

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)

« » лютого 2022 р.

«До захисту допущено»

Завідувач кафедри

Віктор СТАБНІКОВ

(підпис)

(ім'я та прізвище)

« » лютого 2022 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ МАГІСТРА

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код та назва спеціальності)

освітньо-професійної програми «Фармацевтична біотехнологія»

на тему: Біотехнологія антиоксидантів як компонентів лікарських засобів

Виконав: здобувач II курсу, групи 02

Лутай Олександр Олегович

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Керівник Воронцов Олександр Олександрович

(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 Владислав Линник

(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) незарядженої допомоги під час підготовки цієї роботи. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

Здобувач

(підпис)

Київ – 2022 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

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

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

біотехнології і мікробіології

Віктор СТАБНІКОВ

“ 03 ” листопада 2021 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

ЛУТАЙ Олександра Олеговича

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Біотехнологія антиоксидантів як компонентів лікарських засобів
керівник роботи ВОРОНОЦОВ Олександр Олександрович, к.т.н., доц.

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від “02” листопада 2021 року № 865-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 1 лютого 2022 року

3. Вихідні дані до роботи фермент каталаза, *Serratia marcescens* SYBC08

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) переваги використання каталази, порівняння біологічних агентів синтезу, способи культивування, виділення субстанції, контроль стадій виробництва виготовлення готового лікарського засобу

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема біосинтезу формату A1, технологічна схема виділення цільового продукту формату A1, апаратурна схема біосинтезу формату A1, апаратурна схема формату A1

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 03 листопада 2021 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

| № п/п | Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи | Строк виконання етапів роботи | Примітка |
|-------|---|-------------------------------|----------|
| 1 | РОЗДІЛ 1. Літературний огляд | 03.11.2021 – 10.11.2021 | |
| 2 | РОЗДІЛ 2. Техніко-економічне обґрунтування випуску субстанції для лікарського засобу та виробництва готової форми | 15.11.2021 – 20.11.2021 | |
| 3 | РОЗДІЛ 3. Обґрунтування вибору технологічної схеми біосинтезу субстанції та технологічної схеми виробництва ЛЗ | 20.11.2021- 30.11.2021 | |
| 4 | РОЗДІЛ 4. Специфікація обладнання | 30.11.2021- 4.12.2021 | |
| 5 | РОЗДІЛ 5. Опис технологічної схеми | 30.11.2021- 4.12.2021 | |
| 6 | РОЗДІЛ 6. Обґрунтування вибору технологічної схеми одержання ЛЗ | 4.12.2021 – 10.12.2021 | |
| 7 | Оформлення пояснювальної записки | 10.12.2021 - 01.02.2022 | |
| 8 | Виконання графічної частини | 10.12.2021- 25.01.2022 | |

Здобувач _____
(підпис)

Олександр ЛУТАЙ _____
(ім'я та прізвище)

Керівник роботи _____
(підпис)

Олександр ВОРОНЦОВ _____
(ім'я та прізвище)

ЗМІСТ

| | |
|--|-----|
| РЕФЕРАТ | 4 |
| ВСТУП..... | 5 |
| ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД..... | 7 |
| РОЗДІЛ 1. СОБЛИВОСТІ СИНТЕЗУ БІОАНТИОКИСНИКІВ | 7 |
| РОЗДІЛ 2. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ВИПУСКУ СУБСТАНЦІЇ ДЛЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ТА ВИРОБНИЦТВА ГОТОВОЇ ФОРМИ..... | 34 |
| 2.1. Передумови виробництва ЛЗ..... | 34 |
| 2.2. Розрахунок потужності виробництва..... | 37 |
| 2.3. Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера | 37 |
| 2.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу | 38 |
| РОЗДІЛ 3. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ СУБСТАНЦІЇ ТА ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА ЛЗ | 42 |
| РОЗДІЛ 4. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ | 59 |
| РОЗДІЛ 5. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ | 63 |
| РОЗДІЛ 6. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОДЕРЖАННЯ ЛЗ..... | 89 |
| СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ..... | 100 |

РЕФЕРАТ

Дана кваліфікаційна робота присвячена розробці біотехнологічного виробництва біоантиоксидантного ферменту каталаза культивуванням *Serratia marcescens* SYBC08, який на середовищі з лимонною кислотою та кукурудзяним екстрактом продукує 0,079 г/л цільового продукту. Каталаза має великі перспективи у застосуванні в фармацевтичній галузі.

В магістерській роботі описано використання каталази, як компонента поліферментного препарату. Також розрахована річна потужність виробництва каталази, яка складає 27 кг.

Технологія виробництва цільового продукту складається з допоміжних робіт (підготовці аераційного повітря, приготуванні та стерилізації поживного середовища та допоміжних розчинів) та технологічних процесів (вирощуванні посівного матеріалу в колбах на качалках та інокуляторах, виробничому біосинтезі), також описані методи очищення та виділення каталази з культуральної рідини. Порівняно та обрано оптимальні та економічно вигідні процеси на всіх етапах технологічного процесу. Сам процес включає в себе такі етапи: відділення біомаси від культуральної рідини, дезінтеграція клітин, концентрування, висушування кінцевого продукту, дані процеси наведені в апаратурній та технологічній схемах.

Магістерська робота викладена на 111 сторінках друкованого тексту, містить 13 таблиць, 4 рисунків і складається з вступу, 6 розділів, графічної частини (4 креслення формату А1) та списку використаної літератури (114 джерел).

Ключові слова: каталаза, *Serratia marcescens* SYBC08, виробничий біосинтез.

ВСТУП

Антиоксиданти — це поліфункціональні сполуки різної природи, здатні усувати або гальмувати вільнорадикальне окиснення органічних речовин мономолекулярним киснем.

Антиоксиданти, які функціонують у живому організмі (біоантиокисники), відіграють важливу роль, захищаючи біологічні субстрати від неферментативного окиснення, наприклад ліпіди, зокрема жири і жирні кислоти мембранних структур клітини. Вони є необхідними компонентами усіх тканин та клітин живих організмів і підтримують у нормальних фізіологічних концентраціях вільнорадикальні аутоокиснювальні процеси. В нормі використання і поповнення антиоксидантів у тканинах живих організмів збалансоване. Розрізняють антиоксиданти, основна біологічна функція яких визначається або пов'язана з антиокиснювальною активністю, і речовини, основна біологічна функція яких не пов'язана з антиокиснювальною дією.

Каталази - це клас ферментів, які специфічно каталізують розкладання H_2O_2 до H_2O та O_2 . H_2O_2 застосовували для процесів стерилізації та відбілювання в медичній, харчовій, текстильній та папероробній галузях. Залишковий H_2O_2 у побічних продуктах, шкідливий для здоров'я людини та довкілля. Таким чином, видалення залишків H_2O_2 необхідне у процесах текстильного виробництва, охорони здоров'я харчових продуктів, запобігання забрудненню та інших галузях.

Актуальність. В даний час поширеними захворюваннями стають цукровий діабет, хвороба Альцгеймера, хвороба Паркінсона тощо. Хоча в патогенезі цих захворювань бере участь багато факторів, кілька досліджень різних лабораторій продемонстрували, що каталаза має взаємозв'язок з патогенезом цих захворювань. В Україні каталазу не виробляють, дослідження в клінічних цілях не проводять. Потенціал каталази як терапевтичного препарату при лікуванні ряду захворювань

| | | | | | | | | |
|----------|--|----------------|--------|------|--------------------------|-------------|------|----------|
| | | | | | НУХТ БТЕК 02.02.08 КР ПЗ | | | |
| | | | | | | | | |
| Змн. | | № докум. | Підпис | Дата | ВСТУП | Літ. | Арк. | Адквішів |
| Розроб. | | Лутай О.О. | | | | | | |
| Керівник | | Воронцов О.О. | | | | | 5 | 110 |
| Реценз. | | | | | | Кафедра БТМ | | |
| Контр. | | | | | | | | |
| Затверд. | | Стабніков В.П. | | | | | | |

доволі преспективний.

Новизною даного проекту являється використання *Serratia marcescens* SYBC08, що виробляє більш активний цільовий продукт, культивується за більш економічно вигідних умов. Має перспективи в медичному використанні при більших масштабах досліджень. Комплекс цих аспектів підвищує цінність продукту на ринку. Виготовлення каталази при мінімальних затратах дає можливість отримати максимальний прибуток .

ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

РОЗДІЛ 1. СОБЛИВОСТІ СИНТЕЗУ БІОАНТИОКИСНИКІВ

Антиоксиданти—це поліфункціональні сполуки різної природи, здатні усувати або гальмувати вільнорадикальне окиснення (ВРО) органічних речовин мономолекулярним киснем.

Широко застосовуються у промисловості для збільшення термінів зберігання різноманітних речовин, які окиснюються, та в медичній практиці для лікування ВРО-зумовленої патології. Антиоксиданти, які функціонують у живому організмі (біоантиокисники), відіграють важливу роль, захищаючи біологічні субстрати від неферментативного окиснення, напр. ліпіди, зокрема жири і жирні кислоти мембранних структур клітини. Вони є необхідними компонентами усіх тканин та клітин живих організмів і підтримують у нормальних фізіологічних концентраціях вільнорадикальні аутоокиснювальні процеси. В нормі використання і поповнення антиоксидантів у тканинах живих організмів збалансоване. Розрізняють антиоксиданти, основна біологічна функція яких визначається або пов'язана з антиокиснювальною активністю (напр. супероксиддисмутази, токофероли), і речовини, основна біологічна функція яких не пов'язана з антиокиснювальною дією. До останніх належать *антибіотики*, які, крім бактерицидної, чинять також антиокиснювальну дію. Індивідуальні біоантиокисники утворюють систему, яка визначає антиокиснювальну активність живих тканин. Антиоксиданти класифікуються за трьома принципами: походженням, хімічною будовою та механізмом дії[1].

За походженням антиоксиданти поділяють на природні (біоантиокисники) і синтетичні. В основу хімічної класифікації покладено число ароматичних кілець у структурі сполуки, яка має антиокиснювальну активність, і кількість замісників та кілець. Ця класифікація не охоплює всієї різноманітності сполук з

| | | | | | | | | |
|----------|--|----------------|--------|------|--|-------------|------|---------|
| | | | | | НУХТ БТЕК 02.02.08 КР ПЗ | | | |
| Змн. | | № докум. | Підпис | Дата | | | | |
| Розроб. | | Лутай О.О. | | | РОЗДІЛ 1. СОБЛИВОСТІ СИНТЕЗУ БІОАНТИОКИСНИКІВ | Літ. | Арк. | Адквшів |
| Керівник | | Воронцов О.О. | | | | | 7 | 110 |
| Реценз. | | | | | | Кафедра БТМ | | |
| Контр. | | | | | | | | |
| Затверд. | | Стабніков В.П. | | | | | | |

антиокиснювальною дією. За механізмом дії до антиоксидантів, належать власне антиоксиданти — синергісти, тобто речовини, які або слабо гальмують окиснення, або підсилюють дію справжніх антиоксидантів, самостійно не впливаючи на інтенсивність процесів ВРО, і група сполук зі змішаними властивостями.

1.1 Синтез ферментних антиоксидантів.

До ферментних антиоксидантів належать — супероксиддисмутази (СОД), каталаза, пероксидаза;

1.1.1 Супероксиддисмутази

Супероксиддисмутаза - один з основних ферментів антиоксидантної системи. Являє собою групу металоферментів, які каталізують реакцію дисмутації супероксидних аніон-радикалів, підтримуючи їх концентрацію в клітині на низькому рівні, і зменшують ймовірність утворення ще більш активного синглетного кисню. Залежно від іона металу в активному центрі ферменту розрізняють кілька ізоферментів СОД[2].

Супероксид є одним з найбільш поширених активних форм кисню(АФК), що виробляються мітохондріями, в той час як СОД каталізує розщеплення супероксида на перекис водню і воду, отже, є центральним регулятором рівня АФК. Все СОД є металопротеїнами: бактерії можуть використовувати Fe-SOD і Mn-SOD, але ссавці вживають як цитоплазматичні, так і позаклітинні форми Cu, Zn-SOD і мітохондріальний Mn-SOD, які в еволюційному відношенні тісно пов'язані з бактеріальними Mn-SOD. У дослідженні *Kullisaar* з колегами *Lactobacillus fermentum* E-3 і E-18 змогли експресувати Mn-SOD, щоб протистояти окислювальному стресу. Хоча антиоксидантна активність СОД добре відома, терапевтичне застосування СОД обмежене, головним чином через його короткий період напіввиведення з кровообігу, що обмежує його біодоступність. Для вирішення цієї проблеми були зроблені спроби знайти підходящі транспортні засоби для СОД. Пробиотичні бактерії, здатні до локальної доставки СОД, відкривають новий підхід до захворювань, що характеризується продукуванням активних форм кисню[3].

Вчені під керівництвом С. Guo змогли дослідити та знайшли спосіб екстракції супероксиддисмутази, каталази та карбоангідраз з вільного від стромы гемолізату еритроцитів для приготування нанобіотехнологічного комплексу полігемоглобіну – супероксиддисмутаза - каталаза – карбоангідраза. Це дозволяє уникнути необхідності використання дорогих комерційних ферментів, що дає можливість значно ефективному процесу для великомасштабного виробництва нанобіотехнологічного комплексу polyHB-SOD-CAT-CA[4].

Narendra Tuteja, Panchanand Mishra, Sandep Yadav та співавтори дослідили та описали новий спосіб промисловим виробництва супероксиддисмутази. У своєму дослідженні вони описують рекомбінантну експресію та біохімічну характеристику високоактивного хлоропластичного CuZn-SOD з *Pisum sativum* (PschSOD) в системі експресії *E. coli*. Умови росту бактерій були оптимізовані для відновлення максимуму білка в ферментативно активній формі. Далі досліджували рекомбінантно очищений білок на його спектральні та біохімічні характеристики. Білок виявляє дуже високу активність і залишається активним при широкому діапазоні рН. Фермент стійкий до протеолітичного травлення, і 50% початкової активності зберігається навіть після зберігання протягом 180 днів при кімнатній температурі (25°C). Завдяки вищезазначеним властивостям рекомбінантний PschSOD може знайти свою користь у медичній, косметичній та харчовій промисловості[5].

Болгарські вчені на чолі з Trayana Nedeva, виділили нову термостабільну Cu / Zn-SOD з термотолерантного дріжджового штаму *Kluyveromyces Marxianus* NBIMCC 1984, очистили та охарактеризували. Процедура очищення включає термічну обробку та діаліз, іонообмінну хроматографію та хроматофокусування. Методологія є швидкою та високоефективною. Білок характеризується деякими унікальними функціями, такими як-термостабільність (при 70°C = 30 хв), стійкість рН у лужному діапазоні (7,5-8,5) та стійкість до інгібіторів та різноманітності хімічних речовин. Ці характеристики виявляють можливості широкого практичного застосування ферменту з штаму *Kluyveromyces Marxianus*[6].

Цікаве вирішення проблеми промислового виробництва супероксиддисмутази запропонувала група дослідників з Польщі. J. Wawrzykowski та M. Kankofer визначили біохімічні характеристики Cu,Zn-SOD, отриманих із білка курячого яйця та яєчного жовтка, та порівняли з характеристиками ферментів еритроцитів курей та tandard SOD. Cu,Zn-SOD, виділений з яєчного жовтка, мав оптимум при рН 6. Середня активність SOD в яєчному жовтку становила $98,5 \pm 19,5$ од/г, а в яєчному білку досягала $6,1 \pm 0,8$ Од/г. Також були описані зміни в активності СОД яєчного жовтка під час його зберігання протягом 200 днів. Оскільки яйця є дешевим та легкодоступним джерелом СОД, цей ферментативний білок може бути використаний у харчовій, косметичній або фармацевтичній промисловості[7].

У статті Raju Madanala та співавт. описують, як вони клонували ген від *Withania somnifera* (вишня озима), що кодує високостійку хлоропластичну супероксиддисмутаза Cu/Zn (SOD), та експресували в *Escherichia coli*. Рекомбінантний фермент очистили та характеризували. Він зберігав 90-70% залишкової активності через 1 год при температурі 80 та 95 ° С. Фермент був стійким до широкого діапазону рН (2,5–11,0). Він також показав високий ступінь стійкості до розщеплення етанолом та протеазами. Таким чином, ця рекомбінантна супероксиддисмутаза має високу перспективу застосування в фармацевтичній та харчовій промисловості[8].

Метою роботи Prashani Mudika Ekanayake та співавт. було дослідження гену, що кодує Mn-SOD з дискового морського вушка (*Haliotis discus*, aMn-SOD). Ген клонували, секвенували, експресували в *Escherichia coli* K12. Фермент мав активність 2781 Од/мг. Оптимальна температура ферменту становила 37°C, і він був активним у діапазоні кислого рН (від 3,5 до 6,5). Біохімічні аналізи були виконані для з'ясування біохімічних властивостей білка. Виділену послідовність вчені порівнювали з іншими MnSOD, доступними в загальнодоступній базі даних, щоб побудувати структурно-функціональний взаємозв'язок ферменту[9].

1.1.2 Каталаза

Каталаза - ключовий фермент, який використовує в якості субстрату пероксид водню, нерадикальний АФК. Цей фермент відповідає за нейтралізацію шляхом

розкладання перекису водню, підтримуючи тим самим оптимальний рівень молекули в клітині, що також важливо для процесів сигнальної системи клітин. Важливість ферменту можна визначити з факту його прямої та непрямой участі у багатьох захворюваннях та інфекціях.

Каталази широко розповсюджені в природі та містяться в бактеріальних, рослинних та тваринних клітинах. Будь-яке порушення балансу рівня антиоксидантів та реактивних речовин призводить до фізіологічного стану, який називається "окислювальний стрес". Каталаза є одним з найважливіших антиоксидантних ферментів, який значною мірою пом'якшує окислювальний стрес, руйнуючи клітинну пероксид водню з утворенням води та кисню. Дефіцит або порушення функціонування каталази передбачається пов'язаним з патогенезом багатьох вікових дегенеративних захворювань. Саме тому в багатьох лабораторіях докладаються зусилля для вивчення його використання, як потенційного препарату для лікування таких захворювань.

У 2005 році Федотов О.В. запатентував спосіб одержання ферментного препарату каталази з *Flammulina velutipes*. і гливи звичайної *Pleurotus ostreatus*. Він описав культивування продуцентів на глюкозо-пептонному живильному середовищі. Культивування велося до досягнення максимальної каталазної активності вегетативного міцелію. Ферментний препарат з вегетативного міцелію є новим та придатним для застосування в лабораторних дослідженнях та промисловому виробництві[10].

Волошко Т.Є. та Федотов О.В. досліджували динаміку росту та каталазну активність штамів базидіоміцетів за їх поверхневого культивування на глюкозопептонному середовищі. Об'єктами вивчення були 57 штамів, 5 із яких належать до 5 видів порядку *Polyporales*, а 52 — до 7 видів порядку *Agaricales*. Каталазну активність і вміст протеїну в міцелії та культуральному фільтраті визначали спектрофотометрично. Було встановлено рівень накопичення біомаси та каталазної активності досліджених штамів на 9- й 12-ту добу культивування, а також здатність більшості грибів до синтезу переважно позаклітинної каталази. Результати дослідження дали змогу відібрати штами, які є активними продуцентами

каталази, зокрема *F.velutipes* F-2 та *P.ostreatus* P-208, які можна застосувати в біотехнології для одержання препаратів ензимів[11].

У дослідженні вчених Xinhua Fu, Wei Wang, Jianhua Hao було отримано високоактивну каталазу бактерією *Acinetobacter sp.* YS0810. Очищена каталаза характеризувалася як монофункціональна каталаза. Аналізи амінокислотних послідовностей показали, що ген каталази є новим білком, незважаючи на збереження структур каталази в мікроорганізмах. Висока стійкість до лугу та термостабільність каталази продемонстрували хороші перспективи застосування в медичній промисловій галузі[12].

