксид – сипуча пудра (тальк), високий вихід продукту;
- мальтодекстрин на виході отримували гігроскопічний порошок [7].

Найчастіше зустрічається у статтях застосування саме мальтодекстрину, проте, для виробів з вищим вмістом дисахаридів і моносахаридів потрібна більша кількість мальтодекстрину щоб забезпечити успішну сушку розпиленням; однак більш висока концентрація мальтодекстрину збільшує виробничі витрати та змінює смак і текстуру кінцевого продукту. Таким чином оптимізація процесу сушіння розпиленням є важливим, щоб використовувати мінімальну кількість добавки [90].

Порівнявши всі допоміжні речовини, можна з впевненістю сказати, що найкращою добавкою буде магній оксид. Варто відмітити, що дана речовина застосовується для фармацевтичних та медичних потреб як лужний наповнювач, регулятор рН, зв'язувач надлишкової вологи. У фармакоterapiї - як харчова добавка, противиразковий та стимулювальний перистальтику кишечника [93].

Іншою проблемою яку потрібно вирішити це підібрати відповідне обладнання для даного процесу. Після SMB-хроматографії ми отримуємо розчин багатий на фруктоолігосахариди з незначною кількістю глюкози, сахарози та фруктози. Як було вищеописано дані сполуки ускладнюють процес сушіння. Тому, було вирішено до розчину ФОС додавати магній оксид, який допомагає отримати після сушіння сухий порошок схожий до тальку без зміни смаку, кольору та властивостей кінцевого продукту – фруктоолігосахаридів.

Відомо, що магній оксид помірно розчиняється у воді очищеній при 30°C - 0,086 г/л (розчинність збільшується при додаванні двоокису вуглецю). Після додавання приготованого розчину магній оксиду до розчину фруктоолігосахаридів утворюється субстанція, для якої потрібно підібрати спеціальну сушарку [94].

Висушування розчинів і суспензій є дуже важливим процесом у хімічній, фармацевтичній та харчовій промисловості. Як правило, ефективна система сушіння повинна відповідати кільком умовам: високе значення

коефіцієнтів тепло- і масовіддачі, велика площа контакту, високі витрати теплоносія, рівномірний розподіл температури по сушильній камері, використання концентрованих суспензій, щоб мінімізувати кількість води, яка повинна бути випаровувана та використання високої температури вхідного повітря, наскільки це можливо [95].

Для висушування пастоподібних, сипких і рідких матеріалів використовують пневматичні сушарки з киплячим шаром, в яких забезпечуються висока інтенсивність тепло- і масообміну, безперервність процесу [96].

Сушарка складається з двох камер (рис. 4.2), розділених подвійною сіткою; дном нижньої камери також служить подвійна сітка. Суміш рідкого концентрату лізину з висівками подається в гранулятор і у вигляді тонких ниток витискається у камеру сушарки. Під дією потоку гарячого повітря частинки пасти відриваються від гранулятора і підсушуються. Потік нагрітого повітря проходить через сітки першої і другої камер з швидкістю, що забезпечує підтримання гранул у завислому стані і мінімальне винесення частинок з сушарки з відпрацьованим повітрям. Сушіння в киплячому шарі відбувається спочатку на верхньому, а потім на нижньому ярусі сушарки. Висушений продукт через шлюзовий затвір вивантажуються з апарату і пневмотранспортом подаються до приймального бункера [96].

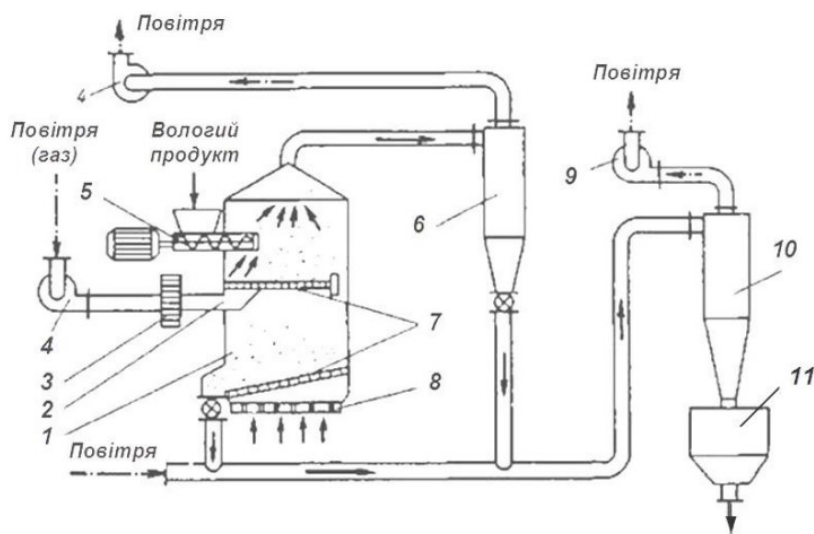


Рис. 4.2. Схема сушарки з «киплячим» шаром: 1 – сушильна камера; 2 – газовід; 3, 8 – калорифери; 4, 9 – вентилятори; 5 – гранулятор; 7 – сітки; 6, 10 – циклони; 11 – приймальний бункер.

Отже, зробивши аналіз відомих способів сушіння фруктоолігосахаридів, обираємо пневматичну сушарку з киплячим шаром, попередньо додаючи добавку магній оксиду задля попередження налипання та склування кінцевого продукту.

4.5. Вибір способу подрібнення та відповідного обладнання

Після сушіння фруктоолігосахаридів та магнію оксиду на пневматичній сушарці з киплячим шаром, ми отримуємо неоднорідний висушений порошок з вологістю 10%. Тому необхідною технологічною операцією є подрібнення задля отримання якісного лікарського засобу [97].

Процес подрібнення — це руйнування матеріалу під дією зовнішніх сил. Для подрібнення слід використовувати закриті обладнання або обладнання, що герметично закривається. Поверхні, що контактують з АФІ, не повинні впливати на якість продукту [74].

Для вибору обладнання для подрібнювання потрібно визначитися спочатку з лікарською формою готового засобу. У даному проекті це порошок, тому обираємо апарти які здійснюють тонкий помел:

- вібраційні млини;
- дезінтегратори, дисмембратори;
- барабанні млини;
- дробарки.

Перевагами вібромлинів є їх застосування для подрібнення як м'яких, так і твердих матеріалів; отримання досить тонкого продукту подрібнення; подрібнення всіма мелючими тілами; високий коефіцієнт заповнення; хороше змішування матеріалу. Недоліками - швидке зношення мелючих тіл, низький строк служби підшипників, корпусу та опор [98, 99].

Барабанні ситові млини відрізняються наявністю циліндричного сита, яке пропускає частки необхідного розміру, що дозволяє використовувати ситові млини без класифікуючих пристроїв. Значним недоліком є часте захаращення сит (при подрібненні вологих матеріалів), а також швидке зношування сит та низька продуктивність [98].

При використанні дезінтеграторів і дисмембраторів швидко зношуються пальці барабанів, а їх заміна є трудомісткою операцією [98].

Дробарки подрібнюють матеріал за допомогою молотків, що обертаються і здійснюють додаткові удари матеріалу об ребристу поверхню стінок корпусу. Недолік: висока ступінь зносу дробильних молотків. При високій завантаженості в апарат матеріалів, вони можуть не піддаватися дробленню. Переваги валкових дробарок – простота конструкції, обслуговування, можливість дроблення вологих матеріалів [100,101].

Отже, порівнявши відомі способи подрібнення визначимо, що після сушки продукт вивантажують в асептичних умовах у валкову дробарку і подрібнюють до розміру часток 0,16-0,25 мм. Наступним етапом йде просіювання.

4.6. Обґрунтування способу просіювання

Подрібнювання матеріалу завжди неоднорідне за розміром часток. Із цієї причини доводиться відокремлювати крупніші або дрібніші частки від основної маси. Цей процес має назву просівання. Після просівання вихідний матеріал розділяється на дві фракції: просів і відсів [102].

У хіміко-фармацевтичній практиці застосовують наступні конструкції сит:

- вібраційні.
- обертові;
- хитні;

Вібраційні сита широко використовуються в промисловості. Грохоти даного типу мають наступні переваги: при високій частоті коливань сита

його отвори майже не забиваються; висока продуктивність і точність просіювання; придатність для крупного та тонкого просіювання різноманітних матеріалів з розмірами від 250 до 0,1 мм; менша витрата енергії, ніж для грохотів інших типів [98].

Недоліком обертових сит є їх невелика продуктивність, вони значно кришать матеріал і утворюють пил та у них швидко забиваються сита. Ці недоліки є дуже істотними, тому барабанні грохоти поступово витісняються вібраційними [98].

Хитні грохоти у порівнянні з барабанными мають більшу продуктивність та ефективність просіювання. Недоліками є їх незначне кришення матеріалу, неврівноваженість конструкції та швидкий вихід з ладу опорних стійок [98].

Порівнявши усі можливі сита для просіювання, найкращим апаратом буде вібраційне сито.

4.7. Обґрунтування вибору форми випуску лікарського засобу

4.7.1 Обґрунтування форми випуску ЛЗ

Після останнього етапу виділення лікарської речовини (процес сушіння у розпилюючій сушарці з інертними частинками), ми отримуємо сипкий порошок фруктоолігосахаридів разом із допоміжною речовиною магнієм оксидом. Як відомо, порошки відносяться до твердих лікарських форм (порошки, таблетки, драже, гранули тощо). Отже, розглянемо детальніше кожен з відомих видів твердих лікарських форм і оберемо ту, що підходить найбільше.

Лікарська форма – це стан лікарського засобу чи лікарської рослинної сировини, зручний для застосування, при якому досягається необхідний лікувальний ефект [103].

Існує основна загальноприйнята класифікація лікарських форм:

Якісна (за фізичними властивостями):

- рідкі (краплі, настоянка, настої, сироп, суспензія, емульсія);

- тверді (капсула, таблетка, порошки, гранули, драже, карамель, олівець);
- м'які (крем, мазь, гель, супозиторії, паста);
- аерозолі [104].

Кількісна:

- дозовані (таблетка, капсула);
- недозовані (сіроп, відвар, емульсія, гель, мазь, екстракт);
- змішані (пластир) [104].

Також лікарські форми можна розділити по групах в залежності від способу застосування препарату: розчини, спреї - для інгаляційного застосування; драже, капсули, таблетки і т.д. - для перорального застосування (шляхом ковтання); драже і таблетки, які легко розчиняються - для сублінгвального застосування (під язик); супозиторії - для вагінального або ректального застосування; парентерально (минуючи шлунково-кишковий тракт) застосовуються лікарські засоби у флаконах і ампулах [104].

Таблетки (Tabulettae) — тверда дозована лікарська форма, яку одержують шляхом пресування лікарських та індиферентних речовин (цукор, крохмаль, тальк, натрію хлорид, вода, розчин желатину). Виготовляють таблетки круглої або овальної форми на фармацевтичних заводах [105].

Таблетки для вживання всередину класифікують так:

- таблетки без оболонки; одношарові, одержані одноразовим пресуванням;
- таблетки, вкриті оболонкою; вкриті одним або кількома шарами суміші різних речовин (смоли, желатин, цукри, воски);
- таблетки шипучі — таблетки без оболонки, основну масу яких становлять кислоти і карбонати або гідрокарбонати, які швидко реагують у присутності води з виділенням вуг-лекислого газу;
- таблетки розчинні (перед застосуванням розчиняють у воді);
- таблетки дисперговані;

- таблетки кишково-розчинні (перед вживанням диспергують у воді до утворення гомогенної суспензії);
- таблетки з модифікованим вивільненням; стійкі в шлунково-му соку і звільняють діючу речовину в кишечнику (містять спеціальні допоміжні речовини для зміни швидкості або місця вивільнення діючої речовини або речовин);
- таблетки для застосування у ротовій порожнині; забезпечують повільне вивільнення і місцеву дію речовини в певних ділянках рота [105].

Залежно від кількості лікарських речовин є прості (містять один лікарський засіб) та складні (містять два або декілька лікарських засобів) таблетки. Виділяють ще один різновид таблеток — складні таблетки, що мають спеціальну офіційну назву (седалгін, теофедрин тощо) [105].

Драже (Dragee) — тверда дозована лікарська форма, яку одержують шляхом багаторазового нашаровування лікарських і допоміжних речовин на цукрові гранули. Вживають всередину: ковтають не розжовуючи. Завдяки цукровій оболонці драже не відчувається не-приємного смаку і запаху лікарських речовин [105].

Мікродраже — тверда дозована лікарська форма, яка утворюється шляхом нанесення лікарської речовини й цукрового сиропу на зернятка цукру [105].

Гранули (Granulae) — тверда лікарська форма, має вигляд однорідних частинок округлої, циліндричної або неправильної форми. Виготовляють на фармацевтичних заводах. Гранули є недозованою лікарською формою. Їх призначають всередину, дозують чайними ложками, дітям — розчиняють у кип'яченій воді [105].

Порошок (Pulvis) — це тверда сипка лікарська форма для внутрішнього або зовнішнього застосування, що складається з однієї або кількох подрібнених речовин. Стерильний порошок застосовують для

парентерального введення після попереднього розчинення в стерильному розчиннику [105].

За ступенем подрібнення порошки поділяють на:

- ▶ великі (*pulvis grossus*) — застосовують всередину після попереднього розчинення
- ▶ дрібні (*pulvis subtilis*) — застосовують усередину і запивають водою
- ▶ найдрібніші (*pulvis subtilissimus*) — використовують для зовнішнього застосування [105].

За характером дозування:

- Розділені на окремі дози (*Pulveres divisi*), дозування проводиться в аптеці;
- Нерозділені (*Pulveres indivisi*), відпускаються хворому в загальній масі, і він самостійно здійснює дозування.

Розділені порошки можуть бути виписані розподільчим способом: лікарські речовини виписуються на 1 дозу, вказується кількість доз; при розрахунку загальної маси лікарських речовин кількість їх, виписане на дозу, множиться на число доз [106].

Дозовані порошки частіше призначені для внутрішнього застосування, недозовані - в основному для зовнішнього використання.

Маса дозованих порошків становить від 0,1 до 1 г, а якщо вміст лікарської речовини менше ніж 0,1 г, то додають цукор (*Saccharum*), молочний цукор (*Saccharum lactis*) або глюкозу (*Glucosum*), а для хворого на цукровий діабет — крохмаль (*Amylum*). Відпускають дозовані порошки в папері, а ті, що містять гігроскопічні речовини, — у вощеному (*Charta cerata*) або парафіновому папері (*Charta paraffinata*) [107].

Недозовані порошки випускають масою від 5 до 100 г і більше. Відпускають у паперовому пакеті або в баночці. Є певні правила щодо виписування порошків у рецептах [107].

Переваги і недоліки порошків:

Порошок, як лікарська форма поширені в медичній практиці, оскільки володіють рядом переваг в порівнянні з іншими лікарськими формами. До них відносяться:

- Універсальність складу, так як вони можуть містити речовини органічної та неорганічної природи, тваринного і рослинного походження, невеликі кількості рідких і інших речовин;

- Відносна простота технологічного процесу;

- Досить висока фармакологічна активність завдяки високій дисперсності лікарських речовин;

- Можливість забезпечення як місцевого, так і загального впливу на організм;

- Точність дозування;

- Портативність;

- Велика стійкість при зберіганні, ніж у рідких лікарських форм;

- Можливість внутрішньоаптечної заготівлі та використання напівфабрикатів у технологічному процесі [106].

Але, разом з перевагами, порошки володіють і негативними властивостями:

- Більш повільне в порівнянні з розчинами вивільнення фармакологічного ефекту;

- Зміна властивостей деяких речовин під впливом навколишнього середовища (втрата кристалізаційної води, поглинання водяної пари, діоксиду вуглецю, окислення та інші хімічні процеси при зволоженні порошоків);

- Подразнюючу дію на слизові оболонки;

- Незручність застосування порошоків з речовинами гіркового смаку, пахучими і фарбувальними інгредієнтами [106].

Щодо вимог до порошоків, то вони повинні бути однорідними при розгляді неозброєним оком. Розмір частинок повинен бути не більше 0,160

мм. Порошок повинен добре дозуватися, бути сипучими, стійкими в процесі виготовлення та зберігання [106].

Загалом, лікарська форма «порошок» має різне призначення у фармації, це порошки призначені для зовнішнього застосування (у вигляді порошоків або у вигляді розчинів та ін.), для перорального застосування (у вигляді порошоків або у вигляді розчинів, суспензій, крапель тощо), для парентерального застосування (у вигляді розчинів, суспензій, емульсій та ін.), а також для ректального, вагінального застосування (у вигляді розчинів, суспензій та ін.) [108].

Порошки для парентерального застосування — це стерильні лікарські засоби, призначені для введення шляхом інфузій, ін'єкцій (після приготування відповідних розчинів) [108].

Застосування порошоків для парентерального застосування передбачає попереднє приготування:

- розчину для ін'єкцій (внутрішньом'язових, підшкірних, внутрішньовенних та ін.);
- суспензії для ін'єкцій (внутрішньом'язових, підшкірних, внутрішньовенних та ін.);
- розчину для інфузій.

Порошки для зовнішнього застосування на відкритих ранах також мають бути стерильними [108].

Застосування порошоків для перорального застосування передбачає попереднє приготування (сиропу, розчину, суспензії, крапель) [108].

Застосування порошоків для ректального та вагінального застосування передбачає попереднє приготування розчинів або суспензій [108].

Порошки призначені для назального, вушного застосування (шляхом вдихання), а також для інгаляцій. Такі порошки можуть міститися у балонах під тиском (інгалятори сухого порошку) [108].

Так, як основна діюча речовина (фруктоолігосахариди) застосовується в якості харчової добавки, то потрібно обрати найбільш зручну лікарську форму для споживання пацієнтами.

Основними недоліками таблеток та драже є те, що для окремих груп пацієнтів є незручний прийом у вигляді ковтання, з моменту попадання таблетки в рот і рухаючись стравоходом, на неї впливає цілий ряд руйнівних факторів. Тому частина поживних елементів може просто не дійти до місця призначення, найчастіше таблетки мають неприємний смак або післясмак та повільно діють. Також, під час процесу таблетування на діючу речовину здійснюється негативний температурний вплив.

Порівнявши усі відомі тверді лікарські форми, оберемо форму дозованого порошку, так як це найлегший спосіб приймання фруктоолігосахаридів одночасно з їжею.

4.7.2. Обґрунтування вибору первинної і вторинної упаковки ЛЗ

Переважає більшість виробів, що існує на сьогоднішній день у світі потребує упаковки. Відомо, що упаковка є засобом або комплексом засобів, що захищають продукцію при транспортуванні, впливу зовнішніх факторів на продукцію чи засіб, що допомагає підтримувати декоративну форму продукції. Основними функціями упаковки є естетична, захисна, маркетингова, нормативно-законодавча, логістична, екологічна, інформаційна, експлуатаційна тощо [109].

Упаковка є поширеним елементом сучасного споживання, який забезпечує широкий спектр функціональних можливостей і переваг для споживача. Роль упаковки, мабуть, є найбільш важливою на ринках споживчих упакованих товарів (CPG), які часто сильно покладаються на елементи упаковки для підтримки якості продукції, запобігання втратам продукції, полегшення транспортування та зберігання та забезпечення диференціації ринку. У сучасній практиці упаковка розроблена таким чином,

щоб термін служби перевищував її вміст, і після використання часто стає зайвою [109].

У нашій країні набули подальшого розвитку різні види упаковки. Для збереження якості готових лікарських засобів застосовується первинна та вторинна упаковка. Головний вплив на готовий лікарський засіб (ГЛЗ) має первинна упаковка, так як вона безпосередньо контактує з лікарським засобом [110, 111].

В залежності від виду лікарської форми використовують різні види пакувальної тари та дизайн її маркування. Основними функціями маркування первинної упаковки є інформаційна, ідентифікаційна, мотиваційна та емоційна. Маркування ГЛЗ повинно відповідати вимогам міжнародних та вітчизняних стандартів, бути чітким, наочним, однозначним і достовірним [112].