Hua-Wei Zeng, Yu-Jie Cai, Xiang-Ru Liao, Feng Zhang та Da-Bing Zhang досліджували каталазу, продуцентом якої були бактерії *Serratia marcescens* SYBC08. Встановлено, що фермент без пероксидазної активності має нетиповий електронний спектр монофункціональної каталази. Фермент демонстрував широкий діапазон активності рН (рН 5,0–11,0). Найактивніший був при температурі 20°C і мав 78% активності при 0°C. Його термостабільність була трохи вищою порівняно з комерційною каталазою з бичачої печінки. Вихід каталази *Serratia marcescens* SYBC08 має потенційне промислове застосування[13].

У 2016 році Xianbo Jia, Jichen Chen, Chenqiang Lin та Xinjian Lin клонували ген каталази від *Geobacillus sp.* CHB1, що кодує монофункціональну каталазу, рекомбінантно експресували в *Escherichia coli* (*E. coli*). Рекомбінантна каталаза була добре розчинною в *E. coli* і становила 30% від загальної кількості білка *E. Coli*. Ферментаційний бульйон рекомбінантної *E. Coli* мав високий рівень активності каталази до 35 831 од/мл. Широкий діапазон реакційних температур цього ферменту та високе продукування, цінні особливості цього штаму для промислових цілей[14]. Tuyishime Philibert, Zhiming Rao, Taowei Yang та Junping Zhou вчені, які проводили дослідження з штамом *Bacillus Pumilus*, який представляв потенційну альтернативу для промислового виробництва антиоксидантного ферменту, що характеризується більш високою стійкістю до окисного стресу порівняно з промислово важливими *Bacillus subtilis* та *Bacillus Licheniformis*. З штаму *Bacillus Pumilus* перенесли ген каталази на більш промисловий штам *B. subtilis* 168. Вчені прийшли до висновку, що вони перші

успішно сконструювали рекомбінантний *B.subtilis 168* , який експресує ген KatX2 від *B. pumilus*. Цей рекомбінантний штам має високу стабільність гем-каталази з високою активністю, яка потенційно може знайти широке комерційне застосування від біомедикаментозного лікування до медичної діагностики та інших застосувань у текстильній промисловості, паперовій, харчовій та фармацевтичній промисловості[15].

Робота Jiang Zhang, Hong Liu, Qingwei Wang була направлена на експресію каталази у *Lactobacillus fermentum* та на оцінку її антиоксидантних властивостей. *Lactobacillus plantarum* ATCC14431 є однією з небагатьох молочнокислих бактерій, здатних розкласти H_2O_2 під дією марганцезалежної каталази, бо містить ген *katA*. Однак він не є природним мешканцем кишкового тракту, і його біоефективність та виживання в шлунково-кишковому тракті ніколи не перевірялись. У своїй роботі вчені успішно експресували ген *katA* з *L.plantarum* ATCC14431 у *L. fermentum* I5007, рекомбінантний *L. fermentum* виявляв майже в 20 разів вищу активність каталази. Антиоксидантні властивості цього продуценту, що продукує каталазу, оцінили за допомогою моделі мишей, індукованих декстраном натрію сульфатом (ДНС). Порівняно з контролем, миші, які отримували лише ДНС, мали підвищену діарею та гістологічні показники слизової, а також перекисне окислення ліпідів, мієлопероксидазу та активний NF- κ B у тканині товстої кишки. Подібно до вітаміну E, лікування рекомбінантним *L. fermentum* пом'якшує ці ефекти, що супроводжується покращенням гістологічних показників слизової оболонки в проксимальній частині товстої кишки та зниженням перекисного окислення ліпідів, мієлопероксидази та активного NF- κ B в тканині товстої кишки. Експресія каталази у *L. fermentum* підвищила її здатність виживати під впливом аераційного середовища *in vitro* та надавала антиоксидантну та протизапальну дію в моделі коліту, спричиненого ДНС[16].

Xianbo Jia та співавтори[26] виділили термофільну бактерію *Ureibacillus thermosphaericus* FZSF03 з компосту, що продукує каталазу. Після оптимізації активність каталази досягла 57 630 од/мл у струшувальній колбі, що було в 32 рази більше, ніж початкове виробництво, і представляло найвищий рівень виробництва

каталази, який спостерігався для диких штамів. Очищена каталаза демонструвала оптимальну температуру реакції 60°C і була стабільною нижче 60°C. Крім того каталаза була стабільна у лужному середовищі. Високе виробництво та чудові властивості ферментів роблять цей штам кандидатом у промислове виробництво каталази. Ген, що кодує цю каталазу, був ідентифікований та успішно клонований, а амінокислотна послідовність показує, що це нова монофункціональна гема-каталаза[17].

Також Xianbo Jia та його колеги виявили, генетично та ферментативно охарактеризували новий штам, що продукує каталазу, *Serratia marcescens* FZSF01. Ця каталаза досягла рівня активності 51 468 од/мл. Каталаза також виявляла широкі рівні активності при температурі від 0°C до 60°C і рН 5,0 до 11,0. Крім того вчені, пишуть, що кодувати його ген у *E. coli* BL21, але розчинність та рівень активності залишалися низькими. Потрібні подальші дослідження для підвищення ефективності рекомбінанту для ефективного отримання високого рівня активності каталази. Таким чином, *S.marcescens* FZSF01 та його рекомбінантна кишкова паличка можуть представляти конкурентну альтернативу у виробництві промислової каталази[18].

У своєму дослідженні Annamaria Ricciardi та Rocco Gerardo Ianniello вивчили вплив атмосфери інкубації (не аерований статичний ріст проти аерованого струшуваного росту) та добавок Fe^{2+} , геміну, Mn^{2+} або їх комбінацій, на продукцію каталази штаму *Lactobacillus casei* N87. Оцінювали кінетику росту, ферментативну активність, толерантність до окисного стресу та експресію генів гема- та Mn-каталази. Проведено філогенетичний аналіз послідовностей гему та Mn-каталази, отриманих для всіх опублікованих геномів. Наявність кофакторів, особливо в поєднанні, покращило виробництво біомаси у *L.casei* N87 як в аерованих, так і в не аерованих умовах. Геном *L.casei* N87, що містив послідовності як каталаз, так і добавок геміну та Mn, був вирішальним для експресії генів та функціональності ферментів. Залізо та кисень мали адитивний стимулюючий ефект. Толерантність до окисного стресу була вищою в аерованих культурах, що містять гемін або Mn, через високу активність каталази. Наявність обох ферментів підтверджено в інших

штамах *L.casei*. Експлуатація молочнокислих бактерій як з гема-, так і з Mn-каталазами може забезпечити захист від окисного стресу в різних умовах і може бути актуальною для продуктів харчування та для медицини (профілактика деяких захворювань людини)[19].

Irina Krallish та співавтори дослідили вплив заліза та аерації на дію супероксиддисмутази та каталази полі-*b*-гідроксибутират-продукуючої *Azotobacter chroococcum*. Вихід біомаси збільшувались у присутності заліза в середовищі росту та при зниженій аерації. Найвище виробництво біомаси спостерігалось у культури, вирощеної в середовищі з 36 μM початкової концентрації заліза та помірним рівнем аерації. Найвищий рівень накопичення полі-*b*-гідроксибутират (70–72% від сухої маси клітин) в наших експериментальних умовах спостерігався при зниженій аерації в середовищі росту при 180 μM початкової концентрації заліза. Отримані результати доводять, що як рівень аерації, так і подача заліза помітно впливають на активність СОД і каталази. Маючи на увазі необхідність заліза для синтезу обох ферментів, лише каталаза виявляла специфічну залежність від рівня внутрішньоклітинного накопичення заліза[20].

Yoshiko Hanaoka та Isao Yumoto маніпулювали умовами для вирощування культури *Exiguobacterium oxidotolerans* T-2-2, що використовується для широкого виробництва позаклітинної каталази. Стійка до перекису водню (H_2O_2) бактерія, *Exiguobacterium oxidotolerans* T-2-2T, виділяє позаклітинну каталазу. Використовували низьку частоту струшування (60 об/хв) після спостереження, за цих умов утворюється більша кількість позаклітинної каталази порівняно з попередньою частотою струшування (120 об/хв). Концентрація клітин досягала приблизно $4,5 \times 10^6$ клітин/мл та ініціювалося вироблення позаклітинної каталази. Продукція позаклітинної каталази значною мірою залежала від концентрації внутрішньоклітинної каталази. Хоча загальна продуктивність каталази залишалася незмінною, введення амінолевулінової кислоти сприяло позаклітинному продукуванню. Продуктивність позаклітинної та внутрішньоклітинної каталази становила 16000 та 6000 од/мл[21].

Каталаза в рослинах - це скоординований білок, який переважно диспропорціонує перекис водню у воду та кисень. Він відіграє важливу роль у підтримці клітинної концентрації перекису водню до рівня, необхідного для всіх аспектів нормального росту та розвитку рослин. Спроби, здійснені в минулому для рекомбінантної експресії рослинної каталази в кишковій паличці, постійно призводили до утворення нерозчинних та неактивних включень. Mamata Ray та Ranchanand Mishra в своєму випробуванні продемонстрували специфічні вимоги до партнера злиття тіоредоксину, участь білка тригерного фактора та обробку при низькій температурі протягом періоду індукції для синтезу каталази рослини рису в рекомбінантній *E.coli*. Крім того, бактерії вимагали добавки δ -амінолевулінової кислоти для отримання біоактивної рекомбінантної рисової каталази-А. Молекулярні та біохімічні властивості очищеного рекомбінантного білка показали характерні особливості типової монофункціональної рослинної каталази. Ці результати підтверджують корисність цього дослідження для отримання рослинної каталази з використанням *E.coli* як гетерологічної експресійної системи[22].

Турецькі вчені Alaattin Sen, Mehmet Ozkarsli та Nazime Mercan Dogan метою дослідження яких було клонування, експресія, очищення та характеристика каталази від термоалкаліфільних бактерій *Bacillus licheniformis*. Каталазу клонували у вектор клонування pCR8 / GW / TOPO, який трансформували у TOP10 компетентні клітини *E. coli*. Його перенесли у вектор експресії pDest за допомогою ферменту LR-клонази і трансформували у клітини BL21-AI. Виражену каталазу очищали хроматографією. Очищена каталаза має чотири субодиниці з видимою молекулярною масою мономеру 60 кДа. Фермент виявляв значну активність між рН 5,0–11,0 та температурою 20–50 °С. Ці результати показали, що каталаза *Bacillus licheniformis* є типовою каталазою, яка має безліч властивостей, сприятливих для промислового застосування[23].

Також турецькі вчені на чолі з Ayşe Ezgi Ünlü вивчали одночасне виробництво супероксиду (SOD) та каталази (CAT) з *Rhodotorula glutinis*. Досліджували вплив температури, початкового рН середовища та джерела вуглецю на активність ферментів. Встановили: температура та джерела вуглецю мають значний вплив на

активність ферментів. 10°C забезпечували найвищі питомі активності CAT та SOD, як 22,6 од/мг білка та 170 од/мг білка. Встановлено, що гліцерин є найкращим джерелом вуглецю для ферментної діяльності, забезпечуючи 113 од/мг білка для CAT і 125 од/мг білка для СОД, що також було найвищою активністю, отриманою в цьому дослідженні[24].

Issei Kobayashi та співавтори клонували, очистили та дали характеристику каталази (KatA) від надзвичайно радіостійкої бактерії *Deinococcus radiodurans*. Розмір очищеного мономеру KatA *D.radiodurans* становив 65 кДа, тоді як гель-фільтрація виявила, що розмір ферменту становив 240 кДа, що припускає, що KatA утворює гомотетрамер у розчині. Очищений KatA демонстрував остаточну питому активність 68 800 од/мг білка. Для KatA не виявлено пероксидазної активності. Ці результати демонструють, що *D.radiodurans* KatA є типовою монофункціональною гемовмісною каталазою. Стійкість KatA щодо стресу H₂O₂ перевершувала стійкість наявних у продажу каталаз від *Aspergillus niger* та каталази з бичачої печінки[25].

I Yumoto та співавтори виділили каталазу від факультативно психрофільної бактерії *Vibrio rumoiensis* S-1(T), яка була виділена з навколишнього середовища, що зазнало впливу H₂O₂ і виявляла високу активність каталази. Фермент очистили, охарактеризували та визначили його локалізацію в клітині. Його молекулярна маса становила 230 кДа, і молекула складалася з чотирьох однакових субодиниць.. Каталітична активність становила 527500 од/мг білка за стандартних умов реакції при 40°C і показала широкий оптимальний діапазон рН (рН від 6 до 10). Каталаза із штаму S-1(T) знаходиться не тільки в цитоплазматичному просторі, але і в периплазматичному просторі. Термостійкість передбачає, що каталазу із штаму S-1(T) слід класифікувати як психрофільний фермент[26].

Baljinder Singh Kauldhar та співавтори дослідили новий екстремофільний штам *Geobacillus* sp. BSS-7, що належить до роду *Geobacillus*, який був використаний для виробництва каталази шляхом адаптації її харчових потреб та змінних процесів. Для налаштування процесу бродіння застосовували одну змінну традиційний підхід, за яким слідувало обчислювальне проектування. Просте бродильне середовище, що містить лише три компоненти, а саме сахарозу (0,55%, мас./об.), екстракт дріжджів

(1,0%, мас./об.) та BaCl_2 (0,08%, мас./об.), було розроблено для гіперпродукції каталази. Контрольоване та оптимальне надходження повітря спричинило надзвичайне збільшення виробництва ферментів при переміщенні біопроекту з колби на рівень біореактора. Ця робота повідомляє про високий рівень продукування каталази (105000 МО/мг клітин) за короткий час ферментації 12 годин. Вчені в своїй роботі вказують що це перше серйозне дослідження, що охоплює вироблення внутрішньоклітинної каталази з теплолюбного роду *Geobacillus*[27].

Китайські вчені у 2014 році експериментально довели, що самокловування суттєво покращує виробництво каталази у *Bacillus subtilis* WSHDZ-01. Ген *katA*, який кодує каталазу у *Bacillus subtilis* WSHDZ-01 був надмірно експресований у *B. subtilis* WB600 та *B. subtilis* WSHDZ-01. Врожайність каталази в обох трансформованих штаммах була значно краще порівняно з первинним штамом WSHDZ-01. Остаточні отримані результати показали, що врожайність у *B. subtilis* WSHDZ-01 та *B. subtilis* WB600 були в 20 разів і в 4 рази вище, ніж у материнського штама. Робота вчених Sha Xu, Yaqiong Guo, Guocheng Du, Jingwen Zhou та Jian Chen дає підказки щодо більш ефективного використання експресійної системи *B. subtilis* з деякими іншими промисловими штамми *B. subtilis* як закваскою, яка повинна мати набагато потужнішу здатність виробляти білок, ніж загальнодосліджені штамми.[28]

Yanzhou Zhang, Xunhang Li та Ruchun Xi провели дослідження в області виділення кислотостійкої каталази *KatB* з *Bacillus altitudinis* SYBC hb4. Метою їх роботи був скринінг потужних кислотостійких каталаз штаму *Bacillus*. Штам з більш високою продукцією активності каталази був ідентифікований та позначений як *Bacillus altitudinis* SYBC hb4 на основі фенотипових властивостей, аналізу генів 16S рРНК та *gyrB*. Його чотири гени каталази були успішно клоновані та позначені як *katX*, *katB*, *katN1* та *katN2*, відповідно. Три різні каталази були виявлені за допомогою ізозимної зимографії; однак лише один (*KatB*) був успішно ідентифікований. *KatB* демонстрував оптимальну активність в умовах рН 5,0, $t=30^\circ\text{C}$. Його активність та стабільність були вищими порівняно з бичачою каталазою в слабкокислих умовах

(рН 5,0). Таким чином, *B. altitudinis* SYBC hb4 може представляти потенційну кислотостійку каталазу, що використовується в кислих умовах[29].

Метою роботи науковців під керівництвом Xunlong Shi створення нового штаму *Bacillus subtilis* для широкомасштабного приготування каталази. За допомогою клонування генів, вчені досягли своєї мети та вивели штаму *Bacillus subtilis* KN25. Трансформантний штаму KN25 виділяє високий рівень (3500 од/мл) каталази, що полегшує її очищення. Три прості стадії очищення давали майже однорідну каталазу з відновленням 70%. Очищена рекомбінантна каталаза має специфічну активність 34600 од/мг за оптимальних умов і є більш стійкою до кислотних умов, ніж бичача каталаза. Це дослідження пропонує новий та ефективний метод підготовки каталази для різних застосувань[30].

Aspergillus terreus MTCC 6324 виробляє високий рівень надзвичайно активної та стабільної клітинної великої каталази під час росту на *n*-гексадекані для боротьби з окислювальним стресом, спричиненим метаболічним механізмом, що руйнує вуглеводні, всередині клітини. *A. terreus* виділений з нафтових родовищ Ассаму, Індія. Вченими Preety Vatsyayan та Pranab Goswami виділена велика каталаза з *A. terreus*, яка має багато функціональних подібностей з іншими великими каталазами, про які повідомляють з різних мікробних джерел, її надзвичайна стабільність при лужному рН та каталітична ефективність інтригують. Ці властивості встановлюють потенціал цієї великої каталази як для біосенсора та застосування в інших промислових галузях, а також вимагають подальших досліджень[31].

1.1.3 Пероксидаза

Пероксидаза - фермент, що відноситься до класу оксидоредуктаз, який повсюдно зустрічається у всіх рослинах, тварин і мікроорганізмів. Фермент каталізує окислювально-відновну реакцію в присутності пероксиду водню, який виступає в якості акцептора електронів, багатьох видів органічних субстратів за допомогою вивільнення кисню. Пероксидаза має широке практичне застосування, зокрема, в медицині як компонент діагностичних систем для біохімічних і імуноферментних аналізів. У імуноферментних методах пероксидаза широко

використовується для приготування антигіло-фермент або антиген-антигіло-фермент кон'югатів, через високий рівень спорідненості, високій швидкості протікання реакції і більшої чутливості. Використання високоспецифічний, високочутливої і дуже стабільною пероксидази забезпечується в діагностичній системі визначення рівня глюкози в крові в глюкозооксидазною методикою.

Федулов А.Л та співавт. у своїй роботі описав метод виділення пероксидази з оболонки насіння сої. Пероксидаза сої становить інтерес завдяки деяким унікальним характеристикам: висока термостабільність (температура інактивації вище 80 ° C), висока реакційна здатність і стабільність при низьких значеннях рН і в ряді органічних розчинників. Пероксидаза сої міститься у великій кількості в насінній оболонці сої, що є дешевою сировиною і побічним продуктом при переробці сої. Ці властивості роблять цей фермент привабливим для практичного застосування і отримання в промислових масштабах[32].

Метою дослідження російського вченого Полознікова А.А. була робота над промислового виробництва пероксидази високої якості з коренів хрону для діагностичних цілей. Подрібнену біомасу коренів хрону витримували в 0.1 М буферному розчині фосфату натрію рН 7.0, попередньо продутим азотом, в присутності 5 мкМ розчину геміну і 5мМ хлористого кальцію. Екстракт відокремлюють декантацією, з подальшою фільтрацією і концентрування ультрафільтрацією через ультрафільтри з розміром пір менше 30 кДа. Екстракт ферменту насичують сульфатом амонію до 35% від насичення і наносять на колонку з феніл-сефарозою, після інтенсивного промивання буфера з сульфатом, активні фракції знімають градієнтом сульфату амонію (35% -0%) і збільшенням рН до 8.0. Фермент додатково очищають гель-фільтрацією на Toyopearl HW55F, піддають діалізу і сушать методом сублімації. Використання гемін-складових буферів на стадії екстракції і гель-фільтрації дозволяє отримувати високоактивний фермент з високим виходом за рахунок 100% насичення ферменту геміном. Запропонований спосіб дозволяє прискорити процес виробництва ферменту і суттєво поліпшити його каталітичні властивості і стабільність[33].

P.Raja Rao та P. Kavya у своєму дослідженні використали *Bacillus subtilis* виробництва пероксидаз. *B.subtilis* виділили з ґрунту методом серійного розведення. Ідентифікацію *B.subtilis* виробляв 0,00045 одиниць пероксидази на мл бродильних середовищ. Були проведені оптимізаційні дослідження, і було встановлено, що оптимальними умовами для виробництва пероксидази є рН-6, температура-37°C. Очищення ферменту пероксидази проводили із застосуванням сольового осадження, діалізу та іонообмінної хроматографічної техніки. Вченими був визначений розмір приблизно 44 кДа. Чистоту ферменту іммобілізували методом альгінату натрію. Сінгапурські дослідники прийшли до висновку, що *Bacillus subtilis* є хорошим джерелом для виробництва ферменту пероксидази та має потенційне промислове застосування[34].

Дослідження африканськими вченими мало на меті визначити умови процесу для оптимального продукування пероксидази видом *Bacillus* (*Bacillus* sp. FALADE-1-KX640922), виділеного із лісового заповідника Хогсбек у Південній Африці. Ayodeji O. Falade та співавт. оптимізували виробництво пероксидази, маніпулюючи параметрами при зануреному бродінні. Згодом ген, що кодує гем-пероксидазу, визначали за допомогою полімеразної ланцюгової реакції та секвенуванням ДНК-Сангера. Досліджувані бактерії мали максимальну продукцію пероксидази при рН 8, температурі 30°C та 150 об/хв. Додавання гваяколу до середовища бродіння лігніну посилювало вироблення пероксидази понад 100% у досліджуваних бактерій. Однак інші мономери лігніну (вератриловий спирт, ванілін, ванілова кислота та ферулова кислота) пригнічують активність ферменту. Модифікація ферментаційного середовища сульфатом амонію дала максимальний вихід пероксидази (8,87 Од на мл). У заздалегідь визначених умовах культури *Bacillus* sp. FALADE-1 виражав максимальну питому активність пероксидази через 48 годин (8,32 U мг). *Bacillus* sp. FALADE-1 є перспективним кандидатом для поліпшення виробництва пероксидази[35].

У своїй роботі Willian Daniel Hahn Schneider провів досліди з метою визначення найкращих джерел та концентрацій вуглецю та азоту у виробництві лаказ, загальних пероксидаз та пероксидази марганцю *Marasmiellus palmivorus*

VE111. Серед використаних джерел вуглецю та азоту поєднання глюкози та казеїну призвело до вищого виробництва лакказ (5134 Од / мл), загальної кількості пероксидаз (187 Од / мл) та пероксидази марганцю (57 Од / мл). Центральна композитна обертова конструкція (CCRD) була використана для визначення оптимальних концентрацій глюкози та казеїну для отримання ферментів. Експерименти з кращими результатами масштабували в 5-літровому біореакторі. Було підтверджено, що менші концентрації глюкози (5 та 10 г / л) стимулювали вищу активність загальних пероксидаз (1285 Од / мл) та лакказ (3420 Од / мл) відповідно, тоді як більш висока концентрація глюкози (30 г / л) сприяла виробництву пероксидази марганцю (59 од / мл). Ці дані свідчать про високу ефективність *M. Palmivorus* VE111 у виробництві пероксидази та лаккази[36].

1.2 Синтез макромолекулярних неферментативних компонентів

1.2.1 Трансферин

Трансферин (Tf) є основним заліозв'язуючим білком в плазмі крові людини, відповідальним за регульовану доставку заліза в клітини. Це одновимірний глікопротеїн (~ 80 кДа), що володіє здатністю зв'язувати два іона тривалентного заліза дуже міцно, але оборотно. Трансферин складається з двох глобулярних часток (N-частки і С-частки), кожна з яких складається з двох субдоменів, розділених глибокою щілиною, яка містить сайт зв'язування для іона тривалентного заліза і синергетичного карбонатного аніона. У переважній більшості типів клітин залізо набувається шляхом зв'язування навантаженого залізом голо-трансферину зі специфічним рецептором трансферину (TfR) з подальшим ендцитозу комплексу $Fe^3 + / Tf / TfR$. Залізо вивільняється в кислих умовах ендосоми, після чого комплекс Tf / TfR повертається на поверхню клітини, звідки який не містить заліза апо-трансферин повертається в кровотік. Було запропоновано терапевтичне застосування для трансферину . Найбільш очевидним є лікування рідкісного захворювання - спадкової атрансферінемії, де описані позитивні ефекти інфузії трансферину. Останнім часом екзогенний трансферин був використаний для полегшення захворювання у β -таласемічних мишей, у яких після лікування трансферином спостерігалось поліпшення еритропоезу і виживання червоних

кров'яних тілець . Це говорить про те, що терапія трансферином може стати життєздатною альтернативою переливанню крові і хелатній терапії для лікування людської β -таласемії і інших захворювань із супутньою анемією і перевантаженням залізом. Крім того, трансферин був запропонований як засіб зниження концентрації вільного заліза і подальшого окисного пошкодження і ризику інфекції.

Christopher JA Finnis та співавт. провели дослідження в області промислового видобутку високого рівню продукції рекомбінантного трансферину з *Saccharomyces cerevisiae*, без участі тварин. Рекомбінантні білки забезпечують безпечну та ефективну альтернативу тканинним або сироватковим продуктам як для терапевтичного, так і для біотехнологічного застосування. Вчені розробили першу мікробну систему для високого рівня секреції рекомбінантного трансферину (rTf), яка була розроблена із штамів *Saccharomyces cerevisiae*, спочатку розроблених для комерційного виробництва рекомбінантного людського альбуміну. Повнорозмірний не-зв'язаний глікозилований rTf виділявся приблизно в десятки разів вище, ніж із загальноживаних лабораторних штамів. Модифікація вектора експресії дріжджів на основі 2 мкм, щоб забезпечити надмірну експресію ER-шаперону, білка дисульфід-ізомерази, ще більше збільшила секрецію rTf приблизно в дванадцять разів при ферментації з високою щільністю клітин. Вироблений rTf був функціонально еквівалентний трансферину, отриманому з плазми крові, що дає нам багато перспектив для використання цього методу в промислових масштабах[37].

Японські вчені визначили структурні і функціональні характеристики рекомбінантного трансферину людини, який продукується дріжджами *Pichia pastoris*. Kimihiko Mizutani виявив, що експресійна система метилотрофних дріжджів *Pichia pastoris* придатна для виробництва великої кількості гетерологічних білків, особливо білків еукаріотів. У цьому дослідженні вони отримали правильно складені цілі молекули сироваткового трансферину людини (hsTf) за допомогою експресійної системи *P. pastoris*. Перевага, що відносно просте та недороге середовище росту може використовуватися і що витрати на виробництво великої кількості рекомбінантного білка дуже низькі, що є великим плюсом у промисловому виробництві[38].

В дослідженнях Попова Р.Ю. та співавторів також використовували *Pichia pastoris*. Таким чином групою вчених, був створений новий штам *P. pastoris*, який продукує трансферин людини з рівнем цільового білка ~ 20 мг/л та були підібрані оптимальні умови культивування штаму. Ці дані можна використовувати для оптимізації виробництва трансферину при культивуванні штаму *P. pastoris Yst-TFNG* в біореакторі для максимального вихіду продукта[39].

Хоча дріжджі *Schizosaccharomyces pombe* використовувались для виробництва гетерологічного білка високого рівня, продуктивність секретованого сироваткового трансферину людини (hTF) була низькою, імовірно, оскільки білок містить двадцять дисульфідних зв'язків і два місця N-глікозилювання. У своєму дослідженні Hiroyuki Mukaiyama, Hideki Tohda та Kaoru Takegawa виявили, що надмірна експресія ендогенної передбачуваної білкової дисульфідізомерази (PDI) покращує продуктивність. Аналіз послідовності всього геному *S.pombe* виявив п'ять передбачуваних генів PDI і надмірна експресія двох з них, значно покращила продуктивність секретованого трансферину[40].

На сьогоднішній день промисловий спосіб виробництва трансферину пов'язаний з переробкою плазми крові. Через високий ризик зараження патогенами, що передаються через кров, від використання трансферину, отриманого з плазми крові людини або тварини, рекомбінантний трансферин є кращим для використання. Deshui Zhang та співавтори експресували рекомбінантний людський трансферин у рисі (*Oryza sativa* L.) на високому рівні 1% сухої маси насіння (10 г/кг). Рекомбінантний людський трансферин можна було екстрагувати сольовими буферами, а потім очистити одностадійним аніонообмінним хроматографічним процесом до чистоти понад 95%. Було показано, що рекомбінантний трансферин людини, отриманий з рису, не тільки структурно подібний до природного людського трансферину, але також функціонально такий же, як природний трансферин з точки зору оборотного зв'язування заліза та сприяння росту та продуктивності клітин. Ці результати вказують на те, що рекомбінантний трансферин людини, отриманий з рису, повинен бути безпечною та недорогою альтернативою трансферину, отриманому з людини або тварин[41].

У дослідженні Xiaohue Yin та співавт. гомолог трансферину (OnTf) очищали із сироватки нільської тилапії (*Oreochromis niloticus*) за допомогою двоступеневої афінної хроматографії та охарактеризували його антибактеріальну функцію та роль у запальній реакції. У сукупності результати цього дослідження показали, що OnTf, ймовірно, залучає вроджений імунітет, щоб відігравати роль у захисті господаря від бактеріальної інфекції в нільській тилапії. Слід сказати, що гомолог трансферину має унікальну структуру і схожий або ідентичний Tf крові людини[42].

1.3 Низькомолекулярні антиоксиданти

1.3.1 Вітамін А

Бета-каротин - найбільш відома і поширена форма провітаміну А. Від інших каротиноїдів він відрізняється наявністю бета-кілець на кінцях молекули. Це потужний антиоксидант, який захищає клітини від шкідливої дії вільних радикалів, має імуностимулюючі і адаптогенні властивості, запобігає новоутворення і серцево-судинні захворювання, підтримує відновні процеси в епітелії шкіри і слизових, забезпечує утворення зорового пігменту родопсину.

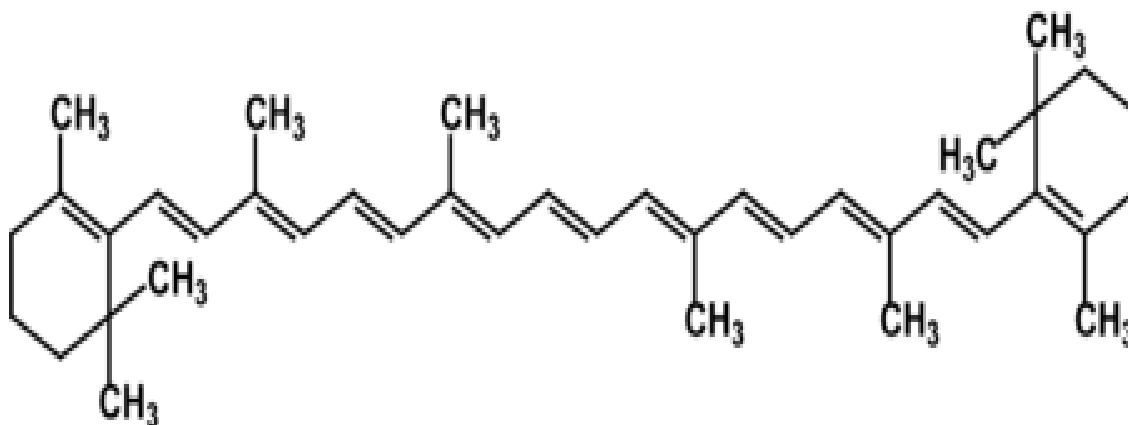


Рис. 1 Бета-каротин

Метою роботи Maria Bindea та співавт. є дослідження способу максимізації виробництва докозагексаєнової кислоти (DHA) та β-каротину шляхом оптимізації умов культивування їх джерел, мікроводоростей *Schizochytrium limacinum* та гриба *Blakeslea trispora* у ферментаційному середовищі. Доведено, що чинниками впливу на процес ферментації для отримання DHA та β-каротину є: концентрація джерела вуглецю (різні гліцеринові сирі та чисті концентрації) для них обох, і зокрема

температура для ДНА та рН для β -каротину. Вчені випробовували вплив цих параметрів на біомасу, вихід ДНА та β -каротину. Найвище виробництво *S. limacinum* було отримано при 25°C, використовуючи в якості джерела вуглецю кількість гліцерину (сирого або чистого) 90 г/л. Максимальні кількості для виробництва β -каротину були отримані при рН 7 та 60 г/л неочищеного гліцерину. Результати роботи підкреслюють можливість використання неочищеного гліцерину як недорогого субстрату для росту мікроводоростей *S. limacinum* та гриба *B. trispora* для отримання найважливіших молекул: докозагексаєнової кислоти та β -каротину[43].

Dunaliella Salina морські мікроводорості, що накопичують величезну кількість каротиноїдів (12,6%) для свого виживання. Наукова робота A.Chandra Sekhara Reddy, T. Sugantha, Dr. R. Srinivasa Reddy в основному зосереджена на ефективних стратегіях екстракції каротиноїдів з використанням різних композицій органічних розчинників. Для вирощування *Dunaliella Salina* використовують штучні середовища морської води, а каротиноїди екстрагували розчинниками ацетоном, петролейним ефіром та н-гексаном. Аналіз каротиноїдів методом HPLC (рідинна хроматографія високого тиску) та їх очищення поліетиленгліколем 400. Каротиноїди можуть бути вилучені з інших рослинних джерел. Але очищення специфічного каротиноїду дуже важке, оскільки рослинні клітини накопичують різноманітні каротиноїди, а також білки. У випадку мікроводоростей накопичення каротиноїдів є надзвичайно специфічним, а очищення легким у порівнянні з іншими джерелами. Оскільки каротиноїди мають високу комерційну цінність, вирощування мікроводоростей та очищення органічними розчинниками дає високу продуктивність добуття каротиноїдів та є економічно вигіднішими[44].

Bohua Wang та співавт. виділили та ідентифікували новий штам, що продукує β -каротин, *Serratia marcescens RB3*, за допомогою фізіологічних та біохімічних тестів, а також аналізу послідовності 16S рДНК. Виробництво β -каротину *S. marcescens RB3* було виявлено за допомогою HPLC -аналізу. Умови культивування для виробництва β -каротину *S. marcescens RB3* були оптимізовані на такому середовищі 2,0% лактози, 2,0% пептону, 0,3% екстракту яловичини, 1,0% NaCl з

додаванням 0,05% Fe²⁺, рН 6,0 та 30°C. За оптимальних умов вихід β-каротину досяг 2,45 мкг / мл. Ці результати свідчать про те, що штам RB3 гідний для подальших досліджень для індустріалізації виробництва β-каротину[45].

Китайські вчені провели ряд досліджень на збільшення виробництва β-каротину промисловим грибом *Blakeslea trispora*. Fang Xu, Qi-Peng Yuan, Yan Zhu досягли своєї мети, виробництво лікопіну та β-каротину було збільшено при додаванні векторів кисню, н-гексану та н-додекану, до культур *Blakeslea trispora* через підвищену концентрацію розчиненого кисню. З додаванням 1% (v/v) Н-гексану або н-додекану в середовище, вироблення лікопену було на 51% або 78%, а вироблення β-каротину на 44% або 65% вище, ніж у контролі. Найвище виробництво лікопіну та β-каротину, 533 мг/л та 596 мг/л, було отримано, коли додавали разом 1% (v/v) н-додекану та 0,1% (v/v). Таке покращення може зменшити затрати на виробництво та збільшити вихід продукції[46].

Sheetal Choudhari та Rekha Singhal вивчали *Blakeslea trispora* MTCC, *Blakeslea trispora* NRRL 2895, *Blakeslea trispora* NRRL 2896, а також внутрішньовидове спаровування обох типів штаму для оптимального продукування β-каротину. Внутрішньо специфічне спаровування обох типів штаму збільшило вихід β-каротину до значного рівня (98±2 мг/л) порівняно з дикими штамми. Вчені сліdkували за впливом різних компонентів середовища, таких як вуглець, азот та сульфати, та зміна параметрів процесу культивування, таких як рН та розмір посівного матеріалу, на виробництво β-каротину. Для оптимізації компонентів середовища був використаний один факторний метод за раз. Методологія поверхні відгуку (RSM) була надалі використана для визначення оптимальних значень змінних процесу для максимального виробництва β-каротину. Значне збільшення виробництва β-каротину (139±1мг / л) було досягнуто за допомогою RSM[47].

В 2014 китайські дослідники застосували методологію поверхні відгуку (RSM), засновану на конструкції Бокса-Бенкена (BBD). Hong-Bo Wang та співавт. використали RSM для дослідження впливу ультразвукової обробки на виробництво β-каротину *Blakeslea trispora*. Оптимізована стратегія включала піддавання триденних культур міцелію ультразвуковій обробці з фіксованою частотою 20 кГц,

потужністю 491 Вт, тривалістю режиму 3 хв, робочим часом 3 с та часом відпочинку 5,8 с, повтореним чотири рази з інтервалом у 24 години. Зростання міцелію не спостерігалось при ультразвуковій стимуляції, однак метаболізм глюкози збільшився приблизно на 10%, а швидкість поглинання імідазолу в клітини збільшилася приблизно в 2,5 рази. Після 6-денного посіву методом було отримано 173 мг/л β -каротину та 82 мг/л лікопіну, що представляло приріст майже на 40,7% та 52,7%, відповідно, над урожаєм, отриманими в культурах без ультразвукової обробки[48].

Martín Moliné та співавт. у своїй роботі описали дріжджі *Rhodotorula* здатні синтезувати різні пігменти високої економічної цінності, як β -каротину, торулену та горикодин. Однак низький рівень виробництва пігменту в цих мікроорганізмах обмежує його промислове застосування. Вчені дають у своїх дослідженнях деякі стратегії для отримання гіперпігментарних мутантів *Rhodotorula mucilaginosa* за допомогою ультрафіолетового випромінювання, процедури загальної екстракції каротиноїдів, а також метод ідентифікації кожного[49].

У дослідженні J M Araya-Garay та співавт. використовували некаротиногенні дріжджі *Pichia pastoris* X33, як рецептор генів, що кодують β -каротин, з метою отримання нових рекомбінантних штамів, здатних продукувати різні каротиноїдні сполуки. Дослідники розробили та сконструювали дві плазмиди pGAPZA-EBI та pGAPZA-EBI-L, що містять гени, що кодують лікопін та β -каротин. Плазміда pGAPZA-EBI експресує три гени, crtE, crtB та crtI, які кодують три каротиногенні ферменти, геранілгеранілдіфосфатсинтазу, фітоенсинтазу та фітоендесатуразу. Інша плазміда, pGAPZA-EBI-L, несе не тільки три вищезазначені гени, але також ген crtL, який кодує β -циклазу лікопену. Гени crtE, crtB та crtI були отримані з *Erwinia uredovora*, тоді як crtL був клонований з *Ficus carica* (JF279547). Плазмиди інтегрували в геномну ДНК *P. pastoris*, і отримані клони Pp-EBI та Pp-EBI-L були відібрані для отримання та очищення лікопіну і β -каротину. Каротиноїди, вироблені рекомбінантними клонами *P. pastoris*, були якісно та кількісно проаналізовані за допомогою рідинної хроматографії з високою роздільною здатністю у поєднанні з детектором фотодіодних решіток. Ці аналізи підтвердили, що рекомбінантні клони

P. pastoris дійсно продукували лікопін та β-каротині було досягнуто вихід продукту 1,141 мкг лікопіну та 339 мкг β-каротину на грам клітин (сухої маси)[50].