Тверді лікарські форми складають приблизно 70% від загального випуску готових лікарських засобів. Таблетки пакують в саму різноманітну тару, в тому числі в паперову (конвалют), скляну (банки і флакони), металеву (пробірки, пенали) та ін. Найбільш перспективною вважається контурно-чарункове пакування (блістери) [112].

Окремо необхідно згадати саше. Пакування дозованих порошків оснащуються різними по конструкції пристосуваннями для дозованої подачі. В основному вони випускаються іноземними фірмами і являють собою двокамерну систему, що складається із зовнішньої закритої камери, сполученої з порожниною ємності, в якій розміщений порошок чи гранули, і внутрішньої дозованої камери. Камери відокремлені одна від одної перегородками, які відсікають дозу від загального обсягу. Дана лікарська форма – саше, дозується у пакети різного розміру і форми з фольгоплену [112].

Капсули (Capsulae) — це оболонки для дозованих порошкоподібних, гранульованих або рідких лікарських речовин для застосування всередину. У

капсулах випускають лікарські препарати, що мають неприємний смак, запах або справляють подразливу дію. Капсули призначають всередину; їх ковтають не розжовуючи [105].

Спансули (Spansulae) — це капсули для застосування всередину, які містять суміш кількох видів мікродраже лікарських речовин з різною тривалістю дії [105].

Блістери - це контурно-чарункове пакування, яке виконане з полімерної плівки та фольги алюмінієвої, і має форму близьку до форми таблетки. 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 ГЛЗ [112].

Пакети з порошком і стікові пакети є нішевою лікарською формою у фармацевтичній промисловості. Вони розроблені, щоб охопити кілька сценаріїв, коли альтернатива твердій лікарській формі, такої як капсула або таблетка, є кращою, і коли попередньо виготовлений рідкий препарат є неможливим, наприклад, через проблеми довгострокової стабільності. Ключем до успішного проектування та виробництва цих порошкових продуктів є розуміння взаємодії між рецептурою, обладнанням для наповнення та упаковкою. Отже, перед початком розробки продукту життєво важливо визначити кінцеву схему виробництва та презентацію упаковки [113].

Відносно новою та інноваційною твердою лікарською формою є саше. Вони добре сприймаються пацієнтами через поєднання переваг таблеток (точне дозування) і можливість більш легкого прийому (немає необхідності ковтати таблетку) [114, 115].

Саше (фр. Sachet - мішечок) - це плоский 3- або 4-шовний пакет. Завдяки великому діапазону розмірів пакетів, в саше упаковують як порційну упаковку, так і продукцію з дозою до 200 г [116].

Пакування саше це, найчастіше, запаяний по всіх краях і сторін пластиковий пакет [117].

Виробництво дієтичних добавок у формі саше має свої особливості та вимагає суворого дотримання технології. Сухий порошок попередньо подрібнюється, далі зважується та фасується у пакетики із запайкою з чотирьох сторін. Розмір пакетика може бути змінено відповідно до технічних можливостей оснащення. Весь процес є автоматизованим і керується оператором через електронний пульт. Для запобігання хімічної реакції при контакті продукту з частинами обладнання деталі машин виготовляють з високоякісної нержавіючої сталі [118].

Варто пам'ятати, що найважливішою вимогою щодо пакування та вибору пакувальних матеріалів є належний захист від дії зовнішніх факторів (вологи, кисню повітря, мікробного забруднення), властивостей складових ЛП [119].

Для пакування таблеток використовують папір, метал, картон, скло; широкого розповсюдження набули целофан, поліетилен, поліпропілен, полістирол, полівінілхлорид та різні їх поєднання. Перспективними вважаються плівкові контурні упаковки, отримані на основі комбінування матеріалів методом термозварювання: коміркова (блістерна) і безкоміркова (стрічкова). Для їх виготовлення використовують алюмінієву фольгу, стрічки целофанові ламіновані, полімерні плівки, ламіновані нейлоном або поліестером шляхом термозварювання на автоматичних лініях. Для одержання коміркових упаковок найчастіше застосовується термоформувальна плівка, слабкопластифікований або непластифікований полівінілхлорид різної товщини (0,2–0,35 мм), які використовують для таблеток, що містять гігроскопічні складові. Поліпропілен використовують

рідше, бо він важко піддається формуванню; полістирол добре формується, але пропускає вологу. Для формування таблеток в упаковку блістерну використовують автоматичні дозатори вітчизняного та зарубіжного виробництва [119].

Найважливіша функція багатошарових пакетиків-саше полягає в тому, щоб захистити препарат всередині пакета від потрапляння вологи та кисню. Серед матеріалів, що використовуються для виготовлення саше, алюмінієва фольга різної товщини, яка забезпечує захист від вологи та кисню порівняно зі склом. Волого-бар'єрні властивості полімерів також відіграють важливу роль. Серед полімерів, що додатково захищають від вологи, найбільш застосовуваними є поліпропілен (PP) і поліетилентерефталат. Сюди ж відносяться циклоолефінові сополімери, металоцени, нанокompозити тощо [120, 121].

Компанія UNIVERSAL PACK працює над підвищенням екологічності упаковки, пропонуючи пакувальне обладнання, сконструйоване спеціально для багатошарового матеріалу, що переробляється, і продукту замовника. Власна лабораторія Universal оснащена сучасним технічним обладнанням для вивчення багатошарових матеріалів та продуктів. Вони створили ЕСО-базу даних, що містить всю інформацію про матеріали, придатних для повторного використання, а також перероблених та біорозкладних багатошарових матеріалів, які випробували на їх устаткуванні.

Екологічні багатошарові матеріали, з якими працює обладнання виробництва UNIVERSAL PACK:

- Поліпропілен;
- Полілактидна кислота (біопластик PLA);
- Папір;
- Поліетилен, отриманий із біологічної сировини;
- І багато інших [122].

Характеристики матеріалів

- Повністю підлягають вторинній переробці або біорозкладаються;
- Мають високі фізичні та хімічні бар'єрні якості;
- Приємний зовнішній вигляд;
- Не містять розчинників;
- Можливість друку;
- Легкі;
- Тонкі [122].

Universal Pack пропонує передові рішення для будь-якого типу упаковки: стіки, 4-шовні саше, фігурні упаковки та фасування у картонні пачки. На сьогодні головні завдання у сфері інновацій фокусуються на виробництві упаковки з використанням перероблених та/або перероблюваних матеріалів (рис 4.3) [122].

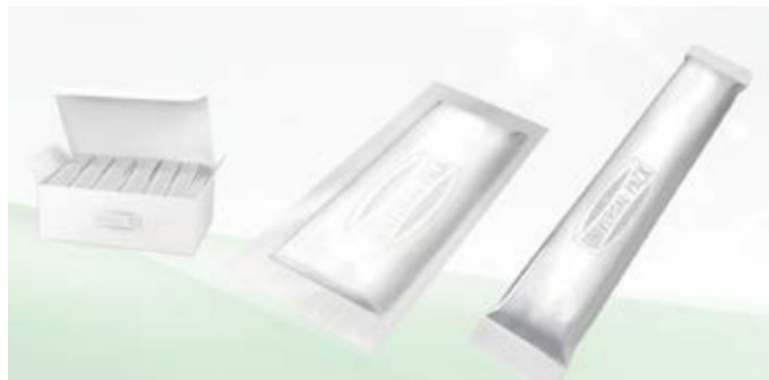


Рис. 4.3. Пакування саше від виробника UNIVERSAL PACK

Варто пам'ятати, що на первинну упаковку лікарського засобу в обов'язковому порядку наноситься та затверджується у методах контролю якості:

1. Назва лікарського засобу;
2. Маса, об'єм, концентрація або кількість одиниць дії лікарського засобу;
3. Номер серії лікарського засобу;
4. Дата закінчення терміну придатності;
5. Найменування виробника та, за необхідності, адреса заявника [123].

Отже, як первинну упаковку для порошку фруктоолігосахаридів обираємо багат шарові пакетики-саше виготовлені з поліпрополену та поліетилентерефталат, так як вони забезпечують захист від вологи, проходження кисню всередину упаковки та світла на рівні зі склом, але при цьому мають меншу вартість.

Крім первинної упаковки лікарський засіб має пакуватися ще і у вторинну. Вторинна упаковка - упаковка, в яку вкладається лікарський засіб у первинній упаковці і яка виконує захисну функцію щодо лікарського засобу та первинної упаковки [124].

Вторинна упаковка лікарських засобів – це зовнішня тара. Вона поділяється на кілька категорій. Серед них:

- Коробки з картону. Вони використовуються для продажу таблеток, ампул, спреїв, флаконів. Така тара екологічна і економічна, її легко утилізувати.
- Полімерна упаковка. Вона зручна у використанні. В основному застосовується для упаковки шприців. Випускається різної форми і щільності.
- Вкладиші. Являють собою спеціальні картонні контейнери з осередками. Вони призначені для фіксації первинної упаковки (наприклад, ампул).
- Роздільники. Використовуються для специфічних препаратів, які готують безпосередньо перед застосуванням.
- Елементи, які поглинають вологу. Медичні препарати у вигляді порошків уразливі до вологи. Для їх зберігання потрібні особливі умови. У більшості випадків для відводу вологи використовуються вкладиші з силікагелем.

При створенні вторинної упаковки важлива роль приділена її дизайну. На фармацевтичному ринку запропоновані схожі товари, і виробникові потрібно виділити свій препарат серед аналогів [124].

Вид та розмір вторинної упаковки для реєстрації в Україні обирає заявник. На реєстрацію в Україні можуть подаватися або всі види та розміри вторинної упаковки, що затверджені в референтній країні.

Фахівці британської компанії DS Smith розробили упаковку спеціально для роздрібних мереж і для викладки товару на полицях. Вона навіть отримала спеціальну аббревіатуру: для роздрібних мереж - RRP (Retail Ready Packaging), для викладки на полиць SRP (Shelf Ready Packaging) [125].

SRP - тип упаковки (англ. Shelf Ready Packaging), яка володіє спеціальним конструктивом або частиною елементів, які забезпечують викладку товару в ритейлі в транспортній упаковці та зберігають яскравий, привабливий для споживача вид. Даний тип упаковки вже давно прижився в Європі та США. Саме вона допомагає захистити товар при перевезенні і, одночасно з цим, швидко розставити його в торговій площі без візуальних втрат [126].

SRP-упаковка допомагає скоротити операційні витрати ритейлерів; привертає увагу споживачів; полегшує орієнтацію споживачів в торговому залі; структурує викладку товарів на полицях; економить полицний простір [125].

На жаль в Україні цей інструмент мерчандайзингу використовується вкрай рідко та недооцінений. Якщо в наших мережах і зустрічається SRP, то без яскравих елементів, що відразу знижує ефективність її використання [125].

Дослідження показників структури ринку за типом використовуваних матеріалів для упаковки, а саме гнучких і жорстких пластмас, скла тощо, засвідчили переважання випуску упаковки з паперу і картону. Зокрема, в Україні на цей вид упаковки припадає 47% від загального обсягу, у середньому за рік виробляється близько 900 млн. м² коробок із гофрокартону, 80 тис. пакетів і мішків із паперу, виготовленого в Україні. Використання

вітчизняних паперу, картону для випуску упаковки забезпечує конкурентну перевагу за ціною використання [127-129].

Отже, як вторинну упаковку для пакування саше найкраще використовувати картонні пачки.

Для якісного кінцевого продукту необхідно підібрати необхідне обладнання для пакування. Найкращим виробником обладнання є компанія UNIVERSAL PACK. Їх лінія Theta для виробництва 4-шовних саше задовольнила всі специфічні вимоги. Дана вертикальна модель дозволяє досягти продуктивності пакувальних ліній горизонтального типу, але при цьому суттєво відрізняється меншими розмірами та вищою гнучкістю [130].

Висока якість саше стала можливою завдяки їхній новій горизонтальній концепції запаювання та спеціальній системі охолодження деталі, що дозволяє уникнути теплового навантаження на плівку і продукту під час дозування [130].

Обладнання дає повну гнучкість щодо розмірів саше та картонної пачки. Ще одна причина, яку не можна недооцінювати, - це можливість щільно групувати саше перед їх завантаженням у картонажну машину: цей процес дозволяє досягти більшої стабільності та упаковувати більшу кількість саше при тому ж розмірі пачки (рис. 4.5) [130].

Щоб гарантувати високу точність за будь-якої продуктивності, пакувальна лінія була обладнана багаторядними контрольними вагами, тензодатчиками. з точністю до тисячної зі зворотним зв'язком з окремими струмками дозатора. Також є станція для ручного відновлення відбракованих саше [130].



Рис. 4.5. Зображення вторинного пакування саше за допомогою обладнання Theta.

Згідно з роз'ясненням щодо маркування лікарських засобів, у обов'язковому порядку на вторинну упаковку лікарського засобу в обов'язковому порядку наноситься та затверджується у методах контролю якості:

1. Назва лікарського засобу;
2. Інформація щодо штрих-коду лікарського засобу;
3. Діючі речовини (у якісному та кількісному вираженні із зазначенням їхнього вмісту в одиниці дози або, залежно від способу застосування, в одиниці об'єму чи маси з використанням їх міжнародних непатентованих або загальноприйнятих назв);
4. Лікарська форма із зазначенням маси, об'єму або кількості одиниць дозування, що містяться в упаковці;
5. Перелік допоміжних речовин згідно з додатком 16;
6. Спосіб, а за необхідності - шлях введення лікарського засобу;
7. Особливі застереження щодо того, чи слід зберігати лікарський засіб у недоступному для дітей місці і, за необхідності, поза полем зору дітей;
8. Дата закінчення терміну придатності (місяць/рік);
9. За необхідності особливі вказівки відносно того, що робити з невикористаним лікарським;

10. Найменування та місцезнаходження виробника та адресу його місця провадження діяльності;
11. Номер реєстраційного посвідчення;
12. Номер серії лікарського засобу, присвоєний виробником;
13. Інформацію щодо застосування лікарського засобу у разі якщо лікарський засіб призначено для самостійного лікування;
14. За необхідності особливі застереження стосовно лікарського засобу;
15. Умови зберігання, а за необхідності - особливі умови зберігання.
16. Інформація щодо маркування шрифтом Брайля [123].

Отже, узагальнюючи все вищеписане, кінцевим продуктом нашого виробництва є фруктоолігосахариди у лікарській формі «порошок», який упакований у первинну упаковку саше по 5 грам. Вторинною упаковкою слугувати буде картонна коробка.

4.8. Обґрунтування санітарної підготовки виробництва та допоміжних робіт

4.8.1 Обґрунтування вибору класів чистоти виробничих приміщень

Лікарські засоби слід виробляти відповідно до правил належної виробничої практики (GMP). Основна вимога при виробництві є наявність ізольованих приміщень та відповідних технічних засобів.

Варто пам'ятати, що навколишнє середовище приміщень має становити мінімальний ризик контамінації продукції, тому вибір правильного класу для одержання препарату є визначальним фактором [74].

Визначити потрібний клас чистоти потрібно виходячи з технологічних циклів виробництва, які будуть проводитися в них. На нашому виробництві для одержання готового лікарського засобу наявні такі етапи як: допоміжні роботи, виділення готового продукту та стадії пакування, маркування та відвантаження.

Так як ЛЗ який виробляється є нестерильним, то виробництво таких лікарських засобів рекомендується здійснювати у приміщеннях класів чистоти С і D (табл 4.1).

Таблиця 4.1.

Класифікація приміщень виробництва нестерильних лікарських засобів за максимально допустимою кількістю часток та мікроорганізмів у повітрі

Клас чистоти	Максимально припустима кількість часток в 1 м*		Максимально припустима кількість життєздатних мікроорганізмів, КУО/м ³
	від 0.5 до 5 мкм	більше 5 мкм	
C	350 000	2 000	100
D	3 500 000	20 000	200

- нормативи із вмісту часток у повітрі повинні дотримуватись в усьому приміщенні, коли воно знаходиться в оснащеному стані;
- максимально допустима кількість життєздатних мікроорганізмів повинна відповідати нормативним вимогам у повітрі робочій зони, коли приміщення знаходиться у функціонуючому стані.

Технологічні операції, які є найбільше критичними з точки зору можливого забруднення мікроорганізмами, рекомендується проводити в зонах, відповідних класу чистоти С [131].

Мають бути передбачені приміщення (зони) відповідного класу чистоти для сушіння і термічної обробки одягу, та підготовки персоналу. Приміщення етикетування та оформлення готової продукції, зберігання готових лікарських засобів, допоміжних речовин і субстанцій, прання одягу для працюючих в виробничих приміщеннях допускається не контролювати на вміст часток та мікроорганізмів у повітрі [131].

У приміщеннях D класу чистоти максимально допустима кількість життєздатних мікроорганізмів у повітрі може складати 500 КУО/м³ – якщо в

процесі валідації буде доведено, що при цьому не відбувається погіршення якості лікарського засобу за показником “мікробіологічна чистота” [131].

Основними джерелами забруднення є: стіни, підлога, стеля, пил з кондиціонерів, людський фактор (мікро-частки шкіри та волосся, частки одягу, кашель і чхання), інструменти і предмети, від продукту, що виробляється [132].

Відомо, що при виробництві твердих форм використовуються чисті зони класу D. Для рідких препаратів потрібний більш високий ступінь чистоти, оскільки вода є сприятливим середовищем для розмноження мікроорганізмів. Виходячи з вищенаведеної інформації, обираємо клас чистоти приміщення D, так як наше виробництво націлене на виготовлення твердої лікарської форми [132].

Нормативи максимального рівня вмісту часток та мікроорганізмів у повітрі повинні витримуватися в усьому виробничому приміщенні, коли воно знаходиться в оснащеному стані, а максимально допустима кількість життєздатних мікроорганізмів — відповідати нормативним вимогам у повітрі робочої зони, коли приміщення знаходиться у функціонуючому стані [132].

4.8.2. Обґрунтування підготовки вентиляційного повітря

Системи підготовки вентиляційного повітря слід проектувати, виходячи зі спеціальних вимог до технологічних операцій, вимог до приміщень виробництва лікарських засобів, що описані у належній виробничій практиці СТ-Н МОЗУ 42-4.0:2016 та згідно *Методичних рекомендацій щодо класифікації виробничих приміщень нестерильних лікарських засобів з допустимим вмістом мікроорганізмів та часток у повітрі*, і затверджених наказом МОЗ України 14.12.2001р., № 502, керуючись галузевими документами, зокрема ГІ7 07.004.98, ГНД 07.006.98, МВГ 07.003.98, а також ГНД 01.001.98.

Для підтримання необхідних параметрів повітряного середовища як в жилих, так і у виробничих приміщеннях існують різні системи вентиляції.

Виробничі приміщення фармацевтичних та медичних підприємств обладнують системами турбулентної і ламінарної вентиляції [133]. У системі подачі вентиляційного повітря у виробничі приміщення С і D класів чистоти застосовується неоднапрямлений повітряний потік.

У настанові зазначається, що очищення припливного повітря, яке подається в приміщення класу чистоти D має бути двоступінчастим. На кожному рівні очищення слід використовувати фільтри, що по ефективності фільтрації відповідають вимогам європейських стандартів EN 779 та EN 1822. [131, 134].

На першому ступені очистки повітря використовують осередкові фільтри попереднього очищення, які очищають (звільняють) повітря від механічних частинок. Їх встановлюють на вході в кондиціонер або в припливну камеру. У даному проєкті запропонуємо використання фільтра повітряного карманного (ФПК), який забезпечує клас очищення G3 [135].

Фільтри, що використовуються під час другого ступеня очистки встановлюються безпосередньо перед повітророзподільчим пристроєм та призначені для тонкої фільтрації повітря від бактерій і твердих домішок. В ролі фільтра тонкого очищення буде виступати карманний фільтр ФВК F7 [133,136].

На кожному рівні очищення слід передбачити штуцери з метою відбору проб повітря для визначення концентрації механічних часток до та після фільтрації.