Оскільки каротиноїди важливі як природні антиоксиданти, метою Davinder Pal Singh та співавт. було знайти нове хороше джерело цих пігментів. Вчені публікують роботу в якій описують зелену мікродорість *Asterarcys quadricellulare* PUMCC 5.1.1 як нового та хорошого виробника каротиноїдів. Організм виробляв $35 \pm 1,75$ мкг каротиноїдів на мг сухої біомаси протягом стаціонарної фази в контрольних культурах. Зростання та вироблення каротиноїдів у досліджуваній мікродорості були оптимізовані за рахунок варіювання поживних середовищ для росту, рН, джерела азоту та фосфатів, солоності, якості світла, інтенсивності та тривалості. Оптимізованими умовами для виробництва каротиноїдів були: Bold basal (BB) середовище з рН 8,5, що містить 10 мМ нітрату, 3,5 мМ фосфату та 0,17 мМ солоності. Вирощування культур у вищезазначених оптимізованих умовах призвело до майже 3,0-кратного збільшення виробництва каротиноїдів порівняно з контрольними культурами, вирощеними в немодифікованому середовищі BB. За допомогою НРТЛС чотири каротиноїди були ідентифіковані як β-каротин, лютеїн, астаксантин та кантаксантин. Далі каротиноїди також відокремлювали та очищали за допомогою флеш-хроматографії, а кількість очищених каротиноїдів визначали за допомогою НПЛС. Організм виробляв 47.0, 28.7, 15,.5 та 14.0 мкг β-каротину, лютеїну, астаксантину та кантаксантину на 1 мг сухої біомаси в оптимізованих умовах. Кількість загальних каротиноїдів (118 мкг/мг сухої біомаси), вироблених *Asterarcys quadricellulare* PUMCC 5.1.1 в оптимізованих умовах культивування, була значно вищою, ніж у контрольній культурі. Таким чином, цей штам є перспективним кандидатом на виробництво каротиноїдів на комерційному рівні[51].

1.3.2 Вітамін С

Аскорбінова кислота - органічна сполука, яка необхідна для нормального функціонування сполучної і кісткової тканини. Виконує біологічні функції відновлення і коферменту деяких метаболічних процесів, є антиоксидантом. Біологічно активний (здатний брати участь в біохімічних процесах) тільки один з ізомерів - L-аскорбінова кислота, звана також вітаміном С.

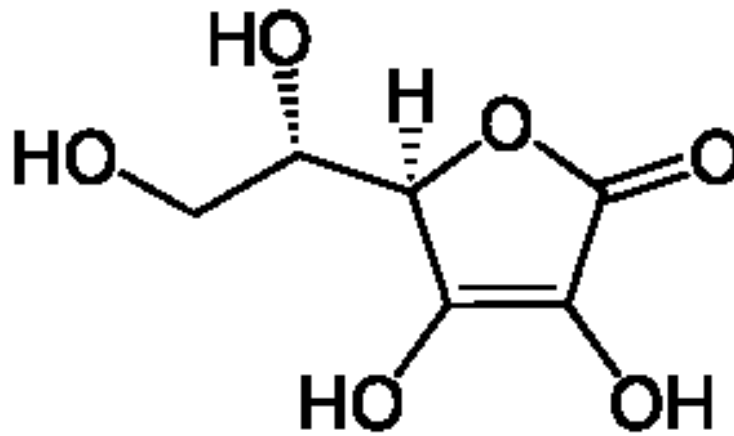


Рис. 2 Аскорбінова кислота

2-кето-L-гулонова кислота (2-KLG), безпосередній попередник вітаміну С, в даний час виробляється двоступеневим способом ферментації з D-сорбіту. Однак цей шлях залучає три бактерії, що робить систему мікс-культури складною та зайвою. Таким чином, заміна звичайного двоступеневого процесу бродіння на одноступінчастий процес може стати революційною у галузі виробництва вітаміну С.

У своєму дослідженні Lili Gao та співавт. ввели різні комбінації п'яти L-сорбозодегідрогеназ (SDH) та двох L-сорбозондегідрогеназ (SNDH) з *Ketogulonicigenium vulgare* WSH-001 в *Gluconobacter oxydans* WSH-003, промисловий штам, що використовується для конверсії d-сорбітолу до L-сорбози. Оптимальна комбінація давала 4,9 г/л 2-KLG. Найкращий рекомбінантний штам (*G. oxydans* / pGUC-k0203-GS-k0095) продукував 32,4 г/л 2-KLG через 168 годин. Крім того, біосинтез піролохіноліну хініну (PQQ), кофактора цих дегідрогеназ, був посилений для поліпшення виробництва 2-KLG. За допомогою поетапної метаболічної інженерії *G. oxydans* остаточне виробництво 2-KLG було покращено до 39,2 г/л, що було в 8,0 разів вище, ніж отримане за допомогою незалежної експресії дегідрогеназ. Результати цих досліджень наближають нас до остаточного одноетапного виробництва вітаміну С в промислових масштабах[52].

Teruhide Sugisawa, Taro Miyazaki та Tatsuo Hoshino вивчали мікробне виробництво L-аскорбінової кислоти з D-сорбіту, L-сорбози, L-гулози та L-сорбозону за допомогою *Ketogulonicigenium vulgare* DSM 4025. *Ketogulonicigenium*

vulgare DSM 4025, відомий як штам, який продукує 2-кето-L-гулоновою кислотою з L-сорбози через L-сорбозон, несподівано продукував L-аскорбінову кислоту(L-AA) з D-сорбіту, L-сорбози, L-гулози і L-сорбозона, в якості субстрату в умовах вирощування або спокою. В якості найкращого результату *K. vulgare* DSM 4025 продукував 1,37 г на літр L-AA з 5,00 г на літр L-сорбозона протягом 4 годин інкубації при 30. Передбачалося, що попередником отримання L-AA з D-сорбіту і L-сорбози, за винятком L-гулози, є фуранозна форма L-сорбозона. Вперше зафіксовано, що бактерії можуть виробляти вітамін С через L-сорбозон[53].

У роботі Jing Zhang та співавт. викладено інформацію про вплив на синтез попередника вітаміну С. У двохстадійному виробництві вітаміну С його попередник 2-кето-L-гулонова кислота (2-KLG) була синтезована *Ketogulonicigenium vulgare* шляхом спільного культивування з *Bacillus megaterium*. Швидкість росту клітин *K. vulgare* і продукції 2-KLG була тісно пов'язана з концентрацією *B. megaterium* в системі спільного культивування. Для підвищення ефективності продукування 2-KLG, вченими була введена стратегія управління зростанням *B. megaterium* в системі спільного культивування і правильного вивільнення його внутрішньоклітинних компонентів. Лізоцим використовувався спеціально для пошкодження структури клітинної стінки *B. megaterium* і подальшого пригнічення росту її клітин. Коли 10 000 Од/мл лізоциму подавали в систему для спільного культивування через 12 год, швидкість росту *K. vulgare*, швидкість споживання сорбози і продуктивність 2-KLG могли збільшуватися на 27,4%, 37,1% і 28,2%. Дослідження мають перспективи на покращення технології виробництва 2-KLG[54].

Нігерійські дослідники направили свої зусилля на вироблення аскорбінової кислоти фузантними клітинами *Aspergillus flavus* та *Aspergillus tamarii*. Складність і дорога вартість виготовлення аскорбінової кислоти вимагає розробки простого і економічного способу її виробництва. Таким чином, в своєму дослідженні вчені вивчали потенціал соматичного гібрида (фузантної клітини) *Aspergillus flavus* і *Aspergillus tamarii* для збільшення виробництва аскорбінової кислоти. Дослідження по оптимізації процесів ферментації аскорбінової кислоти проводилися в діапазоні рН 4-8, діапазоні температур 30-45 ° С і діапазоні швидкості перемішування 60-160

об/хв протягом 96 годин ферментації. Кількісне визначення аскорбінової кислоти проводили титриметричним методом. Спостерігалася значна різниця в продукції аскорбінової кислоти фузантними і батьківськими клітинами. Аскорбінова кислота, що продукуються соматичним гібридом, становила 8,85 г/л в порівнянні з його батьківськими штамами (3,92 г/л і 4,57 г/л). Однак рН, температура і швидкість перемішування не зробили значного впливу на продукцію аскорбінової кислоти. Дослідження показало, що максимальне виробництво аскорбінової кислоти 9,95 г/л було отримано при рН 5,0, температурі 40°C і швидкості перемішування 100 об/хв при 96 годинах ферментації. Це дослідження показує потенціал фузантних клітин для збільшення виробництва аскорбінової кислоти[55].

1.3.3 Вітамін D

Вітамін D є важливим вітаміном для здоров'я людини і відіграє життєво важливу роль у регуляції та підтримці гомеостазу кальцію. Нестача вітаміну D також пов'язана з підвищеним ризиком раку, гіпертонії, аутоімунних захворювань та діабету

Вітамін D - це жиророзчинний вітамін (неполярна сполука), який міститься у двох основних формах, а саме D₂ і D₃. Форма D₃ в основному міститься в продуктах тваринного походження, таких як яйця, м'ясо та риба, тоді як форма D₂ в основному присутня в плодових тілах грибів. Гриби містять високий рівень ергостеролу, попередника вітаміну D₂.

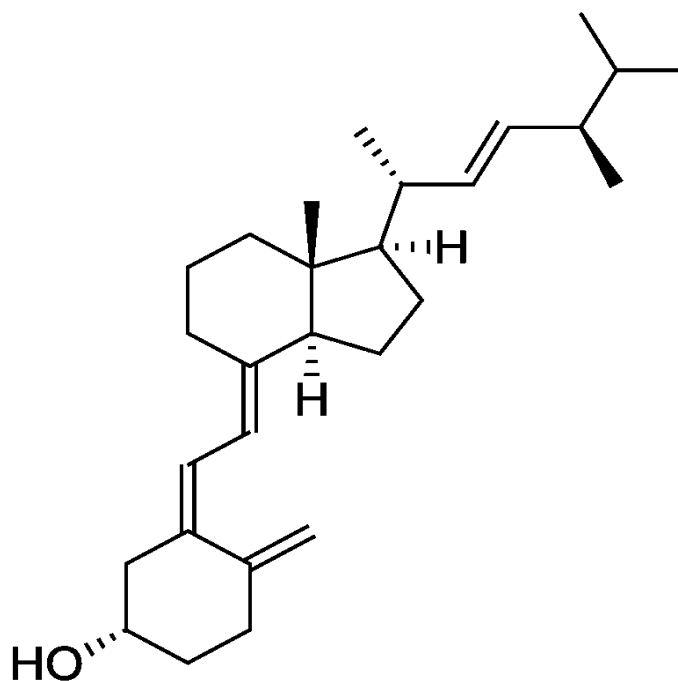


Рис.3 Ергостерол

Konstantinos Papoutsis та співавт. у своїй описали продуктивний спосіб отримання ергостеролу та вітаміну D₂. Під час виробництва грибів утворюється велика кількість грибних відходів (що складає до 20% від загального виробництва) і в основному складається з грибів, які не відповідають вимогам, встановленим роздрібною торгівлею через неправильно сформовані ковпачки та або стебла. Гриби відрізняються високим вмістом ергостеролу, який перетворюється на вітамін D₂ після впливу природного або штучного ультрафіолетового (УФ) опромінення. Отже, грибні відходи можна використовувати як джерело для відновлення як ергостеролу, так і вітаміну D₂. В своєму дослідженні вчені пропонують методи відновлення ергостеролу та вітаміну D₂, вони здійснюються шляхом застосування або звичайних методів, таких як екстракція Сокслета, або нетрадиційних, таких як екстракція за допомогою ультразвуку, екстракція за допомогою мікрохвильової печі, глибоких евтектичних розчинників, екстракція надкритичної рідини та екстракція рідини під тиском. Застосування нетрадиційних технологій видобутку, може призвести до отримання чистих екстрактів без омилення, що зменшить час вилучення. Цей спосіб отримання препарату безвідходний та простий, а отже дає більший прибуток. Вчені зазначили, що для застосування в фармацевтичній галузі грибного екстракту ергостеролу потрібні клінічні дослідження[56].

Китайськими дослідниками були вивчені параметри виробництва ергостеролу. Tianwei Tan, Mu Zhang та Hua Gao описали взаємозв'язок між біомасою, вмістом ергостерину в *Saccharomyces cerevisiae* та такими параметрами, як розчинений кисень (DO), швидкість поглинання кисню (OUR), рН, концентрація глюкози. Для оптимізації ферментації ергостерину вчені застосували періодичне завантаження з постійною швидкістю подачі та підживленнями. Було виявлено, що DO може служити ефективним контрольним параметром для періодичної ферментації дріжджів з підживленням. Коли DO підтримували на рівні 12% ($\pm 1\%$) і використовували періодичну подачу імпульсного харчування, загальний вихід ергостеролу міг бути збільшений до 1160 мг/л. Ці результати можуть покращити технологію виготовлення ергостерину *Saccharomyces cerevisiae*[57].

РОЗДІЛ 2. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ВИПУСКУ СУБСТАНЦІЇ ДЛЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ТА ВИРОБНИЦТВА ГОТОВОЇ ФОРМИ

2.1. Передумови виробництва ЛЗ.

2.1.1. Аналіз фармакологічних властивостей цільового ЛЗ, галузей використання

Каталаза - ключовий фермент, який використовує в якості субстрату пероксид водню, нерадикальний АФК. Молекулярна маса каталази 240 кДа. Цей фермент відповідає за нейтралізацію шляхом розкладання перекису водню, підтримуючи тим самим оптимальний рівень молекули в клітині, що також важливо для процесів сигнальної системи клітин. Важливість ферменту можна визначити з факту його прямої та непрямой участі у багатьох захворюваннях та інфекціях.

Будь-яке порушення балансу рівня антиоксидантів та реактивних речовин призводить до фізіологічного стану, який називається "окислювальний стрес". Каталаза є одним з найважливіших антиоксидантних ферментів, який значною мірою пом'якшує окислювальний стрес, руйнуючи клітинну пероксид водню з утворенням води та кисню. Дефіцит або порушення функціонування каталази передбачається пов'язаним з патогенезом багатьох вікових дегенеративних захворювань. Саме тому в багатьох лабораторіях докладаються зусилля для вивчення його використання, як потенційного препарату для лікування таких захворювань.

Окисний стрес причетний до багатьох метаболічних та неврологічних дегенеративних розладів. Дегенеративні захворювання, де функція та структура тканини або органів з часом погіршуються, такі як хвороба Альцгеймера, хвороба Паркінсона, діабет, катаракта, рак та серцево-судинні захворювання, були віднесені до стану окисного стресу та процесу природного старіння. Таким чином, окислювальний стрес, старіння та дегенеративні захворювання взаємопов'язані.

| | | | | | | | | |
|----------|--|----------------|--------|------|---|-------------|------|----------|
| | | | | | НУХТ БТЕК 02.02.08 КР ПЗ | | | |
| | | | | | | | | |
| Змн. | | № докум. | Підпис | Дата | РОЗДІЛ 2. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ВИПУСКУ СУБСТАНЦІЇ ДЛЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ТА ВИРОБНИЦТВА ГОТОВОЇ ФОРМИ | Літ. | Арк. | Адквітів |
| Розроб. | | Лутай О.О.. | | | | | 34 | 110 |
| Керівник | | Воронцов О.О.. | | | | Кафедра БТМ | | |
| Реценз. | | | | | | | | |
| Контр. | | | | | | | | |
| Затверд. | | Стабніков В.П. | | | | | | |

Організм має захисний механізм від окисного стресу, в якому як ферментативні, так і неферментативні молекули є основними компонентами. Ця антиоксидантна захисна система складається з деяких ферментів, деяких білків та кількох молекул з низькою молекулярною масою. Антиоксидантні ферменти можуть каталітично видаляти реакційноздатні речовини. Наприклад, супероксиддисмутаза демутує супероксид у перекис водню, який, у свою чергу, розкладається каталазою або глутатіонпероксидазою.

Дефіцит або порушення роботи каталази пов'язані з багатьма захворюваннями, такими як цукровий діабет, вітіліго, серцево-судинні захворювання, хвороба Вільсона, гіпертонія, анемія, деякі дерматологічні розлади, хвороба Альцгеймера, біполярний розлад та шизофренія. Повідомлялося, що аномалія активності каталази успадковується при каталасемії, яка є рідкісним генетичним розладом (також відомим як хвороба Такахари). Це аутосомно-рецесивний ознака, який характеризується зниженим рівнем каталази. Каталаза відіграє головну роль у регулюванні клітинного рівня перекису водню, а катаболізм перексиду водню захищає клітини від окисного впливу, наприклад, захищаючи β -клітини підшлункової залози від пошкодження перекисом водню. Повідомлялося про низьку активність каталази у хворих на шизофренію, таких як і у хворих на атеросклероз. На сьогоднішній день каталазу застосовують як один із компонентів поліферментних препаратів, для лікування таких захворювань як гастрит, панкреатит, холецистит.

Вчені багатьох країн світу намагаються довести ефективність застосування каталази, як біоантиоксидантного ферменту, в якості профілактики метаболічних та неврологічних дегенеративних розладів [58].

Окрім, цього каталазу застосовують у якості фермента, що може бути використаний у спеціальному застосуванні для отримання сиру. У разі виробництва деяких видів сирів, таких як швейцарські, у стані пастеризації використовується перекис водню, сильний окислювач, токсичний для клітин. Він використовується для збереження натуральних молочних ферментів, корисних для готового продукту та розвитку смаку сиру. Незважаючи на те, що висока температура пастеризації

може розщепити ці ферменти, залишки перекису водню в молоці перешкоджають бактеріальним культурам, необхідним для реального виробництва сиру, тому всі його сліди повинні бути видалені. Для перетворення перекису водню у воду, а також молекулярного кисню додають ферменти каталази.

Основними застосуваннями каталази у харчовій промисловості є робота з іншими ферментами, такими як глюкозооксидаза, їх використання ефективно для консервування їжі та переробки яєць, та сульфідрилоксидази, яка в асептичних умовах може усунути ефект летких сульфідрильних груп, які утворюються внаслідок теплової індукції і відповідають за неприємний аромат в ультрапастеризованому молоці[59].

2.1.2. Перелік виробників кінцевого продукту і виробників (постачальників) субстанції.

Станом на сьогоднішній день в Україні немає заводу, який виготовляє каталазу. Українська компанія «Арт Лайф» виготовляє комплекс ферментів до складу якого входить каталаза. Також препарати на основі каталази постачаються з США «Catalase Antioxidant Caps», «Biotics Research Corporation»[60,61].

Основний постачальник субстанції Китай [62].

2.1.3. Розрахунок потреби у субстанції для випуску ЛЗ

Каталаза виробляється за допомогою культивування бактерій *Serratia marcescens SYBC08*, то знаючи продукувальну здатність продуцента, можемо розрахувати кількість культуральної рідини, яку необхідно одержати, щоб забезпечити річну потребу для лікування захворювань.

Каталаза буде використовуватися, як головний компонент у складі дієтичної добавки для профілактичного прийому при такому захворюванні, як панкреатит. В Україні захворюваність на гострий панкреатит становить 4,6 випадків на 10 000 населення [63,64].

Ми підраховали кількість людей хворих на панкреатит в Україні за станом на 2021 рік і це приблизно 20000 чоловік, з урахуванням конкурентоспроможності ми візьмемо половину хворих тобто 10000 чоловік. За інформацією в інструкції

ферментного комплексу вказано курс лікування в середньому 6 місяців, 1 таблетка 3 рази на день, в одній порції на день 15 мг каталази:

порція на один день – 15 мг

180 днів = 2,7 г- потреба ферменту на курс лікування

Звідси ми можемо поррахувати приблизну потребу в каталазі для виготовлення ферментного комплексу на профілактику лікування даних захворювань у населення України.

2,7 г – на 1 хворого на курс лікування

X - 10000 осіб

27 кг – кількість каталази на рік для лікування усіх хворих;

2.2. Розрахунок потужності виробництва

Даний фермент виробляється за допомогою культивування бактерій *Serratia marcescens SYBC08*, якщо ми знаємо синтезувальну здатність нашої бактреї , можемо розрахувати яка нам потрібна кількість культуральної рідини , яку потрібно одержати , щоб задовольнити річну потребу.

На 1 л культуральної рідини припадає 19 г біомаси клітин нашої бактерії. Концентрація ферменту в культуральній рідині становить 0,079 г/л .

Кількість культуральної рідини, необхідної для отримання 27 кг катлази становить:

0.079 г – 1 л

27000 г – X л;

X = 341 772 л культуральної рідини.

Враховуючи сумарні втрати цільового продукту при виділенні (15 %), необхідно отримати таку кількість культуральної рідини: $V_{кр} = 341\,772 / 0,85 = 402\,100\text{ л} = 402,1\text{ м}^3$

2.3. Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера

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

Приймаємо кількість робочих трудоднів (Трд) 90, тоді кількість культуральної

рідини на добу (V_d) становитиме:

$$V_d = V_{кр}/T_{рд} = 402\,100 / 90 = 4467,7 \text{ л.}$$

Кількість продукту за цикл:

$$V_{ц} = (K_1 \times V_d \times T_{цф})/24 = (1,1 \times 4467,7 \times 50)/24 = 10238,4 \text{ л/цикл,}$$

де $T_{цф}$ – цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу (40 год) та час підготовки ферментера до роботи (10 год). K_1 – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій ($K_1=1,1 - 1,5$).

Підготовка ферментера включає: миття та огляд (2 год), перевірка на герметичність (2 год), стерилізація (2 год), охолодження (1 год), завантаження середовища (1,5 год), засів (0,5 год), вивантаження культуральної рідини (1 год).

Кількість циклів становить:

$$N_{ц} = 402\,100 / 10238,4 = 39 \text{ цикл.}$$

10238,4 л культуральної рідини можна отримати у ферментері, геометричний об'єм якого має становити:

$$V_{г} = V_{цк}/K_{зап} = 10238,4 / 0,5 = 20\,476,8 \text{ л} = 20,5 \text{ м}^3$$

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

Підбираємо найближчий за за геометричним об'ємом ферментер $V_{гф} = 20 \text{ м}^3$.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення $K_{зап} = V_{ф} / V_{гф} = 10238,4 / 20000 = 0,51$, що не перевищує заданого значення (0,4 – 0,65).

2.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

За виробничий цикл отримують $V_{кр} = 10238,4$ л культуральної рідини. При одержанні культуральної рідини потрібно врахувати її втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 до 15%.

Отже, кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом становитиме:

$V_{роб.1} = V_{кр}/(1-E_{ф}) = 10238,4 / (1-0,1) = 11376$ л, де $E_{ф}$ – втрати культуральної рідини під час біосинтезу.

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері з робочим об'ємом $V_{роб.1} = 11376$ л.

Розраховуємо можливий геометричний об'єм ферментера ($V_{ф}$), що становить

$$V_{ф1} = V_{роб.1}/K_{зап} = 11376/0,5 = 22752 \text{ л.}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{сф} = 20 \text{ м}^3$, уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення $K_{зап1} = V_{роб.1}/V_{сф} = 11376/20000 = 0,56$.

Отриманий коефіцієнт заповнення входить у задані межі 0,4 – 0,65.

Кількість посівного матеріалу (доза) для ферментера становить 10 % від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища в ферментері буде становити:

$V_{пс1} = V_{роб.1}/(1+X_{ф}) = 11376/(1+0,1) = 10341,8 \text{ л}$, де $X_{ф} = 0,1$ – доза посівного матеріалу для ферментера.

Кількість посівного матеріалу становить

$$V_{пм1} = V_{роб.1} - V_{пс1} = 11376 - 10341,8 \text{ л} = 1034,2 \text{ л.}$$

Для одержання 1 034,2 л інокуляту в посівному апараті враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять 5%.

Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становитиме:

$$V_{роб.2} = V_{пм1}/(1-E_{па}) = 1\,034,2/(1-0,05) = 1\,088,6 \text{ л.}$$

Кількість інокуляту $V_{роб.2} = 1\,088,6 \text{ л}$ можна одержати під час культивування продуцента у посівному апараті об'ємом:

$$V_{па2} = V_{роб.2}/K_{зап} = 1\,088,6/0,5 = 2\,177,2 \text{ л.}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{сф} = 2 \text{ м}^3$, уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення

$$K_{з2} = V_{роб.2}/V_{сф} = 1\,088,6/2000 = 0,54.$$

Отриманий коефіцієнт заповнення входить у задані межі 0,4 – 0,65.

Кількість посівного матеріалу (доза) становить 10 % від об'єму поживного середовища.

Тоді кількість поживного середовища в посівному апараті буде становити

$V_{пс2} = V_{роб.2}/(1+X_{па}) = 1\,088,6/(1+0,1) = 989,6 \text{ л}$, де $X_{па} = 0,1$ – доза інокуляту для посівного апарату.

Кількість посівного матеріалу для посівного апарату становить

$$V_{\text{пм}2} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пс}2} = 1\,088,6 - 989,6 = 99 \text{ л.}$$

Для одержання 99 л посівного матеріалу в інокуляторі враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять 5%.

Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{роб.3}} = V_{\text{пм}2} / (1 - E_{\text{ін}}) = 99 / (1 - 0,05) = 104,2 \text{ л.}$$

Кількість інокуляту можна одержати під час культивування продуцента в інокуляторі геометричним об'ємом

$V_{\text{ін}3} = V_{\text{роб.3}} / K_{\text{зап}} = 104,2 / 0,5 = 208,4 \text{ л.}$ Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{сф}} = 200 \text{ л}$, уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення $K_{\text{з}3} = V_{\text{роб.3}} / V_{\text{сф}} = 104,2 / 200 = 0,52$

Отриманий коефіцієнт заповнення входить у задані межі 0,4 – 0,65.

Кількість посівного матеріалу (доза) для інокулятора становить 10 % від об'єму поживного середовища в інокуляторі. Тоді кількість поживного середовища в інокуляторі буде становити:

$V_{\text{пс}3} = V_{\text{роб.3}} / (1 + X_{\text{ін}}) = 104,2 / (1 + 0,1) = 94,7 \text{ л,}$ де $X_{\text{ін}} = 0,1$ – доза посівного матеріалу для інокулятора.

Кількість посівного матеріалу становить:

$$V_{\text{пм}3} = V_{\text{роб.3}} - V_{\text{пс}3} = 104,2 - 94,7 = 9,5 \text{ л.}$$

Для одержання 9,5 л посівного матеріалу в малому інокуляторі враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 5%.

Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в малому інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{роб.4}} = V_{\text{пм}3} / (1 - E_{\text{м.ін}}) = 9,5 / (1 - 0,05) = 10 \text{ л.}$$

Кількість інокуляту $V_{\text{роб.4}} = 10 \text{ л}$ можна одержати під час культивування продуцента в малому інокуляторі геометричним об'ємом

$V_{\text{ін}4} = V_{\text{роб.4}} / K_{\text{зап}} = 10 / 0,5 = 20 \text{ л.}$ Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{сф}} = 20 \text{ л}$, уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{з4} = V_{роб.4} / V_{сф} = 10/20 = 0,5.$$

Отриманий коефіцієнт заповнення входить у задані межі 0,4 – 0,65.

Кількість посівного матеріалу (доза) для малого інокулятора становить 10 % від об'єму поживного середовища в малому інокуляторі. Тоді кількість поживного середовища в малому інокуляторі буде становити:

$V_{пс4} = V_{роб.4} / (1 + X_{м.ін}) = 10 / (1 + 0,1) = 9$ л, де $X_{м.ін} = 0,1$ – доза посівного матеріалу для малого інокулятора.

Кількість посівного матеріалу становить:

$$V_{пм4} = V_{роб.4} - V_{пс4} = 10 - 9 = 1$$
 л.

Для одержання 1 л посівного матеріалу в колбах

$$V_{роб.5} = 1$$
 л.

Кількість посівного матеріалу (доза) для качалочних колб становить 10 % від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища для колб буде становити:

$V_{пс5} = V_{роб.5} / (1 + X_{кол}) = 1 / (1 + 0,1) = 0,9$ л, де $X_{кол} = 0,1$ – доза посівного матеріалу для колб.

Кількість посівного матеріалу становить:

$$V_{пм5} = V_{роб.5} - V_{пс5} = 1 - 0,9 = 0,1$$
 л.

Кількість посівного матеріалу $V_{роб.5} = 1$ л можна одержати під час культивування продуцента в качалочних колбах об'ємом $V_{колб} = 750$ мл та коефіцієнтом заповнення $K_{зк} = 0,2$.

Тоді кількість колб для отримання посівного матеріалу становитиме:

$N_{колб} = V_{пм4} / (V_{колб} \times K_{зк}) = 1000 / (750 \times 0,2) = 6,6 = 7$. Таким чином, для одержання посівного матеріалу необхідно 7 качалочних колб.

Отже, за результатами розрахунків для біосинтезу каталази *Serratia marcescens* SYBC08 приймаємо до встановлення один ферментер об'ємом 20 м³, один посівний апарат об'ємом 2 м³, один інокулятор об'ємом 200 л та один малий інокулятор об'ємом 20 л.

РОЗДІЛ 3. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ СУБСТАНЦІЇ ТА ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА ЛЗ

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

Застосування каталази як терапевтичний засіб, в фармацевтичній промисловості, надзвичайно зростає, це видно з обсягу публікацій в цій області з недавнього минулого. Каталаза - це антиоксидантний фермент, відомий своєю здатністю розкласти пероксид водню (H_2O_2) у воду та кисень. Для покращення технології виробництва цього ферменту було обрано штами, які наведені нижче.

В дослідженні Hua-Wei Zeng монофункціональну каталазу отримали з рекомбінантного штаму *Serratia marcescens* SYBC08, шляхом культивування в 7 літровому ферментері. Каталаза від цього штаму мала високу питому активність. Високий рівень виходу продукту та активності фермента, має потенційне промислове застосування цього штаму бактерій. *Serratia marcescens* SYBC08 це бактерії, що розташовані поодинокі або невеликими групами і в експоненційній фазі росту мають кокоподібну форму, в зрілій формі – паличкоподібні. Мають червоний відтінок. Клітини розміром 0,5-0,8 мікрметра на 0,9-2,0 мікрметра, утворюють спори, грамнегативні[13].

Штам морської бактерії *Acinetobacter* sp. YS0810, який дослідили Xinhua Fu, синтезує каталазу з доволі високою активністю та виходом ферменту. Висока стійкість до луку та термостабільність каталази, дають нам хороші надії на застосування в медичній промисловій галузі [12].

У табл. 3.1 представлено порівняльну характеристику особливостей одержання ферменту каталази з використанням різних рекомбінантних штамів мікроорганізмів.

| | | | | | | | |
|----------|----------------|--------|------|---|--------------------------|------|----------|
| | | | | | НУХТ БТЕК 02.02.08 КР ПЗ | | |
| Змн. | № докум. | Підпис | Дата | | | | |
| Розроб. | Лутай О.О. | | | РОЗДІЛ 3. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ СУБСТАНЦІЇ ТА ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА ЛЗ | Літ. | Арк. | Адквітів |
| Керівник | Воронцов О.О. | | | | | 42 | 110 |
| Реценз. | | | | | Кафедра БТМ | | |
| Контр. | | | | | | | |
| Затверд. | Стабніков В.П. | | | | | | |

Порівняльна характеристика складу поживного середовища та умов культивування продуцентів каталази

| Біологічний агент | Склад поживного середовища, г/л | Тривалість культивування, год | Особливості процесу біосинтезу | Концентрація каталази, г/л | Література |
|--------------------------------------|---|-------------------------------|---|----------------------------|---|
| <i>Serratia marcescens</i> SYBC08 | <ul style="list-style-type: none"> • Кукурудзяний екстракт – 33,8; • Лимонна кислота – 30 ; | 40 | 32,8°C, 400 об/хв, pH – 5.91, швидкість аерації 1.5 V · V ⁻¹ · min | 0,079 | Hua-Wei Zeng, Yu-Jie Cai, Feng Zhang, Da-Bing Zhang , Production, characterization, cloning and sequence analysis of a monofunctional catalase from <i>Serratia marcescens</i> SYBC08, Journal of Basic Microbiology 2011, 51, 205–214 https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/jobm.201000147 |

| Біологічний агент | Склад поживного середовища, г/л | Тривалість культивування, год | Особливості процесу біосинтезу | Концентрація каталази, г/л | Література |
|---------------------------------|--|-------------------------------|--------------------------------|----------------------------|---|
| <i>Acinetobacter</i> sp. YS0810 | <ul style="list-style-type: none"> • Пептон – 20; • М'ясний екстракт -2; • NH₄Cl – 2; • KH₂PO₄ – 3.5; | 24 | 28°C, 220 об/хв | 0,01 | <p>Xinhua Fu,Wei Wang,Jianhua Hao,Xianglin Zhu and Mi Sun, Purification and Characterization of Catalase from Marine Bacterium <i>Acinetobacter</i> sp. YS0810, BioMed Research International, Volume 2014: 1-8 https://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/409626/</p> |

Найголовнішим критерієм при виборі біологічного агента є його здатність рости на найбільш дешевих поживних середовищах.

Тому наступний етап вибору продуцента включає розрахунок та порівняння вартості поживного середовища для культивування продуцентів, що здатні до синтезу каталази у більших концентраціях (табл. 3.2).

Таблиця 3.2

Вартість компонентів поживного середовища для культивування продуцентів каталази

| Продуцент | Компонент поживного середовища, г/л | Ціна компонента, грн./кг | Вартість компонента (грн.) на 1 л середовища | Джерело інформації* |
|--------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------|--|---------------------|
| <i>Serratia marcescens</i> SYBC08 | Кукурудзяний екстракт, 33.8 | 135 | 4,5 | 65 |
| | Лимонна кислота, 30 | 40 | 1.2 | 66 |
| | Вартість 1 л середовища – 5.7 | | | |
| <i>Acinetobacter sp.</i> YS0810 | Пептон , 20 | 27 | 0.54 | 67 |
| | М'ясний екстракт, 2 | 7380 | 147.6 | 68 |
| | NH ₄ Cl , 2 | 60 | 0.1 | 69 |
| | KH ₂ PO ₄ , 3.5 | 60 | 0.2 | 70 |
| | Вартість 1 л середовища – 148.44 | | | |

*ціни актуальні на грудень місяць 2021 року

Проаналізувавши дані *табл. 2.2* можна зробити висновок, що середовище, яке використовується для культивування *Serratia marcescens SYBC08*, вартість якого становить 5,7 грн, що є найдешевшим порівняно з середовищами для інших рекомбінантних штамів мікроорганізмів.

Завершальний етап вибору продуцента каталази полягає у розрахунку умовної вартості 1 г каталази і кількості утвореного продукту за годину (*табл. 3.3*).

Таблиця 3.3

Умовна вартість каталази

| Біологічний агент | Вартість 1 л середовища, грн | Концентрація каталази, г/л | Умовна вартість 1 г каталази, грн./ г | Тривалість культивування год | Кількість утвореної каталази за годину, г/год |
|-----------------------------------|------------------------------|----------------------------|---------------------------------------|------------------------------|---|
| <i>Serratia marcescens SYBC08</i> | 5.7 | 0,079 | 72,1 | 40 | 0,001 |
| <i>Acinetobacter sp. YS0810</i> | 148.44 | 0,01 | 14844 | 24 | 0,0004 |

Отже, умовна вартість 1 г каталази при культивуванні *Serratia marcescens SYBC08* є нижчою (72,1 грн/г) є меншою у порівнянні з умовною вартістю каталази, одержаною культивуванням *Acinetobacter sp. YS0810* (14844 грн/г). Продуктивність біосинтезу за допомогою штаму *Serratia marcescens* є вищою, а ніж у конкурентного штаму

Таким чином, найкращим біологічним агентом для виробництва каталази є *Serratia marcescens SYBC08*, оскільки умовна вартість 1 г каталази при культивуванні даного продуцента є найменшою, а продуктивність біосинтезу високою.

3.2. Перевірочний розрахунок складу поживного середовища.

Розрахунок поживного середовища (г/л):

Кукурудзяний екстракт – 33,8;

Лимонна кислота – 30

Вихід біомаси – 19 г/л

Концентрація цільового продукту – 0,079 г/л

Mг(каталази) – 230 000

Розрахунок вуглецю:

Розрахуємо скільки вуглецю міститься у 0.079 г каталази. Отже у 230 000 г каталази міститься 115 000 г вуглецю, а в 0.079 г каталази $(115\ 000 \times 0.079) \div 230\ 000 = 0.0395$ г вуглецю.

Далі розраховуємо, у скількох грам кислоти 0.0395 г вуглецю враховуючи, що вміст вуглецю у лимонної кислоти становить 37.5 % . Отже у 30 г кислоти міститься 11,25 г вуглецю, а 0.0395 г вуглецю міститься у $(0.0395 \times 30) \div 11,25 = 0.10$ г кислоти.

Якщо враховувати що 40% йде на холосте окиснення то: $(0.1 \times 0.4) + 0.1 = 0.14$ г кислоти

Потреби для синтезу біомаси

У біомасі міститься 50%, то у 19 г біомаси містить $19 \times 0.5 = 9.5$ г. Ця кількість вуглецю міститься у $(9.5 \times 10) \div 11,25 = 8,4$ г .

Враховуючи 40% втрат субстрату на холосте окиснення, для одержання 19 г/л біомаси у середовищі повинно бути $(8.4 \times 0.4) + 8.4 = 11,76$ г кислоти

Джерела С достатньо для нормального синтезу 19 г біомаси та 0.079 г каталази

Розрахунок азоту:

Розраховуємо скільки азоту міститься у 0.079 г каталази. Отже у 230000 г каталази – 41400 азоту, тоді в 0.079 г $(41400 \times 0.079) \div 230000 = 0.014$ г азоту.

Далі розраховуємо, у скількох грам кукурудзяного екстракту 0.014 г азоту враховуючи, що вміст азоту у кукурудзяному екстракті становить 4,5 % . Отже у 33,8 грамах з маси екстракту – 1.52 г азоту, а 0.014 г азоту міститься у $(0.014 \times 33,8) \div 1.52 = 0.31$ грамах екстракту.

Потреби для синтезу біомаси

В клітині бактерій міститься 10 % азоту, тоді у 19 г біомасі містить $19 \times 0.1 = 1,9$ г азоту. Ця кількість азоту міститься у $(1,9 \times 33,8) \div 1.52 = 42,2$ г екстракту.

Σ ма в пс = $42,2 + 0,31 = 43$ г потрібно екстракту для синтезу 19 г біомаси та 0.079 г каталази.

3.3. Обґрунтування способу культивування

Перш ніж обирати ферментер, який буде використовуватися для одержання каталази бактеріями *Serratia marcescens SYBC08*, необхідно визначитися, які умови проведення процесу він повинен забезпечувати. Ці умови безпосередньо залежать від способу культивування і фізіолого-біохімічних особливостей продуцента.

- по відношенню до кисню – аероб;
- рН, оптимальне значення для росту і біосинтезу становить 5.91;
- бактерія має температурний оптимумом 33 °С ;
- час культивування 40 год
- швидкість аерації $1.5 \text{ V} \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{min}$

Існують такі способи культивування мікроорганізмів : поверхневе , глибинне, періодичне, безперервне, проміжні. Для нашого *Serratia marcescens SYBC08* та для підтримання асептичного виробництва, краще всього підійде глибинне культивування, яке проводиться на рідких поживних середовищах, в яких мікроорганізми розвиваються по всій товщі живильного середовища.

3.4. Обґрунтування вибору типу ферментеру

Наш мікроорганізм є аеробом, тому процес ферментації проходить за присутності кисню. Потрібно щоб до нашого середовища постійно потрапляло стерильне чисте повітря, Так як наш біологічний агент культивується глибинно, доречно буде вибрати ферментер з перемішуючим пристроєм і барботером.