Комфортну температуру в виробничих приміщеннях слід підтримувати на рівні (21 ± 2) °C взимку і (23 ± 2) °C влітку, відносну вологість повітря - у межах від 30 до 50 % з урахуванням технологічних вимог. У виробничих приміщеннях, в яких не проводиться контроль на вміст часток та мікроорганізмів у повітряному середовищі, відносна вологість повітря має складати від 40 до 60 % [131].

Отже, для першого ступеня очистки повітря використовують фільтр, який забезпечує клас очищення G3, а для другого- F7.

4.8.3 Обґрунтування водопідготовки

Вода це речовина, яка широко використовується під час виробництва з різною метою: як допоміжна речовина в складі лікарських засобів, як розчинник для підготовки препаратів до застосування, як розчинник при синтезі активних фармацевтичних інгредієнтів (АФІ) і виробництві лікарських засобів, як очищувальний засіб для промивки й очищення обладнання, первинних пакувальних матеріалів тощо. Вимоги до якості води залежать від її призначення і встановлені у фармакопейних монографіях [137].

Виробництво та контроль якості води, що використовують при виробництві лікарських засобів, входять до сфери дії належної виробничої практики (GMP). Слід також зазначити, що сфера застосування води залежить не тільки від її якості, але й від способу виготовлення [138, 139].

Для одержання готового пребіотичного препарату на виробництві доцільним є використання води водопровідної (питної) для приготування миючих та деззсаобів), води очищеної (для ополіскування обладнання після миття та утворення розчину з магній оксиду).

Згідно GMP установки для підготовки води і системи її розподілу слід проектувати, конструювати й експлуатувати так, щоб забезпечити надійне постачання води відповідної якості [137].

Вода очищена-це вода, при виробництві до якої не висувають вимоги щодо стерильності чи апірогенності. Воду очищену одержують із води питної дистиляцією, іонним обміном, зворотним осмосом або будь-яким іншим підходящим способом. Для води очищеної при зберіганні та у мережі дистрибуції мають бути створені умови, що запобігають росту мікроорганізмів і дозволяють уникнути будь-якого іншого забруднення [137].

Схема підготовки води очищеної виробника Eurowater включає в себе фільтрацію (видалення заліза та марганцю з ґрунтових вод на автоматичних напірних фільтрах), фільтрування з активованим вугіллям (видалення кольоровості, смаку і запаху води), пом'якшення (зниження жорсткості води і запобігання відкладень кальцію), зворотній осмос (двоступенева система дозволяє обробляти пермеат з першого блоку), мембранну дегазацію (установка MDU видаляє CO₂ з пермеату зворотного осмосу) та блок EDI, що використовується після системи зворотного осмосу для доочищення демінералізованої води, щоб отримати низький рівень електропровідності [140].

4.8.4 Підготовка персоналу

На підприємстві кожен співробітник повинен чітко розуміти індивідуальну відповідальність, яка має бути документована. Виробник повинен забезпечити навчання всього персоналу, обов'язки якого передбачають перебування у виробничих зонах та зонах зберігання або в контрольних лабораторіях (включаючи технічний і обслуговуючий персонал, а також співробітників, які здійснюють прибирання), та іншого персоналу, діяльність якого може вплинути на якість продукції. Весь персонал повинен знати принципи належної виробничої практики, що стосуються його діяльності, а також пройти первинне і подальше навчання відповідно до його обов'язків, включаючи інструктаж з виконання гігієнічних вимог [74,141].

Основне навчання проводиться один раз на рік. Принцип полягає в ознайомленні персоналу з теорією і практикою GMP. Вхідне навчання проводиться по мірі необхідності, коли на певну посаду приходять новий робітник. Це навчання здійснюється відповідно до обов'язків кожного з персоналу. Подальше навчання здійснюється систематично з подальшим оцінюванням практичної ефективності проведених навчань [74].

При влаштуванні на роботу кожен співробітник повинен пройти медичний огляд. Після першого медичного огляду подальші проводяться

періодично, а також у тих випадках, коли це необхідно для роботи або здоров'я персоналу. Співробітники, зайняті у виробництві стерильних препаратів доповідають про обставини, що можуть бути причиною поширення аномальної кількості або типів забруднення [74].

Обслуговуючий персонал при роботі з чистим продуктом одягнений в чистий технологічний одяг, а також при роботі з чистим продуктом обмежується переміщення персоналу [74].

Необхідно, щоб одяг і його якість відповідали процесу і класу робочої зони. Так для класу чистоти D висуваються такі вимоги: Волосся повинно бути покритим. Варто носити захисний костюм загального призначення, відповідне взуття або бахіли. Одяг і взуття не повинне виділяти ворс або частки.

Персоналу забороняється розмовляти над продуктом. Дезінфікуючу обробку рук проводять антисептичним препаратом “Стерилліум” або спиртом етиловим 76 % (чи іншим призначеним для цього засобом) чергують через 1-3 місяці, з метою запобігання появи та розповсюдження стійкої мікрофлори.

Після обробки антисептичними розчинами або засобами в змивах з рук не повинно бути життєздатних мікроорганізмів.

Під підготовкою технологічного одягу розуміють перегляд перед пранням, прання, сушку, термічну обробку (стерилізацію) одягу; миття, сушку і стерилізацію рукавичок; вологу очистку і дезобробку взуття.

Гранично допустима кількість мікроорганізмів (бактерій та грибів сумарно) в змивах стерильними тампонами з технологічного одягу та рукавичок залежить від необхідності мікробіологічної чистоти готового лікарського засобу [74].

4.8.5. Обґрунтування миючих та дезінфікуючих засобів

Згідно GMP санітарна обробка чистих зон має особливо важливе значення. Зони необхідно старанно очищати згідно з письмовою програмою.

У разі проведення дезінфекції слід застосовувати декілька типів дезінфікуючих засобів. Для виявлення розвитку стійких штамів потрібно здійснювати регулярний контроль. Миючі і дезінфікуючі засоби необхідно контролювати щодо мікробіологічної чистоти. Їх розчини слід тримати в попередньо очищених контейнерах (тарі) й зберігати лише протягом установлених термінів (за винятком тих розчинів, що стерилізують)[74].

Під час виробництва, обладнання та приміщення щодня забруднюються органічними речовинами. Органічні речовини - ідеальне середовище для розвитку хвороботворних бактерій [142]. Очищення, мийка і дезінфекція обладнання та приміщень - це складна багатоступенева процедура. Щоб забезпечити ідеальні санітарні умови, важливо підібрати ефективні методи і засоби дезінфекції, враховуючи характер і ступінь забруднення, тип обладнання, умови виробничого процесу, також врахувати всі переваги та недоліки запропонованих на ринку мийних та дезінфікуючих засобів [142].

Варто пам'ятати, що забороняється використовувати в якості мийних засобів органічні розчинники. Ця заборона дія також для приготування робочих розчинів мийних, дезінфекційних і мийно-дезінфекційних засобів. Також для миючих засобів є обмеження щодо вмісту фосфатів та інших сполук фосфору [143].

В якості миючих засобів для очищення обладнання, устаткування, поверхонь, комунікацій, стін, дверей та підлоги фармацевтичного виробництва слід обрати «Мікробак-форте» періодично замінюючи його на «Біомой». Використання робочих розчинів Біомою з огляду на відсутність в його складі летючих компонентів, не представляє загрози надходження компонентів в повітря робочої зони. Засіб слід використовувати при ручному чи механізованому способі очищення [144].

Характеристика «Мікробак-форте»: без альдегіду, оптимальний запах, не утворює піни, ефективний проти вірусів гепатиту В та СНІДу, добре

переноситься різними матеріалами за рахунок наявності спеціального захисного фактора, забезпечує ґрунтове очищення поверхонь [145].

Для дезінфекції обладнання у реєстрі лікарських засобів рекомендують використовувати «ДЕЗОлайт», з мийними властивостями, основними діючими речовинами якого є дидецилдиметиламоній хлорид у межах 7,0 - 8,0%, алкілдиметилбензиламоній хлорид у межах 6,0 - 7,0%. Засіб є економним (1 л концентрату вистачить для приготування до 1250 л робочого розчину). Але візьмемо до уваги, що засіб потрібно змінювати 1 раз на три місяці задля запобігання звикання патогенних мікроорганізмів, тому на заміну оберемо «OXIDAG silver» (основними діючими речовинами якого є пероксид водню не менше 2,0% та срібла нітрат у межах 0,0045- 0,005%) [146].

OXIDAG silver - це концентрований розчин перекису водню, збагачений азотнокислим сріблом, який виконує важливу роль стабілізуючого агенту. Численні ефекти досягаються завдяки тому, що водню пероксид розпадається з виділенням активного кисню, тим самим створюючи несприятливі умови для розвитку мікроорганізмів, у тому числі, резистентних до звичних антисептиків форм, анаеробної та гнилісної флори [147].

Для дезінфекції устаткування рекомендують використовувати такі засоби як SANDEZ та «Дезаква –Аноліт». Засіб SANDEZ: EveryDay в своєму складі містить %: Ізопропіловий спирт – 60,0-72,0; Гліцерин – 0-1,5; Перекис водню – 1,0-3,0; ЧАС – 1,0-1,5. Недоліком даного засобу є наявність у складі ЧАС, що мають недостатню активність щодо деяких мікроорганізмів і при тривалому збриганні викликають їх резистентність. Дезінфікуючий засіб, який обираємо на заміну - «Дезаква–Аноліт», що з діючими речовинами: хлорноватиста кислота, високоактивні кисневі сполуки хлору, вільні радикали хлору та кисню [146].

Щоб проводити дезінфекцію поверхонь, вікон, дверей, підлоги і стін на фармацевтичному виробництві, у реєстрі дезінфікуючих засобів за 2021 рік пропонується обрати такі засоби як «Дезинфектор» ТМ Luxus Professional та Oxivir Plus (сильно концентрований рідкий дезінфікуючий засіб з миючим ефектом широкого спектру застосування, для одночасного очищення і дезінфекції всіх твердих водостійких поверхонь) [146].

Для дезінфекції комунікацій і трубопроводів слід використовувати засіб Хемодез НУК (стабілізована суміш оцтової кислоти і перекису водню. Вміст надоцтової кислоти в концентраті - 9-15%) 1 раз на тиждень [148].

Всі мийні та дезінфікуючі засоби, описані вище, не потребують попередньої підготовки та поступають на виробництво у вигляді готових розчинів.

**РОЗДІЛ 5. ПІДБІР ТЕХНОЛОГІЧНОГО ОБЛАДНАННЯ З
ВРАХУВАННЯМ МАТЕРІАЛЬНИХ ПОТОКІВ ПО СТАДІЯХ
ОТРИМАННЯ СУБСТАНЦІЇ ТА ЛЗ**

1. Обґрунтовано вибір таких післяферментаційних стадій:

ТП 4. Зберігання культуральної рідини

ТП 5. Відділення біомаси

ТП 5.1 Центрифугування культуральної рідини

ТП 6. Очищення розчину ФОС від незброджених цукрів

ТП 6.1 SMB хроматографія

ТП 7. Змішування

ТП 7.1 Змішування з магній оксидом

ТП 8. Сушіння

ТП 8.1 Сушіння з «киплячим» шаром

ТП 9. Подрібнення

ТП 9.1. Подрібнення ФОС на валковій дробарці

ТП 10. Просіювання ФОС

ТП 10.1. Просіювання ФОС на віброситі

ПМВ 11. Пакування, маркування, відвантаження

ПМВ 11.1 Наповнення пакетиків саше

ПМВ 11.2 Упаковка саше у коробки та їх маркування

ПМВ 11.3 Складання пачок з саше у гофрокороб та відвантаження

2. Вихідні дані:

a. об'єм культуральної рідини з однієї ферментації - $V_{кр} = 0,66 \text{ м}^3$;

b. концентрація клітин у КР $C_{БМ} = 10,5 \text{ г/л} (=10,5 \text{ кг/м}^3)$ – АСБ.

c. Концентрація фруктоолігосахаридів у КР= 548,3 г/л

d. втрати на стадіях виділення цільового продукту складають 16%

					НУХТ БТЕК 02.02.08 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Максимець О.О			РОЗДІЛ 5. Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях отримання субстанції та ЛЗ	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Грегірчак Н.М.					87	147
Консультант						Кафедра БТМ		
Н.Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

- е. початкова кількість цільового продукту, яка поступає з КР складає: $660 \text{ л} - 69,3 \text{ кг біомаси} = 591 \text{ л}$
 $591 \text{ л} \times 548,3 \text{ г/л} = 324\ 045 \text{ г} = 324 \text{ кг}$; кінцева кількість (з урахуванням 16% втрат) буде становити 272 кг.
- ф. Кількість фруктоолігосахаридів, яка поступає на стадію ПМВ – 272 кг.
- г. Оскільки лікарський засіб буде випускатися у формі порошку упакованого по 5 г у пакетики саше, то з врахуванням втрат (1%):
 $269\ 280 \text{ г} / 5 \text{ г} = 53\ 856$ пакетиків саше
- h. Саше пакуються у вторинну упаковку-коробки. Враховуючи що на добу необхідно приймати 1 пакетик ЛЗ, то у коробку вміщуємо саше з розрахунком на 1 місяць (30 днів), тобто 30 пакетиків у коробці, враховуючи втрати (0,5%): $53\ 856 \text{ саше} / 30 \text{ саше в коробці} = 1786$ коробок.
- і. Після пакування у вторинну упаковку, лікарський препарат складають по 10 коробок у гофрокороби: $1786 \text{ коробок} / 10 = 179$ гофрокоробів
3. Розподіл втрат по стадіях та підбір необхідного обладнання наведено у таблиці 5.1.

Таблиця 5.1

Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях

№ п/п	Назва стадії (операції)	Матеріальні потоки на стадії	Кількість по стадіях			Необхідне обладнання
			Надійшло	Втрати, (Разом 16 %)	Вийшло	
1	2	3	4	5	6	7
ТП 4 Зберігання культуральної рідини						
1	ТП 4 Зберігання культуральної рідини	КР	0,66 м ³ (660 л)	-	0,66 м ³ (660 л)	Збірник об'ємом 800 л з перемішувачем
ТП 5 Відділення біомаси						
2	ТП 5.1 Центрифугування культуральної рідини	Біомаса	6,93 кг (660 л × 10,5 г/л) АСБ, з урахуванням 90% вологості 69,3 кг	-	69,3 кг	Центрифуга з частотою обертів -6000 об/хв, 40 хв На утилізацію
		Супернатант	591 л (660 л-69,3 кг) АБР ФОС =324 кг	2% (11,8 л) (6,48 кг)	579 л (317,5 кг)	Збірник об'ємом 700 л

Продовження табл. 5.1

ТП 6 Очищення розчину ФОС від незброджених цукрів						
3	ТП 6.1 SMB хроматографія	Супернатант	579 л (317,5 кг)	≈10% (63 л) (34,5 кг)		Хроматограф з імітованим рухомих шаром. Колонки від 4 до 12, 200 мм. Циркуляція співрозчинника 20 л/год. Робоча температура від 15 до 50 °С. Робочий тиск від 50 до 500 бар.
		Рафінат (≈ 10 % на очищення)	-		57,9 л	На утилізацію
		Очищений розчин з ФОС	-		579 л - 63 л =516 л (283 кг)	Збірник об'ємом 8000 л з перемішувачем

Продовження табл. 5.1

ТП 7 Змішування						
4	ТП 7.1 Змішування з магній оксидом	Розчин з ФОС	516 л (АБР ФОС= 283 кг)	-	-	Збірник об'ємом 8000 л з перемішуючим пристроєм
		Магній оксид (2% від кількості ФОС)	5,66 кг		-	
		Розчин з магній оксидом	-		6 580 л води + 516 л розчину з ФОС + 5,66 кг магній оксиду = 7 101,7 л	
ТП 8 Сушіння						
5	ТП 8.1. Сушіння в «киплячому» шарі	Розчин з магній оксидом	7 101,7 л (АБС ФОС= 283 кг)	2% (5 кг)	-	Пневматична сушарка з «киплячим» шаром Продуктивність 300 кг
		Висушені ФОС	-		278 кг	

Продовження табл. 5.1

ТП 9 Подрібнення ФОС						
6	ТП 9.1. Подрібнення ФОС на валковій дробарці	Висушені ФОС	278 кг	1% (2,78 кг)	-	Валкова дробарка Продуктивність 300 кг/год
		Подрібнений матеріал	-		275 кг	
ТП 10 Просіювання ФОС						
7	ТП 10.1 Просіювання ФОС на віброситі	Подрібнений матеріал	275 кг	1% (3 кг)	-	Вібраційне сито Діаметр сита: 400 мм; Ефективна площа просіювання: 0,0907 м ²
		Просіяні ФОС	-		272 кг	
ПМВ 11 Пакування, маркування, відвантаження						
8	ПМВ 11.1 Наповнення пакетиків саше	Просіяні ФОС	272 кг	1%	-	Автоматична лінія наповнення порошку у саше, та саше у коробки
		Упакований порошок у саше (по 5 г)	-		269,28 кг = 269 280 г / 5 г = 53 856 саше	

Закінчення табл. 5.1

9	ПМВ 11.2 Упаковка саше у коробки та їх маркування	Пакетики саше	53 856 саше	-	-	Автоматична лінія наповнення порошку у саше, та саше у коробки
		Коробки з саше		0,5%	53 587 саше/ 30 пакетиків в коробці = 1786 пачок	
10	ПМВ 11.3 Складання пачок з саше у гофрокороб та відвантаження	Коробки з саше	1786 шт	-	-	Працівники вручну складають ЛЗ у гофрокороба
		Гофрокороб по 10 пачок в коробці	-	-	1786 шт/ 10 = 179 гофрокоробів	

РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт, стадій виділення та пакування, маркування фруктоолігосахаридів

Таблиця 6.1

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
ПЗ-1	Повітрозабірник	2	Повітрозабірник Aiger deltafan maxі Продуктивність 1100 – 1800 м ³ /год Перепад тиску 25 – 40 Па [149].
Ф-2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Марка ФПК-66-600-6-G4/25 виробника «Воздушные фильтры» Росія. Фільтруючий матеріал-поліестер. Продуктивність фільтра-3400 м ³ /год [135].
В-3	Вентилятор	1	Вентилятор центробіжний «Вентс ВЦУН 225x103 -2,2-2 ПР». Корпус сталевий, покритий полімером. Двигуни асинхронні, захищені від пилу і крапель води. Енергоспоживання 250 Вт. Витрата повітря: 3350 м ³ /год, Діаметр патрубків: 151 \\. Рівень шуму: 75 Дба. Температура повітря: до +60°С. Швидкість обертів: 2865 об/хв. Габаритні розміри:432x507x388 мм [150].

					НУХТ БТЕК 02.02.08 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Максимець О.О.			РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання	Літ.	Арк.	Акресів
Перевір.		Грегірчак Н.М.					96	147
Консультант						Кафедра БТМ		
Н.Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Продовження табл. 6.1

Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Теплообмінник WHE 2040. Максимальний тиск 25 бар. Потужність 29 кВт, пропускна здібність 140 л/хв, охолоджувальна здібність 29 кВт/год. Виробник: «Paskal» Італія [151].
Т-5	Теплообмінник-нагрівач	1	Теплообмінник-нагрівач серії КС 1750 фірми «Галактика» (Україна), кількість повітря 4500 м ³ /год, тепла потужність 45 кВт [152].
Ф-6	Фільтр тонкої очистки повітря	1	ФВК F7 виробника «LuxFilter», Росія. оцинкованого П-подібного профілю. Фільтруючий матеріал-мелтблоун товщиною 8 мм. Пиломісткість-290 г/м ² . Продуктивність – 3500 м ³ /год [136].
РЗ-7	Реактор-змішувач	2	Реактор-змішувач E8000 об'ємом 8000 л. Виробник: PFAUDLER, США. Обладнаний мішалкою та сорочкою. Тиск – 6 бар при 200 °С. Матеріал – емаль. Габарити реактора: діаметр 2000 мм, висота 3300 мм [153].
Д-8	Дозатор	1	Ваговий дозатор ДВП-3 для сипучих компонентів. Виробник: «Асвік Центр», Україна. Межі дозування: 2-6 кг. Продуктивність 25 кг/хв. Дискретність задання маси дози – 2 г. Габаритні розміри, мм: 650×780×1300 [154]

ВН-9, ВН-11, ВН-13, ВН-15 ВН-17	Насос відцентровий	5	Насос відцентровий JEX 750 "Насоси+" (Україна). Продуктивність 0,6 м ³ /год, 10 л/хв. Потужність 0,75 кВт. [155].
РЗ-10	Реактор-змішувач	1	Реактор-змішувач об'ємом 800 л. Виробник: SOMQUIMA, Іспанія. Робочий тиск 6 бар, робоча температура: 200 °С. Мішалка-пропелер. Габаритні розміри: Висота 1000 мм; загальна висота 3150 мм; діаметр: 1000 мм [156].
Ц-12	Центрифуга	1	Центрифуга ОГШ-202К-03: Максимальна чистота обертів: 6000 об/хв; Фактор розділення: 4000 Відношення робочої довжини ротора до внутрішнього діаметра: 3/1; Потужність електронного двигуна приводу: 5,5 кВт; Габаритні розміри: 1490x860x590 мм; Маса: 490 кг [157].
З-14	Збірник	1	Збірник об'ємом 700 л. Виробник: STS- Стройторгсервіс, Україна. Матеріал: нержавіюча сталь AISI 304. Габаритні розміри: висота, мм: 2160 внутрішній діаметр, мм: 890 зовнішній діаметр, мм: 920 [158,159].
Х-16	SMB-хроматограф	1	Хроматограф з імітованим рухомим шаром виробника Ser Tor Technologies, Фінляндія. Колонки від 4 до 12, 200 мм. Циркуляція співрозчинника 20 л/год [160].

Н-18	Перистальтичний насос	1	Насос перистальтичний. Виробник Техприлад, Україна. Модель LPP-T 40. Продуктивність 7,5 м ³ /год. Тиск на виході з насоса 10 бар. Потужність двигуна 1,1-4 кВт [161].
С-19	Пневматична сушарка з «киплячим» шаром	1	Сушарка з киплячим шаром серії FG300. Виробник Сапаан, Київ. Обсяг 1149 л; Виробництво 300 кг/партію; Тиск пару 0,4-0,6 МПа; Стиснене повітря тиск 0,4-0,7 МПа; Сфера гарячого повітря температура до 120 °С. Габарати 2090x5000x1600 [162].
ВД-20	Валкова дробарка	1	Дробарка валкова ДВГ 200x125. Виробник Вібротехнік, Україна. Діаметр валків 200 мм; Крупність вихідного матеріалу не більше 12мм; Усереднений розмір часток кінцевого продукту при мінімальній щілині 0,25 мм; Продуктивність 700 кг/год. Габаритні розміри 680x400x950 мм. [163]
ВС-21	Вібраційне сито	1	Вібросито SWECO. Виробник Альянс-КМ, Україна. Модель N MX48_888, діаметр сита 1220 мм, 3 фракції. Матеріал: нержавіюча сталь 316. [164]
АВ-22	Автоматична лінія пакування у первинну та вторинну упаковку	1	Synthesis Theta. Виробник Universal Pack. Лінія для пакування 4-шовних саше і їх автоматичного фасування у попередньо склеєні картонні пачки. Виготовляється під замовлення [165].

РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ (СУБСТАНЦІЯ ТА ЛЗ)

7.1. Опис технологічної схеми післяферментаційного виділення і очищення субстанції для одержання ЛЗ

Технологічна схема виділення фруктоолігосахаридів включає допоміжні роботи (підготовка вентиляційного повітря, підготовка води, санітарна підготовка виробництва (мийних та дезінфікуючих засобів), підготовка виробничих приміщень, обладнання, персоналу приготування розчину магній оксиду), технологічний процес (зберігання культуральної рідини, центрифугування, концентрування та очищення, змішування з магній оксидом та сушіння з інертними частинками), стадії пакування маркування і відвантаження готового продукту та стадії знешкодження рідких, твердих та газоподібних відходів.

Технологічну схему виділення наведено у графічній частині проекту.

ДР 1 Підготовка вентиляційного повітря

ДР 1.1 Забір атмосферного повітря

Забір атмосферного повітря відбувається на рівні 3 м, за допомогою повітрозабірника (ПЗ -1).

ДР 1.2 Грубе очищення повітря

Після повітрозабірника, повітря направляється до фільтра грубої очистки для видалення великих часток пилу. Для цього використовуємо фільтр повітряний карманний ФПК-66-600-6-G4/25, клас очищення G3 та G4 (Ф-2). В якості фільтруючого матеріалу слугує поліестер, а матеріал корпусу-нержавіюча оцинкована сталь. E=80%.

ДР 1.3 Стабілізація термодинамічних показників

Очищене повітря подається на вентилятор (В-3), далі повітря

					НУХТ БТЕК 02.02.08 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Максимець О.О.			РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми (субстанція та ЛЗ)	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Грегірчак Н.М.					100	1402
Консультант						Кафедра БТМ		
Н.Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

направляється до кожухотрубного теплообмінника, в якому охолоджується (Т-4) або нагрівається (Т-5) (в залежності від пори року). На виході вологість має становити 30-60%.

ДР 1.4 Тонке очищення повітря

Для кращого очищення повітря, використовуємо фільтр карманний ФВК F7 (Ф-6). Конструкція складається з оцинкованого профілю та кишень які виконані з фільтруючого матеріалу- мелтблоун. Висока пиломісткість- 290 г/м². Ступінь очищення E = 95%.

ДР 2 Санітарна підготовка виробництва

ДР 2.1 Підготовка персоналу

Персонал, який задіяний на виробництві має пройти навчання, інструктаж та санітарно-гігієнічну підготовку.

ДР 2.1.1 Навчання та інструктаж

Навчання та інструктаж персоналу проводиться раз на місяць. Кожен працівник має відмічатися про проходження інструктажу в спеціальному журналі обліку. Види навчання для працівників: основне (раз на рік), вхідне (для нових працівників), подальше (систематичне).

ДР 2.1.2 Санітарна підготовка

Персонал повинен періодично перевіряти стан свого здоров'я. Персонал, що працює у виробничому приміщенні, повинен бути одягнений у спеціальний одяг, що відповідає виробничим операціям, які вони виконують. Для обробки та дезінфекції рук використовувати засіб «Стерилліум», який у готовій формі наявний на виробництві. Замінювати раз на місяць 76% етиловим спиртом.

ДР 2.2 Підготовка виробничих приміщень

ДР 2.2.1. Щоденне прибирання

Підготовка приміщень класу чистоти D складається з вологого прибирання приміщень, дезінфекції поверхонь приміщень та обладнання.

При щоденному прибиранні приміщень застосовують Мікробак форте, який чергують із засобом 0,3% Біомой через місяць

Поточне вологе прибирання приміщень проводять щодня після закінчення технологічного процесу.

Після обробки поверхонь всі поверхні миють гарячою водою і висушують до відсутності вологи, а потім проводять дезобробку засобами ДЕЗОлайт, та SANDEZ, Oxivir Plus які на виробництво доставляються у готовій формі

Проводиться контроль мікробної контамінації внутрішньої поверхні приміщень не рідше одного разу на тиждень під час виробничого процесу і не рідше одного разу на місяць після дезобробки.

Відпрацьовані розчини на знешкодження (ЗВ 12.3).

ДР 2.2.2 Генеральне прибирання

При генеральному прибиранні (1 раз на тиждень) застосовують Мікробак форте, який чергують з препаратом 0,5% Біомоем разом з деззасобами, OXIDAG silver, Oxivir Plus 3,5%. Після дезобробки не повинно бути життєздатних мікроорганізмів.

Відпрацьовані розчини на знешкодження (ЗВ 12.3).

ДР 2.3. Підготовка обладнання

ДР 2.3.1 Миття та дезінфекція обладнання

Обладнання миють на початку або вкінці зміни за допомоги розчину Мікробак форте з питною теплою водою (40-45 °С) та дезінфікується засобом ДЕЗОлайт. Дані миючі і дезінфікуючі засоби необхідно замінювати раз на місяць відповідно на Біомой та OXIDAG silver. Відпрацьовані розчини направляються на знешкодження (ЗВ 12.3).

ДР 2.3.2 Ополіскування обладнання

Після миття потрібно ополоснути обладнання очищеною водою температурою 30-40 °С.

Відпрацьовані розчини направляються на знешкодження (ЗВ 12.3).

ДР 2.3.3 Технічний огляд обладнання

Технічний огляд проводимо, задля впевненості у справності обладнання. Якщо будуть виявлені неполадки, проводиться їх усунення.

ДР 2.3.4 Перевірка обладнання на герметичність

Перевірка на герметичність ємнісного обладнання відбувається стисненим повітрям (надлишковий тиск до 0,2 МПа). Перед перевіркою всі з'єднання та клапани обробляються мильним розчином. Час перевірки 30 хв за манометром. Апарат вважається герметичним, якщо тиск не змінюється та не утворюються мильні бульбашки на місцях з'єднання. Відпрацьоване повітря до ЗВ 12.1.

ДР 2.3.5 Стерилізація обладнання

Щоб простерилізувати ємнісне обладнання використовують гостру пару, яку подають в апарат через барботер, попередньо відкривши усю запірну арматуру на комунікаціях та обладнанні. Обов'язково відкрити вентиль відпрацьованого повітря (для виходу повітря з апарату). При досягненні температури 130-135°C, закрити запірну арматуру і залишити в такому стані на 2 год при тиску 0,3 МПа. Конденсат на утилізацію ЗВ 12.3.

ДР 3 Приготування допоміжних розчинів

ДР 3.1. Приготування розчину магній оксиду

У реактор-змішувач об'ємом 8 м³ (РЗ-7) додаємо за допомогою дозатора (Д-8) 5,66 кг магнію оксиду і 6 580 л питної води, контролюючи процес лічильником. Перемішування відбувається при 30°C, 50-60 об/хв.

ТП 4 Зберігання культуральної рідини

Культуральна рідина об'ємом 660 л після ферментера відцентровим насосом (ВН-9) перекачується у реактор-змішувач об'ємом 800 л (РЗ-10), де може зберігатися при 3-4 °С впродовж двох діб до моменту перекачування у центрифугу (Ц-12) до ТП 5.1.

ТП 5 Відділення біомаси

ТП 5.1 Центрифугування культуральної рідини

Культуральна рідина (660 л) відцентровим насосом (ВН-11) надходить у осадову центрифугу зі шнековою вигрузкою осаду (Ц-12). Центрифугування проходить при 6000 об/хв впродовж 40 хв. Далі біомаса йде на утилізацію (до ЗВ 12.2), а супернатант (579 л) надходить насосом (ВН-13) до збірника (З-14), а після перекачується насосом (ВН-15) на SMB хроматографію (до ТП 6.1).

ТП 6 Очищення розчину ФОС від незброджених цукрів

ТП 6.1 SMB хроматографія

Супернатант об'ємом 579 л надходить насосом (ВН-15) на колонки SMB хроматографа. Відділення і очищення ФОС відбувається за допомогою хроматографії з імітованим рухомим шаром (SMB) (X-16). Катіонообмінний адсорбент - «Amberlite™ 1320 Ca», що являє собою смола на основі полі(стирол-кодівінілбензолу) матрицю з функціональною групою – $(\text{SO}_3)_2\text{Ca}^{2+}$. Система складається з чотирьох послідовно з'єднаних хроматографічних колонок. Вода використовується як елюент. Робоча температура становить 50°C. Робочий тиск 250 бар. Рафінат об'ємом 57,9 л йде на утилізацію (до ЗВ 10.3), а очищений розчин з ФОС об'ємом 516 л надходить насосом (ВН-17) у реактор - змішувач (РЗ-7) (До ТП 7.1).

Використана вода до ЗВ 12.3.

ТП 7 Змішування

ТП 7.1 Змішування з магній оксидом

У реактор змішувач (РЗ-7) у якому суспензія магнію оксиду перекачують відцентровим насосом (ВН-17) очищений розчин з ФОС (від ТП 6.1) та перемішують 40 хв при температурі 30 °С з частотою 50-60 об/хв. Потім суспензія з ФОС та магній оксидом (7 101,7 л) надходить перистальтичним насосом (Н-19) у модифіковану сушарку з інертними частинками (С-19) (До ТП 8.1).

ТП 8 Сушіння

ТП 8.1 Сушіння з в «киплячому» шарі

Суспензія з магній оксидом та ФОС об'ємом 7 101,7 л надходить перистальтичним насосом (Н-18) на пневматичну сушарку з киплячим шаром (С-19). Температура 80-95 °С при тиску паром 0,4-0,6 МПа. Швидкість сушильного агента 15-40 м/с. Тиск стисненого повітря 0,4-0,7 МПа. Висушені фруктоолігосахариди вагою 278 кг видаляються через шлюзовий затвор та через систему пневмотранспорту подаються у розвантажувальний циклон і бункер готового продукту, далі накриваються безворсовими серветками та передається на стадію подрібнення до (ПМВ 11.1).

Відпрацьоване повітря до (ЗВ 12.1)

ТП 9 Подрібнення ФОС

ТП 9.1 Подрібнення ФОС на валковій дробарці

Після стадії сушіння, ми отримуємо неоднорідного розміру частки від ТП 8.1. Щоб подрібнити їх до стану порошку, використовуємо валкову дробарку (ВД-20). Подрібнюємо до розміру часток – 0,16-0,25 мм. Подрібнений матеріал вагою 275 кг подаємо накритим стерильними безворсовими серветками до ТП 10.1. Погано подрібнений матеріал після просіювання надходить повторно від ТП 10.1. Пилеподібні відходи на утилізацію до ЗВ 12.1.

ТП 10 Просіювання ФОС

ТП 10.1 Просіювання матеріалу на віброситі

Розмір часток не завжди може бути однаковим після стадії подрібнення ТП 9.1. Щоб забезпечити продукт в якому всі частки будуть одного розміру, просіюємо порошок на вібраційному ситі (ВС-21). Всі частки, що більші за потрібні розміри (275 кг) надходять знову на етап подрібнення вібромлином (ВМ-20) ТП 9.1. Сухий однорідний порошок (покритий стерильними безворсовими серветками) вагою 272 кг поступає на стадію пакування до ПМВ 11. Пилеподібні відходи на утилізацію до ЗВ 12.1.

8.2 Опис технологічної схеми отримання ЛЗ

ПМВ 11 Пакування, маркування, відвантаження

ПМВ 11.1 Навповнення пакетиків саше

Пакування у первинну упаковку, проводимо за допомогою автоматизованої лінії пакування (АВ-22). Порошок фруктоолігосахаридів масою 272 кг (від ТП 10.1) надходить у машину, де автоматично зважується і засипається у 4-шовні пакетики саше по 5 г у кожний. Пакетик після наповнення запаюється швом і далі прямує на вторинну упаковку до (ПМВ 11.2). Браковані саше на знешкодження (ЗВ 12.2).

ПМВ 11.2 Упаковка саше у коробки та їх маркування

На цій самій ж лінії (АВ-22), саше конвеєром направляються на пакування у коробку. Коробки попередньо складаються і склеюються за допомогою гарячого клею. У готові пачки складаються пакетики саше (30 пакетиків у пачці) та інструкція із застосування. На кожную коробку наноситься маркування відповідною інформацією.

Браковані пачки на знешкодження (ЗВ 12.2).

ПМВ 11.3 Складання пачок з саше у гофрокороб та відвантаження

Пакування пачок з саше у гофрокороб здійснюється вручну обслуговуючим персоналом. Готові пачки, персонал складає у гофрокороб по 10 коробок, заклеює та прикріплює етикетку. Упакована продукція зберігається в захищеному від світла місці при температурі від 5 °С до 25 °С та відносній вологості повітря не більше 75%.

ЗВ 12 Знешкодження відходів

ЗВ 12.1 Знешкодження газоподібних відходів

У абсорбер надходить повітря (від ДР 2.3.4, ТП 8.1, ТП 9.1, ТП 10.1), яке барботує через шар рідини, очищуючись від шкідливих для навколишнього середовища речовин. Очищене повітря виходить через патрубков.

ЗВ 12.2. Знешкодження твердих відходів

Тверді відходи (від ТП 5.1, ПМВ 11.1, ПМВ 11.2) знешкоджуються під час піролізу. Відходи піддаються впливу високій температурі $t=550\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 хв.

Отримані карбонати активізуються при 900°C і на виході отримуємо активоване вугілля, яке може бути використане в системах водоочищення.

ЗВ 12.3. Знешкодження рідких відходів

Рідкі відходи (від ДР 2.2.1, ДР 2.2.2, ДР 2.3.1, ДР 2.3.2, ДР 2.3.5, ТП 6.1) поступають у електрореактор установки знезараження та регенерації, де електроди, які виробляють коагулянт і газ, очищують воду.

РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА СУБСТАНЦІЇ ДЛЯ ЛЗ

8.1. Опис субстанції для лікарського засобу згідно АНД

Методи контролю субстанції фруктоолігосахаридів проводяться згідно Аналітично нормативної документації (АНД) та Державної Фармакопеї України (ДФУ) [166].

ВЛАСТИВОСТІ

Опис. Фруктоолігосахариди являють собою аморфний порошок (гігроскопічний або дуже гігроскопічний) майже білого кольору з солодкуватим присмаком. Визначають візуально, органолептично.

Розчинність. Дуже легко розчинна у воді Р, розчинна у 96% спирті Р.

ІДЕНТИФІКАЦІЯ

А. Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

Тонкошарова хроматографія являє собою метод розділення, в якому використовується нерухома фаза, що складається з придатного матеріалу, нанесеного у вигляді стандартизованого тонкого шару і зафіксованого на основі (пластинці або пластині) із скла, металу або пластмаси. Перед хроматографуванням розчини речовин, що аналізуються, наносять на пластинку. Розділення засноване на процесах адсорбції, розподілу, іонного обміну або на їх комбінації і здійснюється за допомогою переміщення в тонкому шарі (нерухомій фазі) досліджуваних речовин, розчинених у розчиннику або у відповідній суміші розчинників (рухомій фаз

Випробовуваний розчин (а). До 0.2 г субстанції додають 0.8 г щавлевої кислоти Р, додають 10 мл гарячої води Р, розчиняють, перемішуючи. Нагрівають на водяній бані зі зворотнім холодильником протягом 10 хв, охолоджують, доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 20 мл.

					НУХТ БТЕК 02.02.08 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Максимець О.О.			РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва субстанції для ЛЗ	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Грегірчак Н.М.					108	147
Консультант								110
Н.Контр.						Кафедра БТМ		
Затверд.		Стабніков В.П.						

Випробовуваний розчин (b). До 0.2 г субстанції додають 10 мл гарячої води Р, розчиняють, перемішуючи, охолоджують, доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 20 мл.

Розчин порівняння (a). 0.1 г ФСЗДФУ фруктози розчиняють у 10 мл води Р і доводять об'єм розчину водою Р до 20 мл.

Розчин порівняння (b). 0.1 г ФСЗДФУ глюкози моногідрату розчиняють у 10 мл води Р і доводять об'єм розчину водою Р до 20 мл.

Розчин порівняння (c). 0.1 г ФСЗДФУ сахарози розчиняють у 10 мл води Р і доводять об'єм розчину водою Р до 20 мл.

Розчин порівняння (d). 0.1 г ФСЗДФУ лактози моногідрату Р розчиняють у 10 мл води Р і доводять об'єм розчину водою Р до 20 мл.

Розчин порівняння (e). По 0.1 г ФСЗДФУ фруктози, ФСЗДФУ глюкози моногідрату, ФСЗДФУ сахарози та ФСЗДФУ лактози моногідрату розчиняють у 10 мл води Р і доводять об'єм розчину водою Р до 20 мл.

Розчин порівняння (f). 0.1 г ФСЗДФУ мальтодекстрину розчиняють у 10 мл води Р і доводять об'єм розчину водою Р до 20 мл.