Для цього нам підходить ферментер з комбінованим підведенням енергії. У цих апаратах встановлений комбінований підвід енергії до газової фази - для аерації і до рідкої фази для перемішування. Ферментери цього типу широко поширені у промисловому виробництві. Ферментатор представляє собою циліндричний посудину зі сферичним днищем, забезпечений механічною мішалкою і барботером

(рис. 3.1). Барботери встановлюються, як правило, під нижнім ярусом мішалки і можуть бути різної конструкції. До функцій перемішувачів, входить забезпечення відсутності зон застою, а також збереження рівномірного температурного поля по всьому об'єму апарату. Для перемішування культуральної рідини найбільшого поширення набули механічні мішалки. Рух від мішалки передається рідині, в результаті чого утворюється вихровий потік. При високому числі обертів мішалки утворюється центральний вир. Середовище починає обертатися з тією ж швидкістю, що і мішалка, і перемішується недостатньо. Для створення турбулентного руху всередині апарату встановлюють відбивні перегородки. Вони виготовляються з листової нержавіючої сталі в формі вертикальних лопаток і розміщуються радіально з невеликим проміжком у стінок ферментера. Число відбивних перегородок зазвичай від 4 до 6. Швидкість перемішування повинна бути достатньо високою .

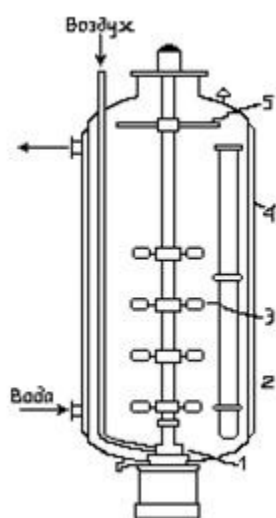


Рис. 3.1 Ферментер з механічним перемішуванням: 1 - барботер; 2 - відбивна перегородка; 3 - мішалка; 4 - сорочка;

3.5. Обґрунтування стадій виділення і очищення субстанції для виробництва лз

Для початку відділяємо біомасу від культуральної рідини центрифугуванням. Каталаза є ендоферментом, оберемо для промислового використання спосіб дезінтеграції ультразвуковим методом. Очищення суспензії від залишків клітин мікроорганізмів і білків здійснюється за допомогою ультрафільтрації. Процеси

ультрафільтрації та концентрування використовуються в відомих способах отримання ферментів.

3.5.1 Відділення біомаси від культуральної рідини центрифугуванням

Для концентрування біомаси на сьогоднішній день застосовуються такі методи:

- фільтрація;
- сепарація;
- флотація;
- центрифугування.

Фільтрування – відділення твердої фази від рідкої шляхом проходження через фільтруючий матеріал або через полімерну сітку з відповідним діаметром отворів .

Недоліки процесу фільтрування заключаються в великих втратах біомаси за рахунок проходження частини клітин через пори фільтруючого матеріалу, що засмічується і потребує заміни чи регенерації .

Сепарація – процес відділення твердої фази від рідкої, оснований на відділенні часточок з різними характеристиками. Рушійною силою процесу являється відцентрова сила .

Ефективність сепарування пропорційна частоті обертів барабану, діаметру барабану, розміру часток, різниці густин твердої та рідкої фаз. Недоліками є підвищена енергоємність процесу .

Флотація – виділення з рідких твердих часток або часток іншої рідини за допомогою продування крізь неї газу. Флотація заснована на прилипанні часток, які треба виділити до пухирців газу. Недоліком флотації являються великі втрати біомаси [71].

Для відділення біомаси від культуральної рідини, обираємо спосіб центрифугування. Для нашого процесу , підійде центрифуга автоматизована осаджувальна. Для поділу суспензій, що погано фільтруються з мелкозернистою нерозчинною твердою фазою і об'ємної концентрацією 10% при розмірі часток 5-40 мкм успішно застосовуються герметизованні осаджуючі центрифуги з ножовий вивантаженням осаду. Центрифуги типу ОГН мають горизонтально розташований ротор, закріплений в підшипниках кочення. На передній кришці центрифуги

змонтовані живильна труба, механізм зрізу осаду, розвантажувальний бункер, регулятор рівнів шару завантаження і перемикання ходу ножа. Центрифуга оснащена механізмом відводу освітленої рідини, що складається з відвідної труби з силовим гідроциліндром і дроселем для регулювання швидкості повороту відвідної труби.

Суспензію можна розділяти двома способами. Перший заключається в тому, що суспензія подається в ротор до його заповнення. Потім суміш розділяють, відводять тверду фазу через відвідну трубу, а потім відводять освітлену рідку фазу. Після досягнення заданого рівня осаду подача суспензії автоматично припиниться, після чого здійснюється віджимання. Віджатий осад зрізається поворотом ножа і через бункер вивантажується з центрифуги.

Другий спосіб роботи центрифуги полягає в наступному. Суспензія подається в ротор безперервно. Тверда фаза накопичується в роторі, а освітлена рідка фаза переливається через борт і виводиться з центрифуги. Постачання центрифуги продовжують до заповнення ротора осадом. Рідка фаза, що залишилась, через відвідну трубу відходить з ротора [4].

Переваги:

- менші втрати біомаси порівняно з фільтруванням та флотацією;
- можливість автоматизувати процес;
- високий фактор розділення;
- розвинена поверхню осадження;
- високий ступінь розділення високодисперсних систем [71]

3.5.2 Обґрунтування стадії дезінтеграції клітин для витягу ферменту ультразвуковим методом

Дезінтеграція різних типів клітин може досягатися:

- фізичними методами: механічні (екструзія, ультразвук, газодекомпресія)
немеханічні (осмотичний, тепловий, холодний шок, заморожування-відтанення, дегідратація-регідратація)

-хімічними методами: дія лугів, кислот, солей, детергентів, інгібіторів, органічних розчинників;

-ензиматичними методами: дія ферментів (літичні ферменти бактерій, дріжджів, грибів).

-біологічними методами: дія фагів, бактерицидів.

В результаті дезінтеграції отримуємо дезінтеграт, який, після видалення цілих клітин, що залишилися, вже називається без клітинний екстракт.

Для виділення внутрішньоклітинного продукту біосинтезу клітин, останні необхідно зруйнувати таким чином, щоб цільовий продукт залишився неушкодженим. Найчастіше це досягається методом дезінтеграції – процесу подрібнення різних матеріалів, руйнації клітин (мікроорганізмів, зокрема) шляхом розриву клітинних оболонок.

Метод балістичної дезінтеграції, балістичні дезінтегратори характеризуються тим, що перенесення енергії від робочих органів дезінтегратора до клітини відбувається безпосередньо, під час механічного контакту або через тіла, що перемелюють.

Відомий дезінтегратор для мікроорганізмів ФУГ-1, що складається з термостатної циліндричної помольної камери, заповненої тілами, що мелють, з вхідним і вихідним каналами, а також пристроями перемішування. Помольних камера виконана у вигляді порожнього диска, вхідний і вихідний канали розташовані відповідно в центрі і по периферії камери. Що перемішує пристрій виконаний у вигляді ротора з радіальними проточками, концентрично встановленого в полуму диску.

До недоліків даного пристрою слід віднести зниження ефективності руйнування клітин мікроорганізмів в результаті зниження продуктивності через активне піноутворення в периферійній зоні дезінтегратора, з якої відведення дезінтеграту стає затрудненим [72].

Обераємо метод ультразвукової дезінтеграції. Високочастотна вібрація що викликає кавітацію, тобто утворення мікроскопічних бульбашок газу, які рухаються з великою швидкістю в клітині. Ці бульбашки забезпечують утворення гідродинамічної сили, котра призводить до руйнування клітин.

До основних переваг ультразвукового дезінтегруючого впливу на мікробні клітини слід віднести зручність та відносну легкість його організації. Енергонапруженість і продуктивність процесу можуть бути обрані в дуже широких межах. Причому прилади та установки можуть бути розраховані на створення ультразвукових полів практично будь-яких необхідних конфігурацій, розмірів, у широкому діапазоні обсягів, з прийнятними частотами та амплітудами коливань, з різними рідкими та газо-рідкими робочими середовищами тощо [73].

3.5.3 Відділення уламків клітин

Для відділення уламків клітин використовуємо метод центрифугування описаний в пункті 1.1.1. Обираємо центрифугу автоматизовану осаджувальну, але з меншим об'ємом барабану.

3.5.4 Обґрунтування способу розділення розчинів біологічно активних речовин

Діаліз – це перший вивчений і промислово розвинений мембранний процес, оскільки для його здійснення не потрібна складна апаратура і спеціальні мембрани. Сутність діалізу в тому, що якщо два розчини з різною концентрацією будь-якого компонента розділити мембраною, то почнеться природний процес дифузії, який досягає рівноваги при вирівнюванні концентрації цього компонента з обох боків мембрани. Відповідно, чим більше розходження у величинах коефіцієнтів дифузії двох компонентів, що знаходяться в розчині, тим краще вони поділяються мембраною. Зрозуміло, що білкові молекули (високомолекулярні речовини) і низькомолекулярні органічні і неорганічні молекули і іони супутніх компонентів в силу величезних відмінностей у коефіцієнтах дифузії практично повністю розділяються мембраною.

Випарювання - це процес концентрування розчинів твердих нелетких речовин шляхом часткового випаровування розчинника при кипінні рідини.

Випарювання застосовують для концентрування розчинів нелетких речовин, виділення з розчинів чистого розчинника (дистиляція) і кристалізації розчинених речовин, тобто нелетких речовин в твердому вигляді. При випаровуванні зазвичай здійснюється часткове видалення розчинника з усього обсягу розчину при його температурі кипіння. Тому випарювання принципово відрізняється від

випаровування, яке, як відомо, відбувається з поверхні розчину при будь-яких температурах нижче температури кипіння. У ряді випадків випарений розчин піддають подальшій кристалізації в випарних апаратах, спеціально пристосованих для цих цілей [71].

Для розділення розчинів біологічно активних речовин обираємо метод ультрафільтрації. Ультрафільтрація має ряд очевидних переваг, оскільки проводиться в "м'яких" умовах, що забезпечують менший відсоток зниження активності ферменту. Крім того здійснюване концентрування супроводжується очищенням від баластних низькомолекулярних домішок і збільшенням активності ферменту в 100-150 разів. Однак енерговитрати виявляються рентабельними при концентруванні розчину до вмісту сухих речовин не більше 30%, що пов'язано із забиванням пор мембрани білковими молекулами і як наслідок різким зниженням швидкості процесу.

Процес ультрафільтрації в режимі діалізу дозволяє отримувати високоочищені препарати. Для його здійснення в одержуваний концентрат постійно додають чисту воду. Така п'ятикратна промивка дозволяє в 250-300 разів підвищити активність ферментного розчину, тобто при концентрації 30% розчин містить практично один білковий ферментний препарат.

Недоліком методу ультрафільтрації слід вважати забивання пор мембрани опадами або адсорбованими молекулами, що призводить до зниження продуктивності мембранного апарату за часом. Останнє вимагає періодичного проведення промивки матеріалу мембрани. Для запобігання забивання пор мембрани осадом або адсорбованими молекулами циркуляційний насос, який використовується в цих установках, повинен забезпечити лінійну швидкість потоку рідини через мембрану близько 2-5 м/с. При таких швидкостях спостерігається значний гідравлічний опір. Для його зниження на практиці застосовують дві конструкції мембранних апаратів: трубчасті мембранні апарати і проточні з плоскими мембранними елементами, що встановлюються паралельно основному потоку розчину [71].

3.5.5. Обґрунтування способу сушіння ферментного препарату

У зв'язку з різноманітністю продуктів, що піддаються сушці, існують різноманітні конструкції сушарок. Класифікацію сушарок в загальних рисах можна представити так:

- за способом підведення теплоти сушарки поділяються на конвективні і контактні;
- по виду теплоносія – повітряні, газові, парові
- за величиною тиску в сушильній камері – працюючі при атмосферному тиску і вакуумні;
- за способом дії – періодичні та безперервні;
- за взаємного напрямку руху матеріалу і теплоносія в конвективних сушарках – прямоточні, протиточні і з перекрестним потоком;
- за конструкцією – камерні, тунельні, стрічкові, шахтні, сушарки в киплячому шарі, розпилюючі, барабанні, контактні, терморадіаційні, сублімаційні[71].

Вакуум-сушильна шафа. Сушарка працює в періодичному режимі і являє собою шафу циліндричної або прямокутної форми та закривається герметично[74].

Для зниження втрат теплоти корпус і кришку вакуум-сушильної шафи теплоізолюють. При подачі теплоносія в плити матеріал, що висушується, на полицях нагрівається й з нього випаровується волога. Для зниження температури сушіння процес проводять під вакуумом, пари вологи відводять у конденсатор. При необхідності в процесі сушіння шар матеріалу, що висушується, періодично перемішують[74].

Сушіння матеріалу у вакуум-сушильній шафі триває декілька годин, після закінчення процесу матеріал охолоджують і вивантажують із сушарки, потім процес сушіння знову повторюють[74].

Перевагою вакуумних сушарок є можливість сушіння матеріалів при невисоких температурах, менша витрата тепла, можливість уловлювання пари цінних компонентів (наприклад, пари спиртів та органічних рідин), кращі санітарні та безпечні умови роботи обслуговуючого персоналу. Недоліками таких сушарок є низька продуктивність, необхідність застосування ручної праці, більші витрати часу на сушіння, завантаження й вивантаження матеріалу[74].

Гребкові вакуум-сушарки. У гребкових вакуум-сушарках процес сушіння проходить під вакуумом при перемішуванні матеріалу за допомогою гребків. Сушарка має нерухомий циліндричний корпус, постачений паровою сорочкою, зовні сорочка покрита шаром теплоізоляції. У центрі сушарки встановлений вал із гребками, поверненими під кутом відносно осі вала, вал приводиться до обертання від електродвигуна через черв'ячну передачу й обертається із частотою 5 - 8 об/хв, передбачена можливість автоматичного перемикавання напрямку обертання вала. При обертанні вала в одну сторону матеріал переміщується від периферії до центра, при обертанні в іншу сторону - у зворотному напрямку, що поліпшує процес сушіння, полегшує завантаження й вивантаження матеріалу. Для руйнування грудок матеріалу, що висушується, усередині камери поміщають довгі труби, що вільно перекочуються по внутрішній поверхні корпусу[74].

Після подачі теплоносія в сорочку й прогрівання сушарки включають мішалку, через завантажувальний люк завантажують вологий матеріал, а потім герметизують сушарку. Затим включають у роботу вакуум-насос, створюють у сушарці необхідне розрідження й подають у сорочку гріючу пару потрібного тиску (до 0,5 МПа). Після цього починається процес сушіння, що проходить із інтенсивністю 6 - 8 кг вологи/год на 1 м³ простору сушильної камери. Під час сушіння відбирають пробу матеріалу, що висушується, після закінчення сушіння припиняють подачу теплоносія в сорочку, прохолоджують продукт, скидають вакуум і при працюючій мішалці вивантажують продукт через розвантажувальний люк. Після закінчення вивантаження зупиняють мішалку й проводять підготовчі роботи для виконання повторної операції сушіння. Сушарки даного типу придатні для висушування матеріалів підвищеної хімічної чистоти, чутливих до високих температур, а також для сушіння токсичних і вибухонебезпечних речовин[74].

Камерні сушарки. Для сушіння дисперсних матеріалів у малотоннажних виробництвах застосовують камерні сушарки із частковою рециркуляцією й проміжним підігріванням повітря. У даній сушарці реалізований процес із частковою рециркуляцією відпрацьованого повітря й дворазовим його підігріванням, що забезпечує м'які умови сушіння. Тривалість сушіння складає

декілька змін залежно від властивостей матеріалу, що висушується, і від температурного режиму, продуктивність сушарки за вологою, що видаляється, дорівнює 13 - 20 кг/год[7].

Недоліками такої сушарки є трудомісткість операцій завантаження й вивантаження матеріалу й низька інтенсивність сушіння[74].

Барабанні сушарки. Широкого поширення в хімічній промисловості в багатотонажних виробництвах мінеральних солей і добрив набули барабанні сушарки завдяки універсальності, надійності в роботі й досить високій їхній ефективності. Сушарка являє собою циліндричний барабан діаметром від 0,4 до 3,8 м і довжиною від 3 до 27 м, з відношенням $L:D = 4 - 8$. На барабан надіті бандажі й зубчаста вінцева шестірня, бандажі опираються на циліндричні ролики опорної й упорно-опорної станцій. За допомогою зубчастої вінцевої шестірні здійснюється обертання барабана від електродвигуна через редуктор, частота обертання барабана становить 0,5 - 5 об/хв. Барабан установлений на опорні ролики з нахилом до горизонту під кутом 1,5 - 3° у бік розвантаження висушеного матеріалу. На обох протилежних кінцях барабана змонтовані відповідно завантажувальна й розвантажувальна камери, ущільнені за допомогою спеціальних ущільнень (наприклад, сальникових або лабіринтних) для зменшення підсмоктування атмосферного повітря[74].

Недоліками барабанних сушарок є порівняно низьке вологовидалення з одиниці об'єму барабана, громіздкість, висока металоємність, підвищена витрата теплової енергії з відпрацьованими газами [74].

Для видалення вологи нам більше всього підходить сублімаційне сушіння, тому що період сублімації відбувається з постійною швидкістю і при збереженні форми замороженого матеріалу або розчину. Оскільки сушка відбувається з поверхні тіла, то, чим дрібніше дозування, тим швидше закінчується сушка, що економить нам час. Оптимальний режим сушки відповідає такій температурі і вакууму, при яких швидкість сублімації найбільша. Це досягається сушінням при постійній температурі, трохи меншою температури плавлення продукту - криогідратної точки. У період сублімації (5-8 ч) видаляється близько 80% вологи при температурі

замороженого продукту мінус 35-40 ° С і залишковому тиску 10-30 мм рт. ст. В кінці періоду сублимації температура внутрішніх шарів матеріалу підвищується до 0 ° С, і починається період випаровування залишкової вологи. У цей період матеріал поступово нагрівається до температури навколишнього середовища (температури теплоносія), а швидкість сушіння поступово зменшується до нуля [71].

До основних переваг сублимаційного сушіння, що робить його промислове застосування дуже перспективним, належать такі: біологічні та фізико-хімічні зміни в продукті мінімальні, так як процес протікає при низьких температурах. Продукти сублимаційного сушіння можуть тривалий час зберігатися у відповідній упаковці при плюсовій температурі, тобто виключається необхідність холодильного зберігання. Продукти легко поглинають при відновленні вологу (можуть відновлюватися навіть у холодній воді), зберігають первинні властивості, колір, запах продуктів майже не змінюються. Значно зменшується маса продуктів після сушіння, отже, знижуються витрати на вантажно-розвантажувальні роботи і транспортування[71].

3.5.6. Подрібнення та просіювання висушеної каталази

В ході ліофільного висушування ми отримаємо пласти каталази, які необхідно буде подрібнити та просіяти до порошкоподібного вигляду. Найкраще для даного процесу підійде комбінований прилад який буде подрібнювати і просіювати одночасно. Використання такого апарату дасть змогу зекономити час на виробничий процес та упростити саме виробництво.

Після огляду запропонованих на ринку приладів було прийняте рішення використовувати дробарку-валкову виробник Китай, продуктивність 8 – 40 кг/год.