Пластинка: ТШХ-пластинка із шаром силікагелю Р.

Рухома фаза: вода Р – хлороформ Р – оцтова кислота льодяна Р (10:60:70). Точно відмірюють об'єми компонентів суміші, тому що невеликий надлишок води призводить до помутніння.

Нанесення: 5 мкл, наносять смугами довжиною 1 см; ретельно висушують плями на лінії старту.

Відстань, що має пройти рухома фаза, А: 10 см від лінії старту.

Висушування А: у потоці теплого повітря протягом декількох хвилин.

Відстань, що має пройти рухома фаза, Б: 10 см від лінії старту; хроматографують негайно після оновлення рухомої фази.

Висушування Б: у потоці теплого повітря протягом декількох хвилин.

Виявлення: обприскують сумішшю, приготованою так: 2 мл аніліну Р і 2 мл дифеніламіну Р розчиняють у 100 мл метанолу Р, додають 15 мл

фосфорної кислоти Р і перемішують; нагрівають пластинку за температури 130 °С протягом 10 хв.

Придатність хроматографічної системи: розчин порівняння (e):

— на хроматограмі мають виявлятися 4 чітко розділені зони.

Результати:

— на хроматограмі випробовуваного розчину (a) мають виявлятися дві зони на рівні основних зон на хроматограмах розчинів порівняння (a) і (b);

— на хроматограмі випробовуваного розчину (b) має виявлятися зона коричневого кольору на лінії старту, можуть виявлятися й інші хроматографічні зони, у тому числі зони, що відповідають зонам на хроматограмі розчинів порівняння (c) і (d), але не мають виявлятися зони, що відповідають зонам на хроматограмі розчину порівняння (f).

В. 10 мг субстанції розчиняють у 2 мл гарячої води Р, додають 3 мл 0.15 % (м/об) розчину резорцину Р в етанолі (96 %) Р, 3 мл хлористоводневої кислоти Р, перемішують і нагрівають на водяній бані за температури 80 °С; з'являється червоне забарвлення.

С. До 5 мл розчину S, приготованого, як зазначено в розділі «Випробування», додають 0.5 мл хлористоводневої кислоти Р, нагрівають на водяній бані протягом 2 хв, охолоджують, нейтралізують натрію гідроксиду розчином Р за лакмусовим папером червоним Р, додають 0.5 мл мідно-тартратного розчину Р і нагрівають; утворюється червоний осад.

ВИПРОБУВАННЯ

Розчин S. 10.0 г субстанції розчиняють у гарячій воді, вільній від вуглецю діоксиду, Р, охолоджують, доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 100 мл і перемішують

Прозорість розчину (2.2.1). Для визначення прозорості і ступеня каламутності рідин використовують однакові пробірки з безбарвного прозорого нейтрального скла з плоским дном, що мають внутрішній діаметр від 15 мм до 25 мм. 40-мм шар випробовуваної рідини порівнюють з 40-мм

шаром свіжоприготованого, еталона. Порівняння рідин проводять у розсіяному денному світлі через 5 хв після приготування еталона, переглядаючи зразки уздовж вертикальної осі пробірок на чорному фоні. Розсіяння світла має бути таким, щоб еталон I легко відрізнявся від води Р, а еталон II легко відрізнявся від еталона I. Випробовувану рідину вважають прозорою, якщо вона витримує порівняння з водою Р або розчинником, використовуваним при приготуванні випробовуваної рідини при перегляді за зазначених вище умов, або її каламутність не перевищує каламутності еталона I.

Отже, 5.0 г фруктоолігосахаридів розчиняють у воді Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10 мл. Одержаний розчин має бути прозорим.

pH (2.2.3). pH — число, яке умовно характеризує концентрацію іонів водню у водних розчинах. На практиці pH визначають експериментально. pH випробовуваного розчину пов'язане з pH стандартного розчину (pH_s) таким рівнянням:

$$pH = pH_s \frac{E - E_s}{k}$$

де:

E — потенціал електрода у випробовуваному розчині, у вольтах;

E_s — потенціал того ж електрода в розчині з відомим pH (pH_s), у вольтах.

k — температурний коефіцієнт, що дорівнює зміні потенціалу при зміні значення pH на одиницю, виражений у вольтах, який розраховують за рівнянням Нернста.

Потенціометричне визначення pH проводять шляхов вимірювання різниці потенціалів між двома відповідними електродами, зануреними у випробовуваний розчин: один з електродів чутливий до іонів водню (звичайно скляний електрод), другий - електрод порівняння (наприклад, насичений каломельний електрод).

Прилад. Вимірювальним приладом є вольтметр з вхідним опором принаймні у 100 разів більшим за опір використовуваних електродів. Прилад звичайно градується в одиницях рН і повинен мати таку чутливість, щоб можна було виявити відмінність принаймні 0.05 одиниць рН або 0.003 В.

Методика. Усі виміри проводять при тій самій температурі в інтервалі від 20 °С до 25 °С, якщо немає інших зазначень в окремій статті. Прилад калібрують за допомогою буферного розчину калію гідрофталату (первинний стандарт) і одного з буферних розчинів з іншим значенням рН. Показання приладу для третього буферного розчину з проміжним значенням рН не мають відрізнятися більше як на 0.05 одиниць рН від табличного значення рН цього розчину. Електроди занурюють у випробовуваний розчин і вимірюють рН у тих самих умовах, що і для буферних розчинів.

рН розчину S має бути від 4,5 до 7,0.

Питоме оптичне обертання (2.2.7). Оптичне обертання — це властивість речовини обертати площину поляризації поляризованого світла. Оптичне обертання вважають позитивним (+) для правообертальних речовин (що обертають площину поляризації за годинниковою стрілкою) і негативним (-) для лівообертальних речовин.

Методика. Визначають нуль поляриметра і кут обертання площини поляризації за довжини хвилі D-лінії спектра натрію ($\lambda = 589.3$ нм) при температурі (20 ± 0.5) °С, якщо немає інших зазначень в окремій статті. Вимірювання оптичного обертання можуть проводитися при інших температурах лише у тих випадках, якщо в окремій статті зазначений спосіб врахування температури. Визначають нуль приладу з закритою трубкою; для рідин — з порожньою трубкою; для розчинів твердих речовин — з трубкою, заповненою зазначеним розчинником.

Питоме оптичне обертання фруктоолігосахаридів становить від -15.0° до -40.5° , у перерахунку на суху речовину.

Оксалати. 10 мл розчину S поміщають у водяну баню з температурою 40 °С, додають 0.5 мл 7 % (м/об) розчину кальцію хлориду Р і витримують протягом 15 хв. Опалесценція одержаного розчину не має перевищувати опалесценцію 0.003 % (м/об) розчину щавлевої кислоти Р, обробленого аналогічно розчину S.

Хлориди (2.4.4). Не більше 170 ppm. 2.0 г субстанції розчиняють у 30 мл гарячої води Р, охолоджують і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 100 мл. 15 мл одержаного розчину мають витримувати випробування на хлориди.

Сульфати (2.4.13). Не більше 200 ppm. 2.3 г субстанції розчиняють у 20 мл гарячої дистильованої води Р, охолоджують, додають 2 мл 2 М розчину хлористоводневої кислоти Р і доводять об'єм розчину водою Р до 45 мл. 15 мл одержаного розчину мають витримувати випробування на сульфати.

Арсен (2.4.2, метод А). Не більше 1 ppm. 1.0 г субстанції має витримувати випробування на арсен.

Важкі метали (2.4.8, метод А). Не більше 5 ppm. 4.0 г субстанції розчиняють у 15 мл гарячої води Р, охолоджують і доводять об'єм розчину водою Р до 20 мл. 12 мл одержаного розчину мають витримувати випробування на важкі метали. Еталон готують із використанням свинцю еталонного розчину (1 ppm Рb) Р.

Втрата в масі при висушуванні (2.2.32). Не більше 10.0 %. 1.000 г субстанції сушать за температури від 100 °С до 105 °С до постійної маси.

Сульфатна зола (2.4.14). Не більше 0.2 %. Визначення проводять із 1.0 г субстанції.

ЗБЕРІГАННЯ

У повітронепроникному контейнері.

РОЗДІЛ 9. ОПИС ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ЗГІДНО АНД (ПРОЄКТ АНД)

9.1. Опис лікарського засобу згідно АНД

Методи контролю препарату пребіотика «F.O.S» проводяться згідно Аналітично нормативної документації (АНД) та Державної Фармакопеї України (ДФУ) [166].

9.1.1. Зовнішній вигляд пребіотика «F.O.S»

Порошок (кристалічна або пориста маса) майже білого кольору різної інтенсивності без ароматизаторів (відсутність запаху), солодкуватий смак. Визначають візуально, органолептично.

Порошки для орального застосування являють собою лікарську форму, що складається з твердих окремих сухих часток різного ступеня здрібненості. Порошки містять одну або більше діючих речовин з допоміжними речовинами або без них. Порошки звичайно приймають з водою або іншою підходящою рідиною. Їх можна також ковтати безпосередньо. Порошки випускають в однодозових або багатодозових контейнерах.

9.1.2. Кольоровість препарату пребіотика «F.O.S»

Суспензія повинна мати світло-молочний колір. Приготування розчину проводять за п.3 АНД «Розчинність». Визначають візуально.

9.1.3. Розчинність препарату пребіотика «F.O.S»

При додаванні *води P* із розрахунку 1 мл на 1 дозу препарату протягом 5 хвилин утворюється гомогенна суспензія світло-молочного кольору. Визначають візуально.

9.1.4. Мікробіологічна чистота

Препарат не повинен містити сторонніх мікроорганізмів, пліснявих та дріжджеподібних грибів. Визначають згідно з ДФУ, доп. 1, р. 2.6.12, с.37, р. 2.6.13, N, с. 42.

					НУХТ БТЕК 02.02.08 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Максимець О.О.			РОЗДІЛ 9. Опис лікарського засобу згідно АНД (проект АНД)	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Грегірчак Н.М.					114	1476
Консультант						Кафедра БТМ		
Н.Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Зразок лікарського засобу у кількості 10 г поміщають у мірний флакон місткістю 250 мл, доводять до 100 мл (розведення 1:10) буферним розчином з натрієм хлоридом і пептоном, рН 7,0 та перемішують до отримання гомогенної зависі.

Для визначення загальної кількості бактерій по 1 мл зависі висівають не менш, ніж на дві чашки Петрі з густим поживним середовищем №1 методом двошарового висівання.

Для визначення загальної кількості грибів по 1 мл зависі висівають не менш, ніж на дві чашки Петрі з густим поживним середовищем 2 методом двошарового висівання.

Посіви на середовищі №1 інкубують при 30–35 °С для виявлення бактерій, а посіви з середовищем №2 – при 20–25 °С для виявлення грибів протягом 5 діб, якщо вірогідні результати не будуть отримані раніше.

Для визначення окремих видів мікроорганізмів по 10 мл зависі висівають на рідких поживних середовищах: №3 (для виявлення бактерій родини *Enterobacteriaceae*) та №8 (для виявлення *Pseudomonas aureginosa* та *Staphylococcus aureus*). Посіви інкубують при 30–35 °С протягом 18–24 год, після чого роблять пересіви з середовища №3 на густі середовища №4 та №5, а з середовища №8 – на середовища №9 та №10. Посіви інкубують при 35–37 °С протягом 24–48 год. При наявності росту мікроорганізмів проводять їх ідентифікацію згідно вимог ДФУ, доп. 1, р. 2.6.13, N, с.42.

Препарат не повинен містити сторонніх мікроорганізмів, плісняви та дріжджеподібних грибів. У випадку виявлення в посівах сторонніх мікроорганізмів, контроль проводять на подвоєній кількості зразків препарату.

При відсутності росту мікроорганізмів при повторному висіву досліджуваній препарат вважають таким, що відповідає вимогам. У випадку росту сторонніх мікроорганізмів при повторному висіві зразків серію препарату бракують.

9.1.5. Специфічна нешкідливість препарату пребіотика «F.O.S»

Препарат має бути нешкідливим для білих мишей при введенні його перорального в кількості однієї дози. Випробування проводять на 5-ти безпородних мишах різної статі масою 14–16 г, зважуючи тварин до проведення досліду.

Вміст саше розводять *водою P* з розрахунку 0,5 мл на 1 дозу препарату. Кожній з 5-ти мишей вводять 0,5 мл отриманої зависі перорально в шлунок за допомогою насадки на шприц місткістю 1 мл. Термін спостереження – 5 діб.

Всі тварини повинні залишитися живими та не втратити вагу. У випадку загибелі за цей період хоча б однієї тварини або втраті у вазі контроль повторюють на подвійній кількості тварин. Препарат вважають нешкідливим, якщо при повторному випробуванні не загинула жодна з мишей. У протилежному випадку дану серію препарату бракують.

9.1.6. Однорідність дозованих одиниць

Для визначення ОДО (однорідність дозованих одиниць) можна використовувати один із двох методів: метод прямого визначення однорідності вмісту та розрахунково-ваговий метод згідно з методикою ДФУ (2.9.40, с.181). Обираємо розрахунково-ваговий метод, так як саме він рекомендується для твердих лікарських форм (зокрема порошків) в однодозових контейнерах.

Розрахунково-ваговий метод

Кількісне визначення діючої речовини або речовин проводять на репрезентативному зразку серії, використовуючи підхожий аналітичний метод. Отримують значення *A*, виражене у відсотках від номінального вмісту. Припускають, що концентрація (маса діючої речовини на масу дозованої одиниці) однакова для всіх дозованих одиниць. Відбирають не менше 30 дозованих одиниць і проводять випробування, як зазначено для кожної дозованої лікарської форми.

Точно зважують кожну з 10 відібраних пакетиків з порошком, ретельно стежачи за їх цілісністю. Витягують вміст кожного пакетика підходящим способом. Точно зважують кожен спорожнений пакетик і розраховують для кожного пакетика чисту масу вмісту, віднімаючи масу оболонки від відповідної загальної маси. Розраховують вміст діючої речовини в кожному зразку, виходячи з витягнутого пакетика індивідуальної маси і результату кількісного визначення. Розраховують приймальне число.

Розрахунок приймального числа
Приймальне число (AV) обчислюють за формулою:

$$|M - \bar{X}| + ks$$

Вимоги ОДО вважаються виконаними, якщо приймальне число для перших 10 одиниць менше або дорівнює $L1$ (максимально припустиме приймальне число). Якщо приймальне число більше $L1$, випробуванню піддають наступні 20 одиниць і обчислюють приймальне число. Якщо немає інших зазначень в окремій статті, $L1$ дорівнює 15.0, а $L2$ (максимально припустима межа відхилення для кожної випробуваної дозованої одиниці) дорівнює 25.0.

9.1.7. Однорідність вмісту

Однорідність маси для одиниці дозованого ЛП оцінюється згідно з методикою ДФУ (2.9.5, с. 157). Припустиме відхилення не повинно перевищувати 10% при середній масі <300 мг і 7,5% для саше з середньою масою ≥ 300 мг.

Вміст саше оцінюється відповідно до методики ДФУ (2.96, с. 158).

Точно зважують кожну з 10 відібраних пакетиків, ретельно стежачи за їх цілісністю. Витягають вміст кожного саше підходящим способом. Точно зважують кожну зі спорожнених оболонок і розраховують для кожного пакетика масу вмісту, віднімаючи масу оболонки від відповідної загальної маси. Розраховують вміст діючої речовини в кожному пакетіку виходячи з

маси вмісту, витягнутого з окремого саше та результату кількісного визначення.

Препарат витримує випробування, якщо вміст не більше ніж в одній одиниці виходить за межі 85–115% і в жодній одиниці не виходить за межі 75–125% від середнього вмісту в препараті. Вміст діючої речовини у саше, якщо немає інших зазначень в окремій статті, має становити при дозуванні менше 1 мг ($\pm 15\%$), від 1 мг до 10 мг ($\pm 10\%$), від 10 мг до 100 мг ($\pm 7,5\%$) і від 100 мг й вище ($\pm 5\%$).

9.1.8. Однорідність маси

Однорідність маси для одиниці дозованого ЛП оцінюється згідно з методикою ДФУ (2.9.5, с. 157). 20 одиниць дозованого лікарського засобу або вміст кожного з 20 контейнерів, у випадку однодозових лікарських засобів в індивідуальних контейнерах, відбирають за статистичне обґрунтованою схемою, зважують кожну окремо і розраховують середню масу. Припустиме відхилення не повинно перевищувати 10% при середній масі < 300 мг і 7,5% для саше з середньою масою ≥ 300 мг.

9.1.9. Термін придатності

Термін придатності – 48 місяців від дати виготовлення. Зберігати у сухому, захищеному від сонця місці при температурі від 5 °С до 25 °С та відносній вологості повітря не більше 75%; у недоступному для дітей місці [167].

ВИСНОВКИ

Під час виконання даної магістерської роботи було проведено літературний огляд статей щодо мікробних олігосахаридів: проаналізовані продуценти, види синтезованих ними олігосахаридів (фруктоологіосахариди, галактоологіосахариди, мананоологіосахариди, ксилоологіосахариди) та особливості їх одержання. Проаналізувавши статті, можна сказати, що науковці вдавалися до різних підходів отримання олігосахаридів: змінювали активність ферментів вивчали їх дію на різних субстратах, оптимізували параметри та види культивування.

Далі, було важливим зрозуміти яку роль відіграють олігосахариди у формуванні нормальної мікрофлори і вирішити чи раціонально використовувати їх як пребіотики. Фруктоологіосахариди завдяки тому що не метаболізуються у тонкій кишці, слугують субстратом для нормальної мікробіоти людини і тому мають протиракові властивості та стійкість до жовчних солей, протизапальні та імунні ефекти, що робить їх потенційними пребіотиками.

Найкращим продуцентом виявився *Aureobasidium pullulans* іре-3, який синтезує $548,3 \pm 37,4$ г/л ФОС, має порівняно дешеве середовище (17,5 грн/л) та найнижчу умовну вартість 1 г цільового продукту (0,032 грн/г). Щоб розрахувати економічну частину проєкту, за основу була взята хвороба Крона і її поширення на всю Європу. Врахувавши кількість хворих, рекомендації щодо застосування пребіотика та структуру ринку, потужність склала 20 000 кг.

Для отримання готового лікарського засобу, субстанція фруктоологіосахаридів після культивування пройшла такі етапи виділення як: центрифугування, SMB-хроматографія, змішування з магній оксидом,

					НУХТ БТЕК 02.02.08 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Висновки	Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.		Максимець О.О					119	147
Перевір.		Грегірчак Н.М.						121
Консультант						Кафедра БТМ		
Н.Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

сушіння в «киплячому» шарі, подрібнення, просіювання та стадії пакування порошку у первинну упаковку саше, а далі у вторинну- картонні пачки, їх маркування та відвантаження на склад.

У роботі був здійснений підбір відповідного обладнання для виконання технологічних процесів та описано технологічну схему післяферментаційного виділення і очищення субстанції для одержання ЛЗ (які винесено до графічної частини проєкту: апаратурна та технологічна схеми).

Наостанок, у роботі були виконані не менш важливі етапи: вказаний контроль виробництва субстанції для лікарського засобу, та описаний лікарський засіб, згідно Аналітично-нормативних документів (АНД) та за допомогою Державної фармакопеї України (ДФУ).