РОЗДІЛ 4. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Таблиця 4.1. Специфікація обладнання

| Позиція | Найменування | Кількість | Технічна характеристика(виробник) |
|---|---------------------------|-----------|--|
| Д-1 Д-2 Д-3 Д-4 Д-5 Д-6 Д-7 Д-38 | Об'ємно- ваговий дозатор | 8 | Дозатор виробництва НВП "Техноваги" призначений для дозування сипких продуктів по вазі. Точність зважування становить 0,1% [75]. |
| ГФ | СІР-мийка | 1 | Збірник 8 м ³ оснащений перемішуючим пристроєм, сталь н/ж. Фірми Хім Мікс[76]. |
| Н-8 Н-9 Н-10 Н-11 | Відцентровий насос | 4 | Відцентровий насос BTS Engineering, BZ 40-125/2,2, продуктивністю до 20 м ³ /год [77] |
| Р-12 | Збірник для Гембару | 1 | Реактор об'ємом 200 л, н/ж сталь оснащений перемішуючим пристроєм, швидкість перемішування 100 об/хв [78]. |
| ПЗ-13 | Повітрязбірник | 1 | Обладнений металевою сіткою для видалення механічних забруднень [79]. |
| Ф-14 | Фільтр грубої очистки | 1 | Фільтруючий матеріал – хімволокно ФВР, Е=90% [80]. |
| К-15 | Компресор | 1 | Компресор GX7 фірми AtlasCopco (Швеція), потужність 14 л/с [81]. |
| Т-16 | Теплообмінник охолоджувач | 1 | Теплообмінник охолоджувач серії АС-13,5 фірми «Уралкомпресормарш»(Росія) продуктивністю 13,5 нм ³ /год [82]. |
| Р-17 | Ресивер | 1 | Ресивер серії РВ 430/16 фірми «Уралкомпресормарш» (Росія), об'єм 430 л, робочий тиск 1,8 МПа [82]. |

| | | | | |
|--------------------------|----------------|--------|------|--------------------------------------|
| НУХТ БТЕК 02.02.08 КР ПЗ | | | | |
| Змн. | № докум. | Підпис | Дата | |
| Розроб. | Лутай О.О.. | | | РОЗДІЛ 4. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ |
| Керівник | Воронцов О.О.. | | | |
| Реценз. | | | | |
| Контр. | | | | |
| Затверд. | Стабніков В.П. | | | |
| | | | | Літ. Арк. Аджкшів |
| | | | | 59 110 |
| | | | | Кафедра БТМ |

Продовження табл. 4.1

| Позиція | Найменування | Кількість | Технічна характеристика(виробник) |
|--|-------------------------------------|-----------|---|
| T-18 | Теплообмінник нагрівач | 1 | Корпус теплообмінника фірми VENTS (Україна) виготовлений із оцинкованої сталі, максимальний робочий тиск 1,6 МПа.[83] |
| Ф-19 | Фільтр головний | 1 | Фільтруючий матеріал –волокнистий, швидкість фільтрування 0,1 м/с, E=96% [80]. |
| P-22,37 | Реактор змішувач для композиції А | 2 | Реактори об'ємом 100 л, 1500 л., з перемішуючим пристроєм, швидкість перемішування 60 об/хв. [84] |
| P-20,23,24 | Реактор змішувач для композиції Б | 3 | Реактори об'ємом 50,100,750 л., з сорочкою перемішуючим пристроєм, швидкість перемішування 60 об/хв. [84] |
| P-25 | Реактор змішувач для УБС | 1 | Реактори об'ємом 20 м ³ , перемішуючим пристроєм, швидкість перемішування 60 об/хв [85] |
| ЗК-30 | Засівний колба | 1 | Загальний об'єм до 5 л. Нержавіюча сталь |
| Ф-26 Ф-27 Ф-28 Ф-29 | Індивідуальний фільтр | 4 | Фільтри марки BonescoActive carbon filter (Швеція), E=99 [86]. |
| ІН-31 | Інокулятор | 1 | Ферментер об'ємом 20 л, швидкість перемішування 50 – 1200 об/хв (Росія)[87]. |
| ІН-32 | Інокулятор | 1 | Ферментер об'ємом 200 л, швидкість перемішування 50 – 1200 об/хв (Росія)[87]. |
| ПА-33 | Посівний апарат | 1 | Ферментер об'ємом 2 м ³ , швидкість перемішування 50 – 1200 об/хв (Україна)[87]. |
| ФР-34 | Ферментер | 1 | Ферментер барботажний об'ємом 20 м ³ , швидкість перемішування 50 – 1200 об/хв (Україна)[87]. |
| УБС–20: P-32 K-33 T-34 T-35 T-36 H-9 | Установка безперервної стерилізації | 1 | Температура стерилізації 131°C. Продуктивність – 20 м ³ /год . Складається з колонки швидкісного нагріву, витримувача, теплообмінник рекуператор пластинчастий для нагріву та охолодження, теплообмінника-охолоджувача [88]. |

Продовження табл. 4.1

| Позиція | Найменування | Кількість | Технічна характеристика(виробник) |
|----------|---|-----------|--|
| ЗК-39 | Збірник культуральної рідини з мішалкою та сорочною | 1 | Високоякісний реактор-збірник з НЖ сталі на 20 м ³ з мішалкою та сорочкою, Виробник : Chinz , China [89]. |
| ЦВ-40,41 | Центрифуга відстійна | 2 | Центрифуга відстійна ОГН потужністю 75 кВт та 7.5 кВт максимальна кількість обертів на хвилину 2500 та 4000, фактор розділення 2520 та 3226, місткість робочої частини 25 м ³ за год та 2 м ³ за год. Виробник : Китай [90]. |
| РЗ-42,43 | Реактор-збірник | 2 | Реактор хімічний з нержавіючої сталі обладнаний якорною мішалкою на 800,500 л. Потужність – 110 – 440 Вт. Виробник : JCT, Chine [91]. |
| ДК-44 | Дезінтегратор клітин | 1 | Дезінтегратор клітин UIP16000, Heilscher, продуктивність 5 м ³ на год , Виробник : Deutschland [92] |
| УУ-45,46 | Ультрафільтраційна установка | 2 | Ультрафільтраційна установка УКФ - 40, продуктивність 1,8 м ³ , потужність – 15 кВт. [71] |
| РЗ-47,48 | Реактор для збирання концентрату | 2 | Реактор хімічний з нержавіючої сталі обладнаний якорною мішалкою на 200 та 50 л. Потужність – 110 – 440 Вт. Виробник : Chine [93]. |
| СС-49 | Сублимаційна сушарка | 1 | Мала сублимаційний сушарка місткістю 10 кг, Виробник :XINYANG, Китай. Потужність: 8.5 кВт [94] |
| ЛДПП-50 | Лінія дозування та пакування продукту | 1 | Встановлена потужність, 15 кВт Температура в камері, 80-300 °С Продуктивність (макс.), уп./год –200. [95,96] |
| ДВ-51 | Дробарка валкова | 1 | Дробарка валкова , виробник Китай, продуктивність 8 – 40 кг/год[97] |
| ВС-52 | Вібросито | 1 | Вібросито 220В, виробник Китай, вібруюча швидкість 1500 об/мин, можлива установка пор від 0.4 до 20 мм[98] |

Закінчення табл. 4.1

| Позиція | Найменування | Кількість | Технічна характеристика(виробник) |
|------------------------|--|-----------|---|
| Н-52, Н-54, Н-55,56,57 | Насоси відцентрові | 5 | Насос відцентрові Speroni CS 32-160 потужністю до 30 м ³ /год. Виробник: Італія [99]. Насос відцентрові Speroni CAM INOX 80-НL до 3 м ³ /год Виробник: Італія [99] Насос відцентрові CAM INOX 98 до 4.2 м ³ /год Виробник: Італія [99] |
| ЗСП-58 | Змішувач сипучих продуктів | 1 | Змішувач сипучих продуктів «Технолог», Виробник: Україна[100] |
| ОДАЗК-59 | Обладнання для автоматичного заповнення капсул | 1 | Обладнання для автоматичного заповнення капсул RTC-20С, Виробник: Росія Продуктивність: 2000 капсул/хв[101] |
| ДК-60 | Дозатор капсул | 1 | CVC 1220 - Дозатор капсул, Виробник: США Продуктивність: 60 банок/хв[102] |
| ЕА-61 | Етикетувальник автоматичний Детальніше: | 1 | Етикетувальник автоматичний НПЛ40 (для круглої тари) Виробник: DongYang, Китай Продуктивність: 120 етик/хв[103] |

РОЗДІЛ 5. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

Технологічна схема біосинтезу ферменту каталази включає допоміжні роботи (санітарна підготовка виробництва, підготовка повітря, підготовка та стерилізація поживних середовищ) та технологічний процес (підготовка посівного матеріалу та біосинтез ферменту каталази *Serratia marcescens SYBC08*) а також виділення та очищення ферменту. Технологічну схему біосинтезу та виділення і очищення каталази наведено у графічній частині проекту.

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

ДР 1.1. Приготування миючих та дезінфікуючих розчинів

ДР 1.1.1. Приготування робочого розчину каустичної соди

Робочі розчини каустичної соди готують (2 %) в установці СІР-мийка. Препарат у вигляді порошку вносять установку додають воду та розчиняють при перемішуванні протягом 1–5 хв .

Для приготування робочих розчинів засобу використовують воду питну. Допускається використовувати гарячу воду за температури (90 ± 5) °С для приготування розчинів засобу з метою прискорення його розчинення у воді.

ДР 1.1.2. Приготування робочого розчину Гембару

Розчин «Гембару» готують у окремому збірнику який виготовлений з нержавіючої сталі. Препарат у вигляді порошку вносять у збірник додають воду та розчиняють при перемішуванні протягом 1–5 хв .

Для приготування робочих розчинів засобу використовують воду питну згідно . Допускається використовувати гарячу воду за температури (60 ± 5) °С для приготування розчинів засобу з метою прискорення його розчинення у воді.

| | | | | | | | |
|----------|--|----------------|--------|------|------------------------------------|------|---------|
| | | | | | НУХТ БТЕК 02.02.08 КР ПЗ | | |
| Змн. | | № докум. | Підпис | Дата | РОЗДІЛ 5. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ | | |
| Розроб. | | Лутай О.О.. | | | Літ. | Арк. | Архівів |
| Керівник | | Воронцов О.О.. | | | | 63 | 110 |
| Реценз. | | | | | Кафедра БТМ | | |
| Контр. | | | | | | | |
| Затверд. | | Стабніков В.П. | | | | | |

ДР 1.2. Підготовка виробничих приміщень

ДР 1.2.1. Щоденне прибирання приміщень

Щоденне прибирання приміщень проводять після кожної зміни вологим способом. Його проводять у виробничих, лабораторних, підсобних і побутових приміщеннях. При проведенні вологого прибирання використовують 0,5 % робочий розчин Гембар (від ДР 1.1.2). Виконуємо мікробіологічний контроль.

ДР 1.2.2 Генеральне прибирання приміщень.

Генеральне прибирання проводять раз у місяць 0,5 %-м робочим розчином «Гембар» (від ДР 1.1.2.). Стіни, двері, стелі, та інші поверхні зрошують з гідропульту 0,5 % розчином Гембару з розрахунку 100 мл/м². Після закінчення зрошення приміщення закривають на 30-40 хвилин, після цього вилучають надлишок розчину за допомогою губки. Особливо забруднені місця додатково миють цим же розчином.

ДР 1.3. Підготовка технічного обладнання та комунікацій

ДР 1.3.1. Миття обладнання

Для миття ємнісного обладнання використовують станцію СІР – мийки, водопровідну воду і 2 %-й робочий розчин каустичної соди (від ДР 1.1.1.).

ДР 1.3.2. Ополіскування обладнання

Ополіскування здійснюють водою, протягом 30 хвилин, для виключення можливості нанесення шкоди здоров'ю персоналу розчином лугу.

ДР 1.3.3. Технічний огляд

Перед процесом стерилізації проводять технологічний огляд обладнання на наявність пошкоджень, вм'ятин, впадин, в яких можуть залишатись залишки можливого забруднення, що може призвести до перехресної контамінації. Всі знайдені несправності усувають.

ДР 1.3.4. Перевірка на герметичність

Після проведення миття, ополіскування та ремонтних робіт перевіряють обладнання на герметичність, для цього в апарат вносять невелику кількість легкої галогенвмісної речовини (дифторхлорметан). Далі закривають усю запірну арматуру ємнісного обладнання і подають аераційне повітря до рівня надлишкового тиску $P =$

0,1-0,2 МПа. Потім перекривають вентиль подачі повітря і фіксують показання манометра на кришці апарату та час витримки (30-60 хв) в операційному журналі. Після закінчення часу витримки звіряють покази манометра, якщо різниця менше 0,01 МПа, то апарат вважають герметичним. При більшому відхиленні за допомогою галогенного течієпошукача починають пошук неущільнень шляхом перевірки усіх місць з'єднань. При наближенні щупа течієпошукача до місця нещільності фіксуються пари галогенвмісної речовини, що засвідчує наявність нещільності. При знаходженні усіх таких місць їх усувають шляхом підтягування різьбових з'єднань або замінюють прокладки. Потім апарат знову перевіряють на герметичність.

ДР 1.3.5. Стерилізація обладнання

Для проведення стерилізації в сорочку апарата подають глуху пару і нагрівають його до 80–90 °С. Відкривають усю запірну арматуру на відкритих трубних закінченнях та підведених до апарата комунікаціях і подають гостру пару безпосередньо в апарат через нижній спуск, при цьому обов'язково відкривають вентиль виходу відпрацьованого повітря для видалення повітря з апарату. При досягненні температури стерилізації (130–135 °С) всю запірну арматуру, крім парової, закривають і витримують протягом 1 години. Після завершення витримки парову арматуру закривають, подають в апарат стерильне повітря, а в сорочку холодну воду. Процес охолодження здійснюють до досягнення температури 30–40 °С і надлишкового тиску $P = 0,003\text{--}0,005$ МПа.

ДР 2. Підготовка аераційного повітря

ДР 2.1. Забір повітря

Забір атмосферного повітря здійснюють на висоті 2-3 м від найвищої точки виробничого комплексу.

ДР 2.2. Попереднє грубе очищення

Повітря очищується від грубого аерозоллю на фільтрі грубої очистки. Ступінь очищення – 90 %.

ДР 2.3. Компресування повітря

Повітря стискають у компресорі до 0,35 МПа, стиснення повітря в компресорі призводить до підвищення його температури до 120–250 °С і збільшення вмісту вологи.

ДР 2.4. Охолодження повітря

Стиснене повітря «переохолоджують» в охолоджувачі повітря до температури 25 °С для відведення надлишкової вологи.

ДР 2.5. Видалення зайвої вологи

Повітря подають на ресивер для згладжування пульсацій і відділення зайвої вологи ($W = 60 \%$).

ДР 2.6. Нагрівання повітря

Охолоджене повітря підігрівають до 35 °С для унеможливлення конденсації пари на волокнах головного та індивідуальних фільтрів. Нагрів здійснюють у теплообміннику.

ДР 2.7. Очищення на головному фільтрі

Попереднє очищення повітря від мікроорганізмів здійснюють в головному фільтрі. Ступінь очищення – 96 %. Заміна фільтрувального матеріалу проводять 2 рази на рік. У разі забруднення, зволоження, інфікування фільтруючого матеріалу проводять позачергову його заміну.

ДР 2.8. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

Всі інокулятори і ферментер оснащують індивідуальним мембранним фільтром для заключної очистки повітря. Ступінь очищення досягає 99,999 %.

ДР 3. Приготування та стерилізація поживних середовищ

ДР 3.1. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах

Вирощування посівного матеріалу первинно необхідно приготувати 1 л продукту, такий об'єм можна приготувати на колбах. Джерелом вуглецю та енергії в середовищі є глюкоза, джерелом азоту – пептон, екстракт яловичини. Вміст компонентів для приготування 1 л середовища наведено в табл. 5.1

Таблиця 5.1

| Компоненти | Концентрація г/л | Вміст у 1000 мл | Композиції | Всього, мл |
|--------------------|---------------------|--------------------|------------|------------|
| Глюкоза | 20 | 20 | А | 400 |
| Пептон | 10 | 10 | | |
| Екстракт яловичини | 5 | 5 | | |
| H ₂ O | | 365 | | |
| NaCl | 5 | 5 | Б | 600 |
| H ₂ O | | 595 | | |
| Всього | | | | 1000 мл |

*інформацію для приготування поживного середовища взяли з статті по *Serratia marcescens* SYBC08[8]

ДР 3.1.1 Стерилізація композиції А

Стерилізацію проводимо в колбі об'ємом 1000 мл в автоклаві.

Глюкозу і пептон, екстракт яловичини режим стерилізації 112 °С протягом 30 хв під тиском 0,05 МПа

ДР 3.1.2 Стерилізація композиції Б

Стерилізацію проводимо в колбі об'ємом 1000 мл в автоклаві.

Сіль термостабільні стерилізуємо разом, в осад не випадають. NaCl – режим стерилізації 131 °С протягом 40 хв під тиском 0,15 МПа

ДР 3.1.3 Змішування компонентів

В колбу в якій знаходяться стерилізована композиція А в стерильних умовах вносимо композицію Б, проводимо мікробіологічний контроль

ДР 3.2. Приготування і стерилізація поживного середовища для культивування в інокуляторі об'ємом 20 л

Для вирощування інокуляту необхідно приготувати 10 л поживного середовища. Враховуючи об'єм рідкого посівного матеріалу – 10%, та втрати від

крапельного виносу 5 %, загальна кількість води, яка необхідна для приготування поживного середовища становить 9,27 л. Вміст компонентів для приготування 10 л середовища наведено в табл. 5.2.

Таблиця 5.2

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 10 л поживного середовища

| Компоненти | Концентрація г/л | Вміст у 10 л - г (л) | Композиція | Всього |
|-----------------------|---------------------|-------------------------|------------|----------|
| Кукурудзяний екстракт | 43 | 430 | А | 4000 мл |
| H ₂ O | | 3570 | | |
| Лимонна кислота | 30 | 300 | Б | 6000 мл |
| H ₂ O | | 5700 | | |
| Всього | | | | 10000 мл |

ДР 3.2.1. Стерилізація композиції А

Стерилізуємо компоненти в стерилізаторі гострою парою. Режим стерилізації 112 °С протягом 30 хв, під тиском 0,05 МПа. Проводимо мікробіологічний контроль

ДР 3.2.2 Приготування композиції Б

Лимонну кислоту стерилізуємо в інокуляторі гострою парою - режим стерилізації 131 °С протягом 40 хв під тиском 0,15 МПа.

ДР 3.3. Приготування і стерилізація поживного середовища для культивування в інокуляторі об'ємом 200 л.

Для вирощування інокуляту необхідно приготувати 104,2 л поживного середовища. Враховуючи об'єм рідкого посівного матеріалу 10%, та втрати від крапельного виносу 5%. Загальна кількість води, яка необхідна для приготування поживного середовища становить 86,1 л. Вміст компонентів для приготування 104,2 л середовища наведено в табл. 5.3

Таблиця 5.3

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 104,2 л поживного середовища

| Компоненти | Концентрація г/л | Вміст у 104,2 л – г | Композиція | Всього |
|-----------------------|---------------------|---------------------------|------------|----------------|
| Кукурудзяний екстракт | 43 | 4 480,6 | А | 40 л |
| H ₂ O | | 31 519,4 | | |
| Конденсат | | 4 л | | |
| Лимонна кислота | 30 | 3 126 | Б | 64,2 л |
| H ₂ O | | 54 654 | | |
| Конденсат | | 6,42 л | | |
| | | | | Всього 104,2 л |

ДР 3.3.1. Стерилізація композиції А

Стерилізуємо компоненти в стерилізаторі гострою парою. Режим стерилізації 112 °С протягом 30 хв, під тиском 0,05 МПа. Проводимо мікробіологічний контроль

ДР 3.3.2 Приготування композиції Б

Лимонну кислоту стерилізуємо в інокуляторі гострою парою - режим стерилізації 131 °С протягом 40 хв під тиском 0,15 МПа .

ДР 3.4. Приготування і стерилізація поживного середовища для культивування в інокуляторі об'ємом 2000 л.