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Няньковський С.Л. Пребіотики і пробіотики-можливості профілактичного і лікувального використання у дітей. Дитячий Лікар. 4 (6) 2010. <https://d-l.com.ua/ua/archive/2010/4%286%29/pages-5ристання9/prebiotiki-i-probiotiki-mozhivosti-profilaktichnogo-i-likuvalnogo-vikoristannya-u-ditey>
2. Буділович І. Пробиотики та пребіотики. В чому різниця і користь? AgroPortal. 2018. <https://agroportal.ua/ua/views/blogs/probiotiki-i-prebiotiki-v-chem-raznitsa-i-polza/>
3. Пробиотики і пребіотики у клінічній практиці: якою є доказова база? Дитячий Лікар. 2018 <https://health-ua.com/article/37942-probotiki--prebotiki-uklnchnj-praktitc--yakoyu--dokazova-baza>
4. Боцюрко В.І., Дідушко О.М., Костіцька І.О. Перспективи застосування пробіотиків і пребіотиків у діабетології. Природна медицина №1. 2017. <https://health-ua.com/vestnik/article/29323-perspektivi-zastosuvannya-probotikv--prebotikv-u-dabetolog>
5. Няньковський С. Добрянський Д., Марушко Ю. та ін. Харчування дітей раннього віку: теорія і практика. – Львів: Ліга-Прес, 2009. – 288 с.
6. Liang, X.; Li, C.; Cao W.; Cao, W.; Shen, F.; Wan, Y. Fermentative Production of Fructo-Oligosaccharides Using *Aureobasidium pullulans*: Effect of Dissolved Oxygen Concentration and Fermentation Mode. *Molecules* 2021, 26, 3867. <https://doi.org/10.3390/molecules26133867>
7. N. Amrutha , H. Umesh Hebbar , S. G. Prapulla & K. S. M. S. Raghavarao (2014) Effect of Additives on Quality of Spray-Dried Fructooligosaccharide Powder, *Drying Technology: An International Journal*, 32:9, 1112-1118, DOI: [10.1080/07373937.2014.886257](https://doi.org/10.1080/07373937.2014.886257)
8. Безусов А.Т., Доценко Н.В. Біологічно активні олігосахариди із бактеріальних клітинних стінок. Збірник тез доповідей Міжнародної

- науково-практичної конференції «Технології харчових продуктів і комбікормів». –Одеса: ОНАХТ, 2019.-70 с.
file.onaft.edu.ua/bitstream/123456789/10503/1/Food_Feed_Technologies_2019_Vezusov.pdf
9. Лисогор Т.А., Ліганенко М.Г. Волокноподібні неператравні олігосахариди-перспективний клас пребіотиків. Прогресивні техніка та технології харчових виробництв ресторанного господарства і торгівлі: зб.наук.праць. Ч.2. Вип. (2)16.- Х.:ХДУХТ. 2012.- 430 с.
<https://elib.hduht.edu.ua/bitstream/123456789/3214/1/54.pdf>
 - 10.Лазарева Е.Б. Опыт и перспективы использования пектинов в лечебной практике / Е. Б. Лазарева, Д. Меньшиков // НИИ скорой помощи им.Н. В. Склифосовского.
 - 11.Отт В.Д. Сучасні дані про роль пребіотиків в дитячому харчуванні / В.Д. Отт, О.М. Муквіч // Інститут педіатрії, акушерства та гінекології АМН України.
 - 12.Belorkar, S.A., Gupta, A.K. Oligosaccharides: a boon from nature's desk. *AMB Expr* 6, 82 (2016). <https://doi.org/10.1186/s13568-016-0253-5>
<https://link.springer.com/article/10.1186/s13568-016-0253-5>
 - 13.Bruno-Barcena J.M., Azcarate-Peril M.A. Galacto-oligosaccharides and colorectal cancer: Feeding our intestinal probiome. *Journal of Functional Foods*. Vol. 12, 2015, P. 92-108, <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.10.029>
 14. Ait-Aissa A., Aider M. Lactulose: production and use in functional food, medical and pharmaceutical applications. Practical and critical review // *Int. J. Food Sci. Technol.* 2014. Vol. 49. P. 1245– 1253.
 - 15.Рябцева С.А., Храпцов А.Г. Физиологические эффекты, механизмы действия и применение лактулозы. *Вопросы питания*. Том 89, №2, 2020, 5-16 с. file:///C:/Users/User/Downloads/fiziologicheskie-effekty-mehanizmy-deystviya-i-primenenie-laktulozy.pdf

16. Камишнікова В.О., Івахненко О.Л. Вибір концентрації пребіотичних компонентів для покращення адгезивних властивостей лактобактерій. *Національний фармацевтичний університет*. 2012. <https://dspace.nuph.edu.ua/bitstream/123456789/12013/1/359%281%29.pdf>
17. Чернікова Г.Ю. Пребіотики та їх використання. *Сучасне птахівництво*. №11-12 (156-157). 2015. 11-13 с. file:///C:/Users/User/Downloads/Sps_2015_11-12_8.pdf
18. Кучерук М.Д. Нутріцевтики для корекції мікрофлори травного каналу та профілактики шлунково-кишкових захворювань. *Сучасне птахівництво*. – 2011. – № 4 (101). – С. 10-13.
19. Тарасенко Н.А. Кратко о пребиотиках: история, классификация, получение, применение. *Фундаментальные исследования*. – 2014. – № 6-1. <http://cyberleninka.ru/article/n/kratko-o-prebiotikah-istoriya-klassifikatsiya-poluchenie-primenenie>
20. Davani-Davari D., Negahdaripour M. Prebiotics: Definition, Types, Sources, Mechanisms, and Clinical Applications. *Foods* 2019, 8(3), 92; <https://doi.org/10.3390/foods8030092>
21. Ganaie MA, Soni H, Naikoo GA, Oliveira LTS, Rawat HK, Mehta PK, Narain N. Screening of low cost agricultural wastes to maximize the fructosyltransferase production and its applicability in generation of fructooligosaccharides by solid state fermentation. *Int Biodeter Biodegr*. 2017; 118:19–26. doi: 10.1016/j.ibiod.2017.01.006 <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0964830517300069>
22. Mussatto, S. I, and Teixeira J. A. Increase in the fructooligosaccharides yield and productivity by solid-state fermentation with *Aspergillus japonicus* using agro-industrial residues as support and nutrient source. *Biochem Eng J*. 2010; 53(1): 154-157. Doi: 10.1016/j.bej.2010.09.012 https://www.researchgate.net/publication/257555779_Increase_in_the_fructooli

- gosaccharides_yield_and_productivity_by_solid-state_fermentation_with_Aspergillus_japonicus_using_agro-industrial_residues_as_support_and_nutrient_source
23. Xie YJ, Zhou HX, Liu CX, Zhang J, Li N, Zhao ZL, Sun GY, Zhong YH. A molasses habitat-derived fungus *Aspergillus tubingensis* XG21 with high beta-fructofuranosidase activity and its potential use for fructooligosaccharides production. *AMB Expr.* 2017; 7:128. doi:10.1186/s13568-017-0428-8 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28641403/>
24. Ganaie MA, Gupta US, Kango N. Screening of biocatalysts for transformation of sucrose to fructooligosaccharides. *J Mol Catal BEnzym.* 2013; 97:12–17. doi:10.1016/j.molcatb.2013.07.008 https://www.researchgate.net/publication/259159182_Screening_of_biocatalysts_for_transformation_of_sucrose_to_fructooligosaccharides
25. Ning YW, Li Q, Chen F, Yang N, Jin ZY, Xu XM. Low-cost production of 6G-fructofuranosidase with high value-added astaxanthin by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Bioresour Technol.* 2012; 104:660–667. doi:10.1016/j.biortech.2011.10.098 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22119431/>
26. Prata, M. B., Mussatto, S. I., Rodrigues, L. R., Teixeira, J. A. Fructooligosaccharide production by *Penicillium expansum*. *Biotechnol Lett.* 2010; 32(6): 837-840. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10529-010-0231-y>
27. Castro CC, Nobre C, Duprez ME, De Weireld G, Hantson AL. Screening and selection of potential carriers to immobilize *Aureobasidium pullulans* cells for fructo-oligosaccharides production. *Biochem Eng J.* 2017; 118:82–90. doi: 10.1016/j.bej.2016.11.011 <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201700148177>
28. Nobre C, Castro CC, Hantson AL, Teixeira JA, De Weireld G, Rodrigues LR. Strategies for the production of high-content fructo-oligosaccharides

- through the removal of small saccharides by coculture or successive fermentation with yeast. *Carbohydr Polym.* 2016; 136:274–281. doi:10.1016/j.carbpol.2015.08.088 <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S014486171500836X>
29. Zhang J, Liu C, Xie Y, Li N, Ning Z, Du N, Huang X, Zhong Y. Enhancing fructooligosaccharides production by genetic improvement of the industrial fungus *Aspergillus niger* ATCC 20611. *J Biotechnol.* 2017; 249:25–33. doi:10.1016/j.jbiotec.2017.03.021 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28344156/>
30. Nascimento AKC, Nobre C, Cavalcanti MTH, Teixeira JA, Porto ALF. Screening of fungi from the genus *Penicillium* for production of β -fructofuranosidase and enzymatic synthesis of fructooligosaccharides. *J Mol Catal B-Enzym.* 2016; 134:70–78. doi:10.1016/j.molcatb.2016.09.005 https://www.researchgate.net/publication/308019334_Screening_of_fungi_from_the_genus_Penicillium_for_production_of_b-fructofuranosidase_and_enzymatic_synthesis_of_fructooligosaccharides
31. Srivastava A, Mishra S, Chand S. Transgalactosylation of lactose for synthesis of galacto-oligosaccharides using *Kluyveromyces marxianus* NCIM 3551. *New Biotechnol.* 2015; 32:412–418. doi:10.1016/j.nbt.2015.04.004 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25976627/>
32. Sun H, You S, Wang M, Qi W, Su R, He Z. Recyclable strategy for the production of high-purity galactooligosaccharides by *Kluyveromyces lactis*. *J Agr Food Chem.* 2016; 64:5679–5685. doi:10.1021/acs.jafc.6b01531 <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jafc.6b01531>
33. Yin H, Bultema JB, Dijkhuizen L, Leeuwen SS. Reaction kinetics and galactooligosaccharide product profiles of the β -galactosidases from *Bacillus circulans*, *Kluyveromyces lactis* and *Aspergillus*

- oryzae*. Food Chem. 2017; 225:230–238. doi:10.1016/j.foodchem.2017.01.030 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28193420/>
34. González-Delgado I, Lopez-Muñoz M, Morales G, Segura Y. Optimization of the synthesis of high galacto-oligosaccharides (GOS) from lactose with β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. Int Dairy J. 2016; 61:211–219. doi:10.1016/j.idairyj.2016.06.007
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0958694616301789>
35. Aburto C, Guerrero C, Vera C, Wilson L, Illanes A. Simultaneous synthesis and purification (SSP) of galactooligosaccharides in batch operation. LWT - Food Sci Technol. 2016; 72:81–89. doi:10.1016/j.lwt.2016.04.029
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0023643816302134>
36. Сеуірбаева А.Т., Кукишева А.А., Турумбетова Ж.Ж. Влияние В-галактозидазной активности дрожжей вида *Kluyveromyces lactis* на синтез олигосахаридов в молочной сыворотке. 2013.
<https://dspace.enu.kz/handle/data/8687>
37. Golowczyc M, Vera C, Santos M, Guerrero C, Carasi P, Illanes A, Gómez-Zavaglia A, Tymczyszyn E. Use of whey permeate containing in situ synthesized galacto-oligosaccharides for the growth and preservation of *Lactobacillus plantarum*. J Dairy Res. 2013; 80:374–381. doi:10.1017/S0022029913000356
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23876605/>
38. Rodriguez-Colinas B, Fernandez-Arrojo L, Santos-Moriano P, Ballesteros AO, Plou FJ. Continuous packed bed reactor with immobilized β -galactosidase for production of galactooligosaccharides (GOS). Catalogue. 2016; 6:1–12. doi:0.3390/catal6120189
<https://www.mdpi.com/2073-4344/6/12/189>
39. Fai AEC, Simiqueli APR, Ghiselli G, Pastore GM. Sequential

- optimization approach for prebiotic galactooligosaccharides synthesis by *Pseudozyma tsukubaensis* and *Pichia kluyveri*. *LWT -Food Sci Technol.* 2015; 63:1214–1219. doi:10.1016/j.lwt.2015.04.064<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0023643815003461>
40. Samanta AK, Jayapal N, Jayaram C, Roy S, Kolte AP, Senani S, Sridhar M. Xylooligosaccharides as prebiotics from agricultural byproducts: production and applications. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre.* 2015; 5:62–71. doi:10.1016/j.bcdf.2014.12.003 <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2212619814000588>
41. Milessi TSS, Kopp W, Rojas MJ, Manrich A, Baptista-Neto A, Tardioli PW, Giordano RC, Fernandez-Lafuente R, Guisan JM. Immobilization and stabilization of an endoxylanase from *Bacillus subtilis* (XynA) for xylooligosaccharides (XOS) production. *Catal Today.* 2016; 259:130–139. doi:10.1016/j.cattod.2015.05.032 <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0920586115003582>
42. Amorim, C., Silvério, S. C., Silva, S. P., Coelho, E., Coimbra, M. A., Prather, K. L. J., & Rodrigues, L. R. Single-step production of arabino-xylooligosaccharides by recombinant *Bacillus subtilis* 3610 cultivated in brewers' spent grain. *Carbohydrate Polymers.* 2018; 199, 546–554. doi:10.1016/j.carbpol.2018.07.017 <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0144861718308087>
43. Wan Azelee, N. I., Jahim, J. M., Ismail, A. F., Fuzi, S. F. Z. M., Rahman, R. A., & Md Illias, R. High xylooligosaccharides (XOS) production from pretreated kenaf stem by enzyme mixture hydrolysis. *Industrial Crops and Products.* 2016; 81, 11–19. doi:10.1016/j.indcrop.2015.11.038 <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0926669015305379>
44. Zhou M, Fan G, Xia H, Zhang X, Teng C, Li X. Ultrasound-Assisted Production of Xylo-Oligosaccharides From Alkali-Solubilized Corncob Bran Using *Penicillium janthinellum* XAF01 Acidic Xylanase. *Front Bioeng*

- Biotechnol. 2021; 9:755003. doi: 10.3389/fbioe.2021.755003
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34568305/>
45. Jian HL, Zhu LW, Zhang WM, Sun DF, Jiang JX. Enzymatic production and characterization of manno-oligosaccharides from *Gleditsia sinensis* galactomannan gum. *Int J Biol Macromol.* 2013; 55: 282–288. doi:10.1016/j.ijbiomac.2013.01.025
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23357797/>
46. Zhang H, Sang Q. Production and extraction optimization of xylanase and β -mannanase by *Penicillium chryogenum* QML-2 and primary application in saccharification of corn cob. *Biochem Eng J.* 2015; 97:101–110. doi:10.1016/j.bej.2015.02.014
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1369703X15000480>
47. Chauhan PS, Sharma P, Puri N, Gupta N. Purification and characterization of an α -alkali-thermostable β -mannanase from *Bacillus nealsonii* PN-11 and its application in manno-oligosaccharides preparation having prebiotic potential. *Eur Food Res Technol.* 2014; 238:927–936. doi:10.1007/s00217-014-2170-7
<https://www.scienceopen.com/document?vid=6aa0fad3-b09d-4a0c-925f-0d3e0fe67f2d>
48. На жаль, ніяк не змогла знайти інформацію про статтю. Залишаю посилання: <https://iprop-ua.com/inv/pdf/ry9rtfhh-description.pdf>
49. Штам *Williopsis californica*-продуцент В-маннази: пат.119522 Україна: С12N 9/00/ Н.В. Борзова.-№ у 2017 03849; заявл. 19.04.2017; опубл. 25.09.2017, Бюл. № 18 - 5 с. <file:///C:/Users/User/Downloads/119522-uaopatents.com.pdf>
50. Штам *Bifidobacterium bifidum*, композиція, що містить галактоолігосахариди, її застосування та спосіб виробництва речовини для стимулювання росту біфідобактерій: пат.83027 Україна: С12N 1/20 / Я.В. Слупінські, Г. Цоріс, Г. Гленн, У.Е. Грехем.- № у 2008/ опубл. 10.06.2008,

51. Журлова О.Д., Капрельянц Л.В. Отримання природних ксилоолігосахаридів-пребіотиків із вторинних продуктів переробки зерна. Біологія рослин та біотехнологія. К.: НАУ, 2017- 79 с. https://card-file.onaft.edu.ua/jspui/bitstream/123456789/11726/1/Biologiya_roslyn_17_Zhurlova.pdf
52. Озоліна С. Отримання продуктів обмеженого ферментативного гідролізу геміцелюлоз початків кукурудзи. Стан і перспективи харчової науки та промисловості. 2015: 128. http://elartu.tntu.edu.ua/bitstream/123456789/6483/2/FSI_2015_Osolina_S-Obtaining_of_the_products_of_128.pdf
53. Борозова Н.В. Варбанець Л.Д. Скринінг продуцентів манан-деградуючих ензимів. Мікробіол.журн. 2016, Т. 78, № 5: 21-29. https://www.researchgate.net/profile/Natalia-Borzova/publication/315046671_Screening_of_Mannane-Degrading_Enzymes_Producers/links/58d4dd10458515337850be42/Screening-of-Mannane-Degrading-Enzymes-Producers.pdf?origin=publication_detail
54. Граніна А.К. Дехтяренко Н.В. Перспективи ферменту В-фруктофуранозідази. Матеріали X Всеукраїнської науково-практичної конференції «Біотехнологія XXI століття» 2016, 30. https://dspace.nau.edu.ua/bitstream/NAU/27387/1/%D0%91%D1%96%D0%B E%D1%82%D0%B5%D1%85%D0%BD%D0%BE%D0%BB%D0%BE%D0 %B3%D1%96%D1%8F_%D0%A5%D0%A5%D0%86_2016.pdf#page=30.
55. Малькова М.Г., Безусов А.Т. Технологія виробництва галактуронових олігосахаридів із пектинової сировини. Харч.наук. і техн. 2010 №1 (10): 51-61. http://www.irbis-nbuv.gov.ua/cgi-bin/irbis_nbuv/cgiirbis_64.exe?C21COM=2&I21DBN=UJRN&P21DBN=UJRN&IMAGE_FILE_DOWNLOAD=1&Image_file_name=PDF/Khnit_2010_1_1

[9.pdf](#)

56. Мінорова А. В., Даниленко С.Г., Рудакова Т. В. Біотехнологічні аспекти застосування штамів з β -галактозидазною активністю у виробництві ферментованих молочних продуктів. *Продовольчі ресурси*. 2021 Т.9 № 16: 117-134. <http://rep.btsau.edu.ua/handle/BNAU/6515>
57. Капрельянц Л. В. Пребиотики: химия, технология, применение [Текст] : монография / Капрельянц Леонид Викторович. - Киев : ЭнтерПринт, 2015. - 252 с. : табл., рис. - ISBN 978-966-7857-30 <https://card-file.onaft.edu.ua/bitstream/123456789/2159/1/Kaprelyants.pdf>
58. Хлынов И.Б., Хлынова Р.И., Воронова Е.И., Гаранина Е.В., Гурикова И.А., Кобзарь Т.И., Лосева М.Э., Одинец С.В., Рябинина О.А., Сагутдинова Л.Т., Фрезе Е.Б. Эффективность и безопасность *Lactobacillus paracasei* CNCM I-1572 и фруктоолигосахаридов в лечении больных СРК с запором. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2021;1(6):57-62. <https://doi.org/10.31146/1682-8658-ecg-190-6-57-62>
59. V. De Preter, H.M. Hamer, K. Windey, K. Verbeke,;1; The impact of pre and/or probiotics on human colonic metabolism: Does it affect human health?, *Mol. Nutr. Food. Res.* 55 (2011) 46–5.
60. N.D. Gregory Kelly,;1; Inulin-Type Prebiotics: A Review (Part 2), *Alternative Medicine Review* 14 (2009) 36-55
61. Global Industry Analysts, Inc., *Prebiotics – A global strategic business report*. <http://www.strategyr.com/pressMCP-6079.asp>, 2014 (accessed: 2016/03/16).
62. Kumar, Chityal Ganesh, Sarada Sripada, and Yedla Poornachandra. "Status and future prospects of fructooligosaccharides as nutraceuticals." *Role of materials science in food bioengineering*. Academic Press, 2018. 451-503.
63. Радченко О.М. Сучасні підходи до діагностики та лікування запальних хвороб товстої кишки в практиці лікаря загальної практики. *Гастроентерологія*. 2021. №8 (501), 54-57. https://health-ua.com/multimedia/userfiles/files/2021/ZU_8_2021/ZU_08_2021_st54-57.pdf

64. <https://empendium.com/ua/chapter/B27.II.4.17> Empendium. Хвороба Крона.
65. [https://likicontrol.com.ua/%D1%96%D0%BD%D1%81%D1%82%D1%80%D1%83%D0%BA%D1%86%D1%96%D1%8F/?\[21934\]](https://likicontrol.com.ua/%D1%96%D0%BD%D1%81%D1%82%D1%80%D1%83%D0%BA%D1%86%D1%96%D1%8F/?[21934]) Інструкція для медичного застосування лікарського засобу Метронідазол.
66. <http://oolc.od.ua/%D0%B2%D1%81%D0%B5%D1%81%D0%B2%D1%96%D1%82%D0%BD%D1%96%D0%B9-%D0%B4%D0%B5%D0%BD%D1%8C-%D0%B7%D0%B0%D0%BF%D0%B0%D0%BB%D1%8C%D0%BD%D0%B8%D1%85-%D0%B7%D0%B0%D1%85%D0%B2%D0%BE%D1%80%D1%8E%D0%B2%D0%B0/> ДУ «Одеський обласний центр контролю та профілактики хвороб МОЗ України». Всесвітній день запальних захворювань кишечника. 2019.
67. <https://nosorog.ua/ua/zdorove-zhkt/nosorog-fos-200-gramm> NOSOROG F.O.S. 200 грам.
68. <https://proteinukiev.com.ua/ua/p514394704-prebiotik-stark-pharm.html> Пребіотик Stark Pharm-Inulin&FOS (300 грам).
69. <https://biotus.ua/ua/fruktooligosaharidy-nutra-flora-fos-now-foods-chistyj-poroshok-113-g.html> Фруктоолігосахариди, Nutra Flora FOS, Now Foods, чистий порошок, 113 г.
70. <https://sayyes.com.ua/ua/probiotiki/16764-poroshok-fos-200-g.html> Фруктоолігосахариди (FOS), Source Naturals, (200 г), 16764.
71. Мурзин І. Ринок пребіотиків. Бізнес харчових інгредієнтів online. Аналітичні огляди. 2011 р. <http://www.bfi-online.ru/index.html?kk=e834d9118a&msg=2226>
72. Kumar, C. G., Sripatha, S., & Poornachandra, Y. (2018). Status and Future Prospects of Fructooligosaccharides as Nutraceuticals. *Role of Materials Science in Food Bioengineering*, 451–503. doi:10.1016/b978-0-12-811448-3.00014-0

73. Черепанський В.В., Грегірчак Н.М. Особливості технологічного процесу виробництва пробіотичного препарату на основі лактобацил. *Scientific Works of NUFT* 2020, 26 (3): 45-59.
74. Настанова СТ-Н МОЗУ 42-4.0:2016 Лікарські засоби. Належна виробнича практика.
75. Основи біотехнології: підручник для студ. освітнього рівня бакалавр спец. «Біологія» / уклад. Н.Ю. Мацай.-Луганськ : Держ. закл. «Луган.нац. ун-т імені Тараса Шевченка».-Луганськ : Вид-во ДЗ «ЛНУ імені Тараса Шевченка», 2011.-153 с.
76. Загальна (промислова) біотехнологія: навчальний посібник/ М.Д. Мельничук, О.Л.Кляченко, В.В.Бородай, Ю.В.Коломієць. – Київ: ФОП Корзун Д.Ю., 2014. - 252 с.
77. Горячий Н.В. Технологии мембранной фильтрации технологических растворов и сред. Отделение биомассы микроорганизмов. *Актуализация* 2014.- 3 с.
78. https://mida.ru/articles/articles_03.php Промышленное технологическое оборудование. Промышленные фильтрующие центрифуги.
79. Методичні вказівки щодо виконання практичних робіт з навчальної дисципліни «Управління якістю та безпека біотехнологічної продукції»/ О.В. Новохатько, О.В. Мазницька.- Кременчук., 2019.- 31 с.
80. https://www.pesticity.ru/pathogens/Aureobasidium_pullulans Aureobasidium pullulans.
81. Rafik, M., Qabli, H., Belhamidi, S., Elhannouni, F., Elkhedmaoui, A., Elmidaoui, A., 2015. Membrane separation in the sugar industry. *J. Chem. Pharm. Res.* 7, 653–658.
82. Kuhn, C.R., Filho, M.F., Silva, V., Palacio, L., Hernández, A., Pradanos, P., 2010. Mass transfer and transport during purification of fructooligosaccharides by nanofiltration. *J. Membr. Sci.* 365, 356–365.

83. Clarisse Nobre , José A. Teixeira & Lígia R. Rodrigues (2013): New trends and technological challenges in the industrial production and purification of fructo-oligosaccharides, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*
84. Caes, B.R., Oosbree, T.R.V., Lu, F., Ralph, J., Maravelias, C.T., Raines, R.T., 2013. Simulated moving bed chromatography: separation and recovery of sugars and ionic liquid from biomass hydrolysates. *ChemSusChem* 6, 2083–2089.
85. <https://www.azom.com/article.aspx?ArticleID=14708> The Theory and Advantages of Simulated Moving Bed (SMB) Chromatography. AZO materials.
86. Технологія лікарських препаратів промислового виробництва. Д.І. Дмитрієвський.- Вінниця: Нова книга, 2008.-280 с.
<https://buklib.net/books/36201/>
87. Технологии и оборудование для сушки растительного сырья [Электронный ресурс]: учеб. пособие / В.Н. Тепляшин, Л.И. Ченцова, В.Н. Невзоров; Краснояр. гос. аграр. ун-т. – Красноярск, 2019. – 173 с.
88. Hongpattarakere T., Uraipan S. Bifidogenic characteristic and protective effect of saba starch on survival of *Lactobacillus plantarum* C1F17AN2 during vacuum-drying and storage. *Carbohydr. Polym.* 2015. Vol. 117. P. 255—261.
89. Пойманов В.В., Ященко С.М., Барыкин Р.А. Исследование процесса вакуум сублимационной сушки бактериальных концентратов для мясной отрасли с использованием криоаморфизации // Вестник Воронежского государственного университета инженерных технологий. - 2016. - № 1. - С. 25-30.
90. Wrzosek, K., Moravcik, J., Antosova, M., Illeova, V., Polakovic, M., 2013. Spray-drying of the mixtures of mono-, di-, and oligosaccharides. *Acta Chim. Slovaca* 6, 177–181
91. <https://ukrshealth.ru/rizne/materiali-dlja-likariv/15634-susharki-v-biotehnologichnoi-promislovosti.html> Сушарки в біотехнологічній

промисловості.

92. Слинко, С. Розробка нової конструкції сушарки з киплячим шаром з метою інтенсифікації процесу сушіння повареної солі / С. Слинко, Є. Бабко // Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у ХХІ столітті : програма і матеріали 80 міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів, 10–11 квітня 2014 р. – Київ : НУХТ, 2014. – Ч. 2. – С. 144–145.
93. <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/1291/magnij-oksid>
Фармацевтична енциклопедія. Магній Оксид.
94. <https://ukrguru.ru/osvita/36262-magnij-oksid-vlastivosti-otrimannja-zastosuvannja.html> Магній оксид: властивості, отримання, застосування
95. Arsenijević, Zorana & Grbavcic, Zeljko & Garic-Grulovic, Radmila. (2002). Drying of solutions and suspensions in the modified spouted bed with draft tube. *Thermal Science - THERM SCI*. 6. 47-70. 10.2298/TSCI0202047A.
96. Карлаш Ю.В., Красінько В.О. Основи проектування біотехнологічних виробництв Електронний ресурс : Навч. посібник. –К.:НУХТ, 2022. –373 с..
97. Das S., Bhattacharjee D., Manna A., Basu S. et al. Effect of different excipients and packaging materials on commercial preparation of probiotic formulation. *IJPSR*. 2014. Vol. 5, N. 5. P. 1830— 1836.
98. 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.
99. <https://budtehnika.pp.ua/729-konstrukciyi-mliniv.html> Конструкції млинів.
100. <http://poradu24.com/remontu/molotkova-drobarka-pristrii-i-klasifikaciya-videooglyad-pobutovogo-podribnyuvacha-dlya-zerna.html> Молоткова дробарка: пристрій і класифікація побутового подрібнювача для зерна.

101. <https://arjes.com.ua/osoblyvosti-zastosuvannia-molotkovo-drobarky/>
Особливості застосування молоткової дробарки.
102. <https://buklib.net/books/36208/> Технологія лікарських препаратів промислового виробництва. Просіювання.
103. Тихонов О.І, Ярних Т.Г. Аптечна технологія ліків. Підручник для студентів визих навчальних закладів. Нова книга, Вінниця, 2019.
<http://nk.in.ua/pdf/1785r.pdf>
104. Що таке лікафрська форма? TABLETKI.UA.
<https://tabletki.ua/uk/content/lekarstvennye-formy/>
105. Тверді лікарські форми. DMUPharm
<http://dmupharm.pp.ua/index.php/temi/13-tverd-i-likarski-formi>
106. Порошок як лікарська форма https://ua-referat.com/%D0%9F%D0%BE%D1%80%D0%BE%D1%88%D0%BE%D0%BA_%D1%8F%D0%BA_%D0%BB%D1%96%D0%BA%D0%B0%D1%80%D1%81%D1%8C%D0%BA%D0%B0_%D1%84%D0%BE%D1%80%D0%BC%D0%B0
107. Загальна рецептура, методичні рекомендації. Задорожна Т.О., Казанюк Т.В. Курс – фармакологія, Кафедра мікробіології, біохімії та фармакології, стоматологічний факультет, 2019.
108. Порошки як лікарська форма. Переваги та недоліки даної лікарської форми. Вимоги ДФ України до порошоків. Удосконалення технології порошоків у аптеці. <http://ua.textreferat.com/referat-15283.html>
109. Steenis, N. D., van Herpen, E., van der Lans, I. A., Ligthart, T. N., & van Trijp, H. C. M. (2017). Consumer response to packaging design: The role of packaging materials and graphics in sustainability perceptions and product evaluations. *Journal of Cleaner Production*, 162, 286–298. doi:10.1016/j.jclepro.2017.06.036 10.1016/j.jclepro.2017.06.036
110. Гридасов В.І., Винник О.В., Оридорога Л.М. Фармацевтичне товарознавство. Харків, 2002. 171 с.

111. Дем'яненко В.Г., Афанасьєва В.А., Проскочило А.В., Бреусова С.В. Медичне та фармацевтичне товарознавство. К.: ВСВ – Медицина, 2010. 296 с.
112. Сучасні види упаковки готових лікарських засобів. Ямнюк О.К., Гуреєва С.М. Сучасні матеріали і технології виробництва виробів широкого вжитку та спеціального призначення. Промислова фармація 521-523 с.
113. Рецептūra та обробка для порошкових пакетиків <https://pubs.rsc.org/en/content/chapter/bk9781839161759-00321/978-1-83916-175-9>
114. Обґрунтування вибору допоміжних речовин у разі розроблення складу саше з протизапальними властивостями. Тригубчак О.В., Юр'єва О.О., Гой А.М. Фармацевтична технологія. Фармацевтичний журнал, 2017, № 5-6.
115. Gerald G., Ключєва Н. Маннітол – многогранный эксципиент для производства твердых лекарственных форм // Фармац. отрасль. – 2015. – № 5 (52). – С. 50–51.
116. Пакет саше <https://elo-pack.net/paket-sashe.html>
117. Рубанка А.І, Омельченко Г.В., Приходько-Кононенко І.О. Дизайн пакувальної продукції для виробів різного призначення. https://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:Xgq7MvAZzsoJ:https://er.knutd.edu.ua/bitstream/123456789/19969/1/GDIVP_mono_2022_P129-148.pdf&cd=1&hl=uk&ct=clnk&gl=ua
118. Упаковка типу «саше». NutriDeM <https://nutridem.com.ua/upakovka-tipu-sashe>
119. Фасування. Фармацевтична енциклопедія. <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/340/fasuvannya>

120. Черепанський В.В., Грегірчак Н.М. Особливості технологічного процесу виробництва пробіотичного препарату на основі лактобацил. Наукові праці НУХТ 2020. Том 26, №3, 45-59.
121. Guergoletto K., Sivieri K., Tsuruda A., et al. Food Industrial Processes — Methods and Equipment. Dried Probiotics for use in functional food applications. Benjamin Valdez (ed.), InTech, Shanghai, China. 2012. P. 227—235.
122. Пакувальний матеріал для саше і стіків без шкоди для навколишнього середовища. Фармацевтична галузь, квітень №2 (85) 2021.
123. Роз'яснення щодо маркування лікарських засобів. https://zakononline.com.ua/documents/show/143302__143302
124. Вторинна упаковка таблеток-опис і особливості. <https://balenko.com/vtorynna-upakovka-tabletok-opys-i-osoblyvosti/>
125. Бурліцька О., Піняк І. Вторинна упаковка як інструмент мерчендайзингу. Економічно ефективна торгівля: розуміння суті та сучасні підходи до її ведення. 115-116.
126. Лук'янець Т. У. Маркетингова політика комунікацій: Навч. посібник. К.: КНСЕУ, 2000. 380 с.
127. Шендерівська Л.П., Савенок Д.А. Тенденції розвитку ринку упаковки України. Науковий вісник Міжнародного гуманітарного університету. 97-101.
128. Огляд українського ринку пакувальних матеріалів. <http://bizrating.com.ua/56/articles/544/index.html>.
129. Кривошей В.М. Ринок, споживач, упаковка (зміни, уподобання, застереження) / В.М. Кривошей // Упаковка. – 2013. – № 4. – С. 27–31.
130. Synthesis Theta Рецепт високої ефективності від компанії Universal Pack s.r.l. Фармацевтична галузь, жовтень, №5 (82), 34-35, 2020.
131. Поводзинський В.М. Основи проектування: Конспект лекцій для студ. спец. 6.092900 “Промислова біотехнологія” та 6.092902 “Біотехнологія

- біологічно активних речовин”, напряму 0929 “Біотехнологія” ден. форми навч. – К.: НУХТ, 2005. – ... с.
132. <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/3558/klasifikaciya-virobnichix-primishhen> Фармацевтична енциклопедія. Класифікація виробничих приміщень.
133. Чорний М. В. Система підготовки повітря для медичних та фармацевтичних підприємств. Вінницький національний технічний університет. 2018.
134. 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.
135. <https://filters.ru/catalog/karmannye-vozdushnye-filtry/filtr-vozdushnyy-karmanny-gruboy-ochistki-s-filtrovalnym-materialom-iz-poliestra-fvk/> Фильтр воздушный карманный-ФВК- грубой очистки с фильтровальным материалом из полиэстра.
136. http://www.luxfilter.ru/bagfilter_F5_F6_F7_F8.html Фильтры, фильтрующий материал для вентиляции.
137. СТ-Н МОЗУ 42-3.7:2013 Лікарські засоби. Якість води для застосування у фармації.
138. EudraLex. — The Rules Governing Medicinal Products in the European Union. — Volume 4. EU Guidelines to Good Manufacturing Practice Medicinal Products for Human and Veterinary Use.
139. Настанова СТ-Н МОЗУ 42-4.0:2011. — Лікарські засоби. Належна виробнича практика / М. Ляпунов, О. Безугла, О. Соловйов та ін. — Київ, МОЗ України, 2011.
140. <https://www.eurowater.com/ua/%D1%83%D1%81%D1%82%D0%B0%D0%BD%D0%BE%D0%B2%D0%BA%D0%B8->

[%D0%B2%D0%BE%D0%B4%D0%BE%D0%BF%D1%96%D0%B4%D0%B3%D0%BE%D1%82%D0%BE%D0%B2%D0%BA%D0%B8/%D1%83%D1%81%D1%82%D0%B0%D0%BD%D0%BE%D0%B2%D0%BA%D0%B8-%D0%B7%D0%BC%D0%BE%D0%BD%D1%82%D0%BE%D0%B2%D0%B0%D0%BD%D1%96-%D0%BD%D0%B0-%D1%80%D0%B0%D0%BC%D1%96](#) Eurowater. Установки

водопідготовки змонтовані на рамі – готові до роботи

141. Настанова-СТ-Н-МОЗУ-42-4.0_2020 https://www.dls.gov.ua/wp-content/uploads/2020/05/%D0%9D%D0%B0%D1%81%D1%82%D0%B0%D0%BD%D0%BE%D0%B2%D0%B0-%D0%A1%D0%A2-%D0%9D-%D0%9C%D0%9E%D0%97%D0%A3-42-4.0_2020.pdf
142. https://www.youtube.com/watch?v=vR_MvDZ8qVE&list=RDMMvR_MvDZ8qVE&start_radio=1 Використання профхімії на підприємствах відповідно до стандарту ХАССП.
143. <https://zakon.rada.gov.ua/rada/show/v0502282-01#Text> Наказ Про затвердження методичних рекомендацій щодо виконання санітарно-гігієнічних вимог та проведення мікробіологічного контролю у виробництві нестерильних лікарських засобів.
144. https://dezplus.com.ua/catalogue/disinfection/pre-sterilized-cleansing/pre-sterilized-cleansing_48.html Дезинфіцирующие средства и изделия медицинского назначения Биомой.
145. <https://lavernamarket.com.ua/ua/p895538-mikrobak-forte-dezinfektsiya.html> Мікробак Форте 5 л - дезінфекція та очищення поверхонь, інструментів
146. <https://moz.gov.ua/uploads/ckeditor/%D0%92%D1%96%D0%B4%D0%BA%D1%80%D0%B8%D1%82%D1%96%20%D0%B4%D0%B0%D0%BD%D1%96/2021/05/13/2021-%D1%80%D0%B5%D1%94%D1%81%D1%82%D1%80%20%D0%B4%D0%B5%D0%B7%D0%B7%D0%B0%D1%81%D0%BE%D0%B1%D1%96%D0%B2%201-201.pdf> Державний реєстр дезінфекційних засобів 2021 рік.

147. <https://www.nutexim.com/obladnannya/vitoksyid-nitro/> Дезінфікуючий Засіб Для Знезараження Обладнання.
148. http://hemos.zp.ua/p_nukp.html ХЕМОС.
149. <http://www.cnhepa.com/cardboard-separator-hepa-filter-p53.html> Повітрозабірник airer deltafan.
150. <https://ventbazar.ua/tsentrobezchnyi-ventilyator-vents-vtsun-225kh103-22-2-pr.html> VENTBAZAR. Центробежний вентилятор ВЕНТС ВЦУН 225x103-2,2-2 ПР.
151. http://paskal.ua/ua/product/teploobmenik-whe-2040_171.html PASKAL. Теплообмінник WHE 2040.
152. https://www.galactic.kiev.ua/pages/painting_cameras_equipment/air_heating_system.php Galactic manufacturing company. Система підігріву повітря.
153. <https://perryvidex.eu/product/8000-ltr-fv-6-bar-int-fv-6-bar-jkt-n0-agit-10710-02> Реактор-змішувач E8000. PFAUDLER.
154. <https://asvik.kiev.ua/ua/catalog/group/product/28> Дозатор ваговий ДВП-3. Асвік Центр.
155. <https://megawatt.dn.ua/ua/p257257990-tsentrobezchnyj-nasos-jex.html> Насос відцентровий JEX 750 "Насоси+".
156. <https://comquima.com/en/equipo-industrial/reactors/used-800-l-stainless-steel-reactor-with-agitation-and-half-coil-jacket> Збірник об'ємом 800 л. COMQUIMA.
157. <http://snpo.ua/ru/produkts/tsentrifugi/tsentrifugi-osaditelnye-filtruyushhie-i-kombinirovannye-so-shnekovoj-vygruzkoj-osadka/>. Центрифуга ОГШ-202К-03.
158. <https://stprom.com.ua/ua/p1015320368-embkost-nerzhaveyuschej-stali.html> Збірник об'ємом 700 л. STS-Стройторгсервіс.
159. <https://www.oborud.info/product/jump.php?34352&c=578> Реактор з мішалкою об'ємом 700 л.
160. https://traxxys.com/wp-content/uploads/2017/04/Spring_Session_2017_Designing_Industrial_Chromatogr

- [aphic Processes Floor Boon TNO.pdf](#) Хроматограф з імітованим рухомих шаром.
161. file:///C:/Users/User/Downloads/broch_Flowrox_Pump_ukr.pdf Насос перистальтичний. Техприлад.
162. <https://www.chinacanaan.com/fluid-bed/fg-series-fluid-bed-dryer.html>
Сушарка з киплячим шаром серії FG
163. https://chemtest.com.ua/ua/drobilka_valkovaya_vibrotekhnik_dvg_200
Дробарка валкова вібротехнік ДВГ 200x125-6411-00037. Хімтест Україна.
164. <https://alyans-km.com.ua/kupit-krugloe-vibrosito-mx-vibracionnoe-sito-dlya-proizvodstva-v-ukraine> Кругле вібросито МХ для виробництва в Україні.
Альянс-КМ.
165. <https://www.universalpack.it/en/packaging-machines/pharmaceutical-packaging-line-primary-secondary-packaging-machine-sachets-stick-pack/>
Universal Pack. Synthesis Theta.
166. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». — 2-е вид. — Доповнення 1. — Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2016. — 360 с. ISBN 978-966-97390-2-5
167. Пребіотик для мікрофлори кишечника Stark Pharm - Stark Inulin & FOS Mega tabs (180 таблеток) (инулін, фруктоолігосахариди)
<https://proteinukiev.com/uk/prebiotik-dlya-mikroflory-kishechnika-stark-pharm-inulin-fos-180-tabletok-inulin-3478.html>

ДОДАТКИ

Додаток 1

Апробація роботи

Статті у журналах

- *Максимець О.О., Грегірчак Н.М.* Обґрунтування форми виуску лікарського засобу на основі фруктоолігосахаридів // Сучасні досягнення фармацевтичної справи: збірник наукових праць, випуск 1.-X.: Вид-во НФаУ, 2022. – С. 260- 265. Сертифікат <https://drive.google.com/file/d/1-VX1C9J8RNYJ9SK2tvidGUZh9416EWtE/view>
- *Максимець О.О., Грегірчак Н.М.* Вибір способів виділення фруктоолігосахаридів для використання їх як пребіотиків // III Всеукраїнська студентська науково-практична конференція «Хімія і технології: теоретичні та практичні аспекти» (м. Житомир, 27 квітня 2023р.). (подана до друку).

Тези у збірниках міжнародних конференцій в Україні

- *Грегірчак Н.М. Максимець О.О.* Перспекиви біотехнологічного отримання пребіотиків // Proceedings of the IV International Conference on European Dimensions of Sustainable Development, Oct 20-21, 2022. – Kyiv: NUFT, 2022. С. 107. <http://dspace.nuft.edu.ua/jspui/bitstream/123456789/38625/1/%D0%97%D0%B1%D1%96%D1%80%D0%BD%D0%B8%D0%BA%20%D1%82%D0%B5%D0%B7%20IV%20Conf%202022.pdf>
- *Максимець О.О., Грегірчак Н.М.* Біотехнологія фруктоолігосахаридів // Матеріали 88 Міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді- вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті» квітень-травень 2022 р. – Київ: НУХТ.- Ч.1.- С. 316. <http://conferencenuft.ho.ua/Books%20of%20abstracts/2022/Part%201.pdf>
- *Максимець О.О., Грегірчак Н.М.* Мікробні олігосахариди як пребіотики // Матеріали II Міжнародної науково-практичної Інтернет-конференції «Проблеми та досягнення сучасної біотехнології» (м.Харків, 20 травня 2022


<https://drive.google.com/file/d/1MqRTjPa06W5OXVkrvP1UyWr7D0T6bKoY/view>

Тези у збірниках Всеукраїнських конференцій:

- *Максимець О.О., Грегірчак Н.М.* Біотехнологія мікробних фруктоолігосахаридів та їх застосування в якості пребіотиків // Матеріали XVI Всеукраїнської науково-практичної конференції студентів, аспірантів і молодих вчених «Біотехнологія ХХІ століття» (м.Київ, 3 червня 2022 р.) – С. 72-73. <http://conf.biotech.kpi.ua/article/view/258581>

Article

Fermentative Production of Fructo-Oligosaccharides Using *Aureobasidium pullulans*: Effect of Dissolved Oxygen Concentration and Fermentation Mode

Xinqun Liang ^{1,2}, Chenglin Li ^{1,2}, Weifeng Cao ^{2,3,*} , Weilei Cao ^{2,3}, Fei Shen ^{2,3} and Yinhua Wan ^{2,3}

¹ Department of Sugar Engineering, College of Light Industry and Food Engineering, Guangxi University, Nanning 530004, China; lixq1071340163.com (X.L.); a860835337@gmail.com (C.L.)

² State Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China; wcao@foxmol.com (W.C.); fshen@ipe.ac.cn (F.S.); yhw@ipe.ac.cn (Y.W.)

³ School of Chemical Engineering, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

* Correspondence: wcao@ipe.ac.cn; Tel./Fax: +86-10-62650673

Abstract: Fructo-oligosaccharides (FOS) are prebiotics with numerous health benefits. So far, the dissolved oxygen (DO) concentration control strategy for fermentative production of FOS is still unknown. In order to improve FOS production, the effects of DO concentration and fermentation mode on FOS using *Aureobasidium pullulans* were investigated in this study. The greatest FOS production (123.2 ± 6.2 g/L), with a yield of $61.6\% \pm 3.0\%$ (g FOS/g sucrose), was obtained in batch culture under high DO concentration. Furthermore, repeated-batch culture revealed that enzyme production and FOS production were not closely associated with cell growth. By keeping the DO concentration above 5% in the repeated-batch culture, a maximum FOS concentration of 548.3 ± 37.4 g/L and yield of $68.6\% \pm 2.6\%$ (g FOS/g sucrose) were obtained, which were 3.45% and 11.4% times higher than those obtained in the batch culture without DO control, respectively. Additionally, the ratios of 1-fructofuranosyl nystose (GF4) and 1,1,1-kestohehexose (GF5) were 33.8% and 23.2%, respectively, in the product of repeated-batch culture, but these compounds were not detected in batch culture. Thus, it can be concluded that the DO concentration affects not only the yield of FOS but also the composition of FOS with different degrees of polymerization, which is the key factor in the fermentative production of FOS with a high polymerization degree.

Keywords: fructo-oligosaccharides; dissolved oxygen concentration; repeated-batch culture; *Aureobasidium pullulans*



Citation: Liang, X.; Li, C.; Cao, W.; Cao, W.; Shen, F.; Wan, Y. Fermentative Production of Fructo-Oligosaccharides Using *Aureobasidium pullulans*: Effect of Dissolved Oxygen Concentration and Fermentation Mode. *Molecules* **2021**, *26*, 3867. <https://doi.org/10.3390/molecules26133867>

Academic Editor: Yasuhiro Ozeki

Received: 26 May 2021

Accepted: 22 June 2021

Published: 24 June 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Fructo-oligosaccharides (FOS), such as 1-kestose (GF2), nystose (GF3), 1-fructofuranosyl nystose (GF4) and 1,1,1,1-kestohehexose (GF5), are small dietary fibers with low caloric value and high prebiotic effects [1–4]. In addition to being calorie-free and non-carcinogenic sweeteners, FOS have superior functional properties such as modulation of colonic microflora, improvement of the gastrointestinal physiology and immune functions, bioavailability of minerals, metabolism of lipids and prevention of colonic carcinogenesis [4,5]. Currently, FOS are being considered as natural food ingredients in most countries because of their multiple benefits for human and animal health.

FOS are biosynthetically produced using a one- or two-stage process. In the two-stage process, the enzyme with transfructosylation activity is first produced from fungi, such as *Aureobasidium* spp. [6–9], *Aspergillus* spp. [10,11], *Bacillus subtilis* [12] and *Penicillium* spp. [13]. The FOS are then produced under controlled conditions with the extracted enzymes using sucrose as the substrate [14–16]. During the one-stage process, FOS are biosynthesized from fungi in bioreactors using either immobilized or free whole cells as biocatalysts [4,6,17–19]. The fermentative production of FOS using the one-stage process is advantageous when compared with the two-stage process because the step of purification

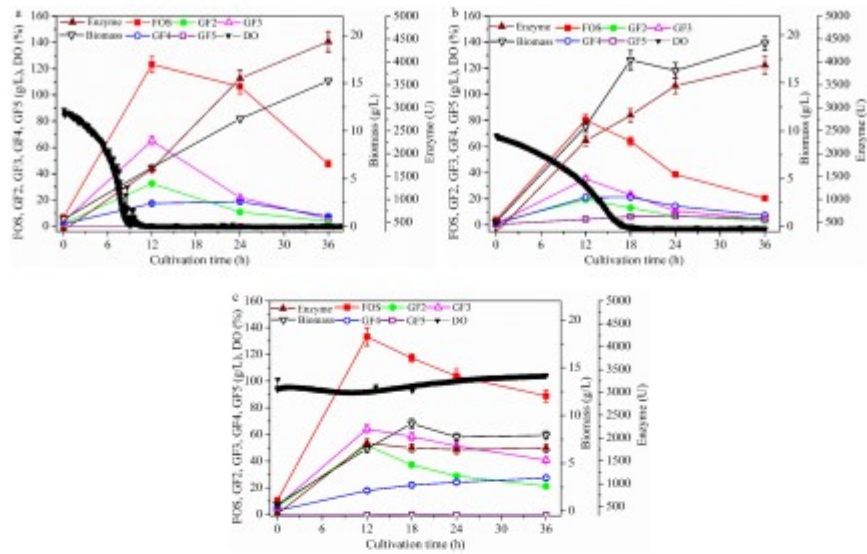


Figure 5. Time profiles of the batch cultivation at fermentation temperatures of 25 °C (a), 30 °C (b), and 35 °C (c). The *A. pullulans* ipe-3 strain was cultivated in a 2.7 L bioreactor at pH 5.5, aeration rate 1.8 L/min, and a stirring speed of 600 rpm with different fermenter pressures. The working volume was 1.8 L. Data are given as the mean \pm SD, $n = 2$.

2.2. Effect of Fermentation Mode on FOS Production

2.2.1. FOS Production in a Repeated-Batch Culture with 500 mL Broth Discharged Each Time

To explore the substrate (i.e., sucrose) on FOS production under DO control conditions, the repeated-batch culture was implemented (Figure 6a) under the same culture conditions as those shown in Figure 1 with 500 mL broth discharged each time. The FOS production steadily increased until 60 h, at which time the maximum FOS (508.8 ± 24.5 g/L) with a yield of $63.6\% \pm 3.1\%$ was obtained. During this repeated-batch culture, GF5 appeared and its concentration increased steadily until the end of fermentation (72 h), when the ratio of GF5 in the FOS was 29.0%. No GF5 was detected in the batch culture. The ratios of GF2 and GF3 in FOS decreased steadily after culturing for 12 h. The ratio of GF4 in FOS increased obviously during the first 24 h, after which it remained almost constant. The DO value was then allowed to automatically drop to 5%, after which it was controlled constantly by manually adjusting the partial pressure of the bioreactor and automatically adjusting the stirring speed using a proportion integral differential (PID) controller. Another repeated-batch culture was conducted under these conditions (Figure 6b) to detect the effect of high DO value (i.e., above 5%) on FOS production. **The maximum FOS concentration at 60 h was 548.3 ± 37.4 g/L**, which was 7.2% higher than that seen in Figure 6a. Additionally, the ratios of GF4 and GF5 were 33.8% and 23.2%, respectively, in the product, which were not very different from those observed Figure 6a. Compared with the values in Figure 6a, the maximum FOS concentration (i.e., 548.3 ± 37.4 g/L) and yield of $68.6\% \pm 2.6\%$ (g FOS/g sucrose) in Figure 6b were obtained at 60 h, which were 3.45% and 11.4% times higher, respectively. A new repeated-batch culture was then conducted under the same conditions as those shown in Figure 1 before 12 h, after which the aeration was stopped (Figure 6c) to further detect the effect of low DO on FOS production. The maximum FOS concentration (479.6 ± 24.0 g/L) at 60 h was 5.7% lower than that shown in Figure 6a. Additionally, as shown in Figure 6c, the FOS predominantly comprised GF2 and GF3, and the ratio of GF5

creasing when the reaction temperature went beyond 35 °C. The activity of the extracellular enzyme increased until the temperature reached 45 °C, above which it decreased. These observations explain why the FOS production was higher in Figure 6a than in Figure 7a. Specifically, since the substrate (i.e., sucrose) in Figures 6a and 7a was adequate, the enzyme activity (5477.0 ± 265.3 U) was higher in Figure 6a than that (4277.0 ± 174.5 U) in Figure 7a. Comparison of the results shown in Figure 5a,c revealed that the cell concentration was lower in Figure 5c, which resulted in more substrate (i.e., sucrose) facilitating FOS biosynthesis. When the substrate concentration was high, the results would be similar to those shown in Figure 8a (i.e., the process in Figure 5). Thus, it may be concluded that the fed-batch culture was suitable for FOS production, especially for the production of FOS with a high polymerization degree. In fact, FOS production has been conducted successfully by Schorsch et al. [18]. Furthermore, it was speculated that the cells were damaged in the membrane system, which resulted in the low FOS production. The next section discusses what happens when the cell activity was maintained in a repeated batch culture and the substrate (i.e., sucrose) was in excess.

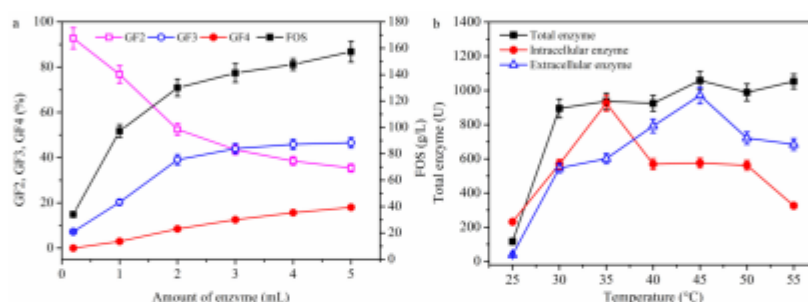


Figure 8. Effect of (a) adding enzyme and (b) temperature on FOS production. Enzyme indicates the fermentation broth that was used as the crude enzyme. The conditions were the same as in the enzyme activity measurement experiment but the amount of broth added was varied in (a), while the temperature was varied in (b). Data are given as the mean \pm SD, $n = 3$.

2.2.3. FOS Production in a Repeated-Culture with 1.6 L Broth Discharged Each Time

β -Fructofuranosidase production was found to be successfully achieved by repeated batch fermentation with immobilized *Aspergillus japonicus* [24]. In addition, a high concentration of the target product was also achieved from biosynthesis using *A. pullulans* with repeated batch culture [36]. Thus, FOS production was conducted using repeated batch culture to determine whether FOS could be effectively biosynthesized from growing cells through direct fermentation production. As shown in Figure 9, a constant concentration (110 g/L) of new FOS was produced in every cycle after culturing for 12 h, but the new increase in cell concentration decreased with increasing cycles. After three cycles, a small increase in new cells was detected. However, in the 5th cycle, no fresh medium was added in the broth after culturing for 12 h, and the test was not stopped to further detect the FOS variation. It was found that after culturing for 12 h, the cells grew fast but FOS decreased faster, indicating that FOS production was not closely associated with cell growth. Therefore, for FOS production using the one-stage process, it was better to control the cell growth to decrease the FOS yield from sucrose. Taken together, under the optimal fermentation condition with the DO concentration being no less than 5% in the repeated-batch culture, maximum FOS concentration of 548.3 ± 37.4 g/L, yield of $68.6\% \pm 2.6\%$ (g FOS/g sucrose), and productivity of 9.13 ± 0.36 g \cdot L $^{-1}$ \cdot h $^{-1}$ were obtained in the repeated-batch culture. Compared with the results reported by Dominguez et al. [3] for *A. pullulans* fermentation using a one-stage process in batch culture, the FOS concentration, yield, and productivity were 4.3 times, 7.2%, and 1.55 times higher, respectively. Compared with the results

3.2. Microorganism

Aureobasidium pullulans ipe-3 (accession number KY618121) was used in this study. The organism was stored at the State Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing, China. The strain was maintained on Czapek Dux agar slants (Beijing Aoboxing Bio-tech Co., Ltd., Beijing, China) at 4 °C.

3.3. Culture Medium

The compositions (g/L in deionized water) of the seed and fermentation media were as follows: sucrose 200, yeast extract 10, NaNO₃ 5, KH₂PO₄ 4, KCl 0.5, FeSO₄·7H₂O 0.01, K₂SO₄ 0.35 and MgSO₄·7H₂O 0.5.

3.4. Culture Method

In all of the fermentation experiments, the seed culture of the ipe-3 strain was prepared by inoculating a loop full of mycelia from 5-day-old cells into 500-mL Erlenmeyer flasks containing 100 mL seed medium and then incubating at 25 °C for 2 days in a rotary shaker (HYG-A, Taicang Experimental Equipment Factory, Taicang, China) at 150 rpm. The seeds prepared for the bioreactor were cultured in four 500 mL Erlenmeyer flasks each time. After culturing and mixing, the seed culture broth (200 mL) was transferred into a 2.7 L bioreactor (BioFio[®] 110, New Brunswick Scientific, San Francisco, USA) containing 1.6 L of medium. The compositions (g/L) of the 1.6-L media were as follows: sucrose 225, yeast extract 11.25, NaNO₃ 5.625, KH₂PO₄ 4.5, KCl 0.5625, FeSO₄·7H₂O 0.01125, K₂SO₄ 0.39375, and MgSO₄·7H₂O 0.5625 in deionized water. The pH of the medium was maintained at 5.5 by the automatic addition of 2 M NaOH or 1 M H₂SO₄. The DO concentration was detected using an on-line DO probe (P52201018, S8238050, Mettler Toledo, Zurich, Switzerland) and the DO electrode was calibrated according to the procedure described by Cao et al. [21] (Supplementary Information). The pO₂ in the saturated sodium sulfite solution was calibrated as zero, while the maximum O₂ saturation value in the sterilized broth before inoculation under 10 L/min at a stirring speed of 1000 rpm was calibrated as 100% of the DO probe.

3.5. Analytical Methods

The culture broth (3 mL) was centrifuged using a high-speed centrifuge (4–16 K, Sigma, Osterode am Harz, Germany) at 10,000 g for 10 min, and the resulting supernatants were used to determine the concentrations of FOS, sucrose, fructose and glucose. The FOS were purchased from Shanghai Acme Biochemical Co. Ltd., Shanghai, China. Sucrose, fructose and glucose were purchased from Sinopharm Chemical Reagent Co., Ltd., Beijing, China. To measure the biomass, cells were washed three times with 6 mL distilled water and then dried to constant weight at 90 °C. The concentrations of the sugars were obtained using a high-performance liquid chromatography (HPLC) apparatus (LC-20AT, Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with an refractive index (RI)-detector using the Asahipak NH2P-50 4E column (Shodex, Tokyo, Japan). The column temperature was set to 30 °C, and a mixture of acetonitrile/distilled water (7:3, v/v) was applied as the mobile phase at a flow rate of 1 mL/min. The enzyme activity was measured as described by Shin et al. [29] (refer to the Supplementary Information for the details describing the enzyme assay). Statistical analysis of the different experimental groups was conducted by subjecting the experimental data to one-way analysis of variance (ANOVA) using the OriginPro 2018 software (Origin Lab Corporation, Northampton, MA, USA) at a 95% confidence level. The data presented in Figures 1–9 are the average values with error bars.

The FOS yield (Y_{FOS}), specific FOS production (FOS/biomass) (Y_{FOS}), specific activity of fructosyltransferase (fructosyltransferase activity/biomass) (Y_{rFOS}), and FOS productivity are expressed as follows:

$$v = \text{final FOS concentration}$$