Для вирощування інокуляту необхідно приготувати 1088,6 л поживного середовища. Враховуючи об'єм рідкого посівного матеріалу 10%, та втрати від крапельного виносу 5%. Загальна кількість води, яка необхідна для приготування

поживного середовища становить 900,29 л. Вміст компонентів для приготування 1088,6 л середовища наведено в табл. 5.4

Таблиця 5.4

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 1088,6 л поживного середовища

| Компоненти | Концентрація г/л | Вміст у 1088,6 л – кг (л) | Композиція | Всього |
|-----------------------|---------------------|---------------------------------|------------|-----------------|
| Кукурудзяний екстракт | 43 | 46,8 | А | 400 л |
| H ₂ O | | 313,2 л | | |
| Конденсат | | 40 л | | |
| Лимонна кислота | 30 | 32,65 | Б | 688,6 л |
| H ₂ O | | 587,09 л | | |
| Конденсат | | 68,86 л | | |
| | | | | Всього 1088,6 л |

ДР 3.4.1. Стерилізація композиції А

Стерилізуємо компоненти в стерилізаторі гострою парою. Режим стерилізації 112 °С протягом 30 хв, під тиском 0,05 МПа. Проводимо мікробіологічний контроль

ДР 3.4.2 Приготування композиції Б

Лимонну кислоту стерилізуємо - режим стерилізації 131 °С протягом 40 хв під тиском 0,15 МПа .

ДР 3.5. Приготування і стерилізація поживного середовища для культивування в ферментері об'ємом 20 м³.

Для вирощування інокуляту необхідно приготувати 11376 л поживного середовища. Враховуючи об'єм рідкого посівного матеріалу 10%, та втрати від крапельного виносу 10%. Загальна кількість води, яка необхідна для приготування поживного середовища становить 9 407,96 л. Вміст компонентів для приготування 11376 л середовища наведено в табл. 5.5

Таблиця 5.5

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 11376 л поживного середовища

| Компоненти | Концентрація г/л | Вміст у 11376 л – кг (л) | Композиції | Всього |
|-----------------------|---------------------|--------------------------------|------------|----------------|
| Кукурудзяний екстракт | 43 | 489,16 | А Б | 11376 л |
| Лимонна кислота | 30 | 341,28 | | |
| Конденсат | | 1137,6л | | |
| H ₂ O | | 9 407,96л | | |
| | | | | Всього 11376 л |

ДР 3.5.1. Приготування та стерилізація композицій

Нестерильне поживне середовище із збірника подається самоплином в попередньо простерилізований реактор-змішувач перед УБС. Далі середовище з реактора перекачується за допомогою винтового насоса у колонку швидкісного нагріву, де нагрівається парою до температури стерилізації. Далі поступає у теплообмінник-витримувач, де витримується за температури 131 °С упродовж 10 хв. Далі поживне середовище поступає у теплообмінник-рекуператор. Свіжі порції нестерильного поживного середовища поступають у теплообмінник-рекуператор, завдяки цьому відбувається нагрівання нестерильного поживного середовища та охолодження стерильного. Для кінцевого охолодження поживне середовище надходить у теплообмінник, де охолоджується до температури культивування 30 ± 1 °С, після цього стерильне та охоложене середовище подається у ферментер. Час стерилізації становить 1 годину.

ТП 4. Підготовка посівного матеріалу

ТП 4.1 Підтримання колекційної культури

Колекційну культуру *Serratia marcescens* SYBC08 зберігають у пробірках зі скошеним сусло-агаром. Пересіви здійснюють кожні 4 місяці. Всі роботи з культурою проводять строго в асептичних умовах. Температура зберігання 0-4 °С. Проводимо мікробіологічний контроль, відсутність сторонньої мікробіоти.

ТП 4.2 Одержування робочої культури на поживних середовищах

Колекційну культуру, що зберігається в пробірках з сусло-агаром, розсівають петлею до ізольованих колоній на чашки Петрі із МПА і вирощують при температурі 30 °С упродовж 12 год. Проводимо мікробіологічний контроль.

ТП 4.3 Вирощування культури на агаризованому середовищі

Отримані ізольовані колонії пересівають петлею в пробірки з МПА. В пробірки пересівають ізольовані колонії, що знаходяться на відстані не менше 1 см. Тривалість вирощування – 12 год при температурі 30 °С. Проводимо мікробіологічний контроль.

ТП 4.4 Вирощування культури в колбах на качалках

Для вирощування рідкого посівного матеріалу у колбу об'ємом 750 мл в асептичних умовах вносять змішанні компоненти (від ДР 3.1.3). З окремих пробірок зі скошеною культурою (від ТП 4.3.) змиваємо культуру стерильним фізіологічним розчином до колби в асептичних умовах. Культивують при 30°С протягом 12 год на качалці з 200 обертами на хвилину. Проводимо мікробіологічний контроль.

ТП 4.5. Отримання посівного матеріалу (1 стадія) в інокуляторі об'ємом 20 л

В попередньо простерилізований інокулятор вносять 5 л композиції Б (від ДР 3.2.2.), стерилізують в інокуляторі гострою парою режим стерилізації 131 °С протягом 40 хв, під тиском 0,15 МПа. Вносимо 4 л композиції А (від ДР 3.2.1.), простерилізованої в стерилізаторі, в асептичних умовах. Через засівну колбу вносять посівний матеріал (від ТП 4.4.). Процес культивування має проходити при температурі 33 °С. Тривалість культивування становить 20 години. У процесі культивування швидкість перемішування 400 об/хв. Проводимо мікробіологічний контроль.

ТП 4.6. Отримання посівного матеріалу (2 стадія) в інокуляторі об'ємом 200 л

В попередньо простерилізований інокулятор вносять 50 л композиції Б (від ДР 3.3.2.), стерилізують в інокуляторі гострою парою режим стерилізації 131 °С протягом 40 хв, під тиском 0,15 МПа. Вносимо 44,7 л композиції А (від ДР 3.3.1.), простерилізованої в стерилізаторі, в асептичних умовах. Через трубу перетискування перекачують з інокулятора інокулят (від ТП 4.5.). Процес культивування має проходити при температурі 33 °С. Тривалість культивування становить 20 години. У процесі культивування швидкість перемішування 400 об/хв. Проводимо мікробіологічний контроль

ТП 4.7. Отримання посівного матеріалу (3 стадія) в інокуляторі об'ємом 2000 л

В попередньо простерилізований інокулятор вносять 500 л композиції Б (від ДР 3.4.2.), стерилізують в інокуляторі гострою парою режим стерилізації 131 °С протягом 40 хв, під тиском 0,15 МПа. Вносимо 489,6 л композиції А (від ДР 3.4.1.), простерилізованої в стерилізаторі, в асептичних умовах. Через трубу перетискування перекачують з інокулятора інокулят (від ТП 4.6.). Процес культивування має проходити при температурі 33 °С. Тривалість культивування становить 20 години. У процесі культивування швидкість перемішування 400 об/хв. Проводимо мікробіологічний контроль

ТП 5. Біосинтез

ТП 5.1 Виробниче культивування (4 стадія) в ферментері об'ємом 20 м³

Виробниче культивування здійснюють у ферментері з об'ємом 20 м³. У попередньо простерилізований ферментер в асептичних умовах за допомогою насоса вносять стерильне поживне середовище (від ДР 3.5.1.). За допомогою труби перетискування перекачують посівний матеріал (від ТП 4.7) і вмикають перемішуючий пристрій. Швидкість перемішування становить 400 об/хв. Також подається стерильне повітря. Тривалість виробничого культивування становить 40 годин при температурі 33 °С. Проводимо мікробіологічний контроль.

З дотриманням правил асептики з посівного апарату відбирають проби через кожні 4 годин, в якій аналізують: вміст вуглецю, азоту, активність каталази та мікробіологічні показники.

ТП 6. Відділення біомаси від культуральної рідини

ТП 6.1 Відділення супернатанту від біомаси.

У збірник культуральної рідини на 20 м³ ЗК-1 завантажують весь об'єм культуральної рідини (11376 л) з виробничого ферментера у якій міститься цільовий продукт. Після цього відкривають кран подачі води холодної та охолоджують до 12 °С, вмикають мішалку на 100 обертів та підтримують даний режим перемішування упродовж всього терміну зберігання.

Для початку відділення біомаси відкривають донний вентиль збірника ЗК-1 та вентиль входу ректора РЗ-4. Після цього вмикають центрифугу ЦВ-2, та встановлюють швидкість обертання ротору: 2500 об/хв. Потім встановлюють час витримки супернатанту у центрифугі, далі вмикають насос Н-8, подають певну кількість культуральної рідини зі збірника ЗК-1 на центрифугу (до 25 м³/год). Після витримки у центрифугі, відкривають вентиль відбору продукту у центрифугі і продукт поступає у збірник РЗ-4 (вихід біомаси 215,8 кг від 11376 л к.р.). Потім завантажують наступну порцію продукту з ЗК-1. У збірнику -3 після подачі першої порції продукту вмикають мішалку на 120 об/хв та подають холодну воду для охолодження продукту до 12 °С.

ТП.7 Дезінтеграція клітин

ТП. 7.1 Дезінтеграція клітин ультразвуковим методом

Відкривають донний вентиль збірника РЗ-4 та насосом подають на дезінтегратор ДК-6, де за допомогою ультразвуку, руйнуємо клітини бактерій. Продуктивність 5 м³ за годину, потужність 16 кВт. Відкривають кран ДК-6 та подають до ЦВ-3 на відділення уламків клітин (з втратами приблизно 2% виходить 211,5 кг дезінтегрованої біомаси).

ТП 7.2. Відділення уламків клітин

Після цього вмикають центрифугу ЦВ-3, та встановлюють швидкість обертання ротору: 4200 об/хв. Потім встановлюють час витримки супернатанту у

центрифузі, далі вмикають насос Н-19, подають певну кількість дезінтегрованої рідини від ДК-6 на центрифугу. Після витримки у центрифугу, відкривають вентиль відбору продукту у центрифугу і продукт поступає у збірник РЗ-5(від загальної дезінтегрованої біомаси відділилось 20 % уламків та приблизно 15% пішли на втрати – 137,4 кг пішло на ультрафільтрацію) .

ТП.8 Концентрування

ТП 8.1 Ультрафільтрація. Видалення високомолекулярної баластної складової.

Від РЗ-5 подають на УУ-7 через бактеріальний фільтр та предфільтр насосом подається в замкнутий циркуляційний контур. Після циркуляційного насоса розчин розподіляється на два паралельних потоки, кожен з яких проходить через два послідовно з'єднаних ультрафільтраційних блока, знову зєднується в один потік і направляється в теплообмінник. Робочий тиск ультрафільтраційної установки 0,8 МПа, мембрани PVDF з граничною молекулярною масою 250 кДа, продуктивність 1,8 м³ на год. Температура розчину підтримується за допомогою теплообмінника близько 10 градусів Цельсія . Видаляють високомолекулярну баластну складову. Пермеат, якій містить низькомолекулярні речовини до збірника установки , де відділяється фільтрат, а концентрат після багаторазового рециркулювання потрапляє до РЗ-9.

ТП 8.2 Ультрафільтрація. Видалення низькомолекулярної складової

Від РЗ-9 подають супернатант на УУ-8. Робочий тиск ультрафільтраційної установки 0,8 МПа, мембрани PES з граничною молекулярною масою 230 кДа, продуктивність 1,8 м³ на год. Видаляють низькомолекулярну складову. Пермеат, якій містить низькомолекулярні речовини до збірника установки , де відділяється фільтрат, а концентрат після багаторазового рециркулювання потрапляє до РЗ-10 (на сушку 3,85 кг вологого продукту).

ТП 9. Сушіння продукту.

ТП.9.1. Заморожування препарату.

Супернатант від ТП 4.2 розливається на лотки ліофільної сушарки СС - висотою не більше 1.0 см. Перед процесом сублімаційного висушування проводять заморожування за температури -50°C на протязі 20 годин.

ТП.9.2. Сублімаційна сушка.

Після того, як заморожування буде закінчено, вмикається вакуумний насос, величина вакуумування дорівнює 50 Па. Через годину система підключає циркуляцію теплоносія, що плавно підігріває сушильний матеріал до температури 34°C за якої проходить сушіння на протязі 20 годин (після сушки отримуємо сухого 0,67 кг ферменту).

ПМВ 10. Пакування, маркування, відвантаження

ПМВ 10.1 Дроблення і просіювання

Висушений продукт подрібнюємо на валковій дробарці і пропускаємо через вібросито, діаметр пор 1-3 мм, для відсіювання продукту який не подрібнився. Продукт який пройшов стадію просіювання відправляємо у дозатор для подальшого пакування, не просіяний на повторне дроблення.

ПМВ 10.2 Пакування у поліетиленові пакети.

У дозатор завантажують сухий продукт вручну, одержаний на сушарці СС. Встановлюють вагову кількість на автоматичному дозаторі у значенні 300 г. Після дозування починається сам процес пакування який виконується на термотунелі. Запускають пакувальну машину. Завершують процес пакування після закінчення продукту.

ПМВ 10.3 Групове пакування

В коробку завантажують по 10 мішків готового продукту. Коробки завантажують на палету з дерева та обмотують поліетиленовою плівкою. Додають документацію та сертифікати якості і відправляють на склад. Наносять номер партії та серії

ОГЛЗ 11. Отримання готового лікарського засобу

ОГЛЗ 11.1. Змішування

Проводимо змішування нашого ферменту з такими компонентами як: панкреатин, бромелайн, папаїн, трипсин, солодка, екстракт ехінацеї, ліпаза, мальтоза, амілаза, лактаза, протеаза, жовч, рутин, супероксиддисмутаза, окис цинку,

цукроза , пепсин, ренін, хімотрипсин, які є в складі нашого препарату, час 15-20 хв, активність каталази в готовому препараті повинна складати 5000 U.

ОГЛЗ 11.2. Наповнення капсул

Готовий продукт передаємо на капсулювання, яке проводиться автоматично за допомогою машини наповнення, маса наповнення капсули 0,23 г, продуктивність 2000 кап/хв.

ОГЛЗ 11.3. Первинне пакування

Готові капсули передаємо на фасування до первинної упаковки. В панелі керування дозатора виставляємо параметр «кількість капсул в одну тару» - 180 капсул. Продуктивність 11 банок/хв.

ОГЛЗ 11.4. Етикетування

Баночки з нашим готовим продуктом передаємо на етикетування, продуктивність 11 ет/хв .

ОГЛЗ 11.5. Вторинне та групове пакування

Передаємо на ручне пакування. В коробку завантажують по 20 коробочок готового продукту. Коробки завантажують на палету з дерева та обмотують поліетиленовою плівкою. Додають документацію та сертифікати якості і відправляють на склад. Наносять номер партії та серії

ЗВ 12. Знешкодження відходів

Відпрацьовані робочі розчини мийних та мийно-дезінфікуючих засобів, воду та аераційне повітря знешкоджують.

ЗВ 12.1. Знешкодження повітряних відходів

Повітряні відходи направляють на спалювання в котельню.

ЗВ 12.2. Знешкодження рідких відходів

Стічні води віправляють на доочистку і далі в каналізацію.

ЗВ 12.3. Знешкодження твердих відходів

Тверді відходи направляються на утилізацію

5.1. Карта постадійного контролю

Таблиця 5.6

| Номер контрольної точки та назва стадії | Об'єкт контролю і показник, що визначається | Методи контролю | Періодичність перевірки та порядок відбору проб | Нормативна характеристика показника, що визначається |
|--|--|--|---|--|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| K _x 1.1.1 Підготовка робочого розчину каустичної соди | Концентрація розчину каустичної соди | Хімічний метод, термометр технічний | Після приготування розчинів | C = 2 % |
| K _x 1.1.2 Приготування робочого розчину Гембару | Концентрація розчину Гембару | Хімічний метод, термометр технічний | Після приготування розчинів | C = 0,5 % |
| K _t , K _m 1.2.1, 1.2.2 Підготовка виробничих приміщень | М/б чистота поверхонь виробничих приміщень (стіни, підлога, двері) | Змиви тампонами або метод відбитків | Після прибирання | В змивах з площею 10 x 10 см допускається ріст не більше 50 м м/о (бактерій і грибів сумарно); |
| K _t 1.3.1, 1.3.2 Технологічний контроль миття обладнань та комунікацій | Обладнання та комунікації, температура | Термометр технічний, годинник | Під час проведення миття | t = 40 °C, τ = 30 хв |
| K _t 1.3.3, 1.3.4 Технологічний контроль герметичності обладнання | Обладнання та комунікації, тиск | Датчик | Після миття та ополіскування обладнання | P = 0,1 МПа, τ = 1 год |
| K _t , K _m 1.3.5 Стерилізація обладнання | Обладнання, режим стерилізації вузлів, тиск, температура, мікробна контамінація. | Манометр, термометр м/б метод, висіви на чашки Петрі | Температура та тиск визначаються безперервно під час виробничого процесу. | p = 0,003, 0,005 Мпа, t = 130°C, τ = 1 год |
| K _t 2.2 Попереднє грубе очищ. оч | Повітря, ступінь чистоти | Часточки бруду; манометр | Пезперервно при подачі повітря | E = 90% |

Продовження табл 5.6

| | | | | |
|---|---|--|--|---|
| К _т 2.3 Компресування повітря | Повітря, температура, тиск стиснення повітря | Термометр, мономент технічний | Після компресування повітря | p = 0,35 МПа, t = 120-250 °С |
| К _т 2.4 Охолодження повітря | Повітря, температура | Термометр технічний | Після охолодження повітря | t = 25-40°С, |
| К _т 2.5 Видалення зайвої вологи | Вологість повітря | Психромет- ричний метод | Видалення зайвої вологи | W=60-70% |
| К _т 2.6 Нагрівання повітря | Повітря, температура | Термометр технічний | Після нагрівання | t = 35°С |
| К _т 2.7 Очищення на головному фільтрі | Повітря, вміст часток, перепад тисків | Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра | Після очищення повітря у головному фільтрі | E = 96 % |
| К _т 2.8 Очищення повітря в індивідуальному у фільтрі | Повітря, тупінь чистоти | Часточки бруду; манометр | Безперервно при подачі повітря | E = 99% |
| К _т 3.1.1,3.1.2,3.1.3 Приготування та стерилізація поживного середовища | Композиція А, Б температура, час, стерильність | технічні ваги | мікробіологічний контроль після стерилізації | V=750мл, t = 112,131 °С, p = 0,05, 0,15 МПа, τ = 30,40 хв, |
| К _т 3.2.1 Приготування та стерилізація композиції А | Композиція А, температура, час, стерильність | технічні ваги | мікробіологічний контроль після стерилізації | t = 112 °С, p = 0,05 МПа, τ = 30 хв, |
| К _т 3.2.2 Приготування та стерилізація композиції Б | Композиція Б, температура, час, стерильність | технічні ваги | мікробіологічний контроль після стерилізації | t = 131 °С, p = 0,15 МПа, τ = 40 хв |
| К _т , К _м 3.3.1 Приготування та стерилізація композиції А | Композиція А, температура, час, тиск, стерильність | Манометр технічний, годинник, м/б контроль об'ємний | Тиск визначається під час стерилізації, м/б контроль після стерилізації | t = 112 °С, p = 0,05 МПа, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти |

| | | | | |
|---|--|--|---|--|
| К _т , К _м 3.3.2 Приготування та стерилізація композиції Б | Композиція Б, температура, час, тиск, стерильність | Манометр технічний, годинник, м/б контроль | Тиск визначається під час стерилізації, м/б контроль після стерилізації | t = 131 °С, p = 0,15 МПа, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти |
| К _т , К _м 3.4.1 Приготування та стерилізація композиції А | Композиція А, температура, час, тиск, стерильність | Манометр технічний,, м/б контроль об'ємний дозатор | Тиск визначається під час стерилізації, м/б контроль після стерилізації | t = 112 °С, p = 0,05 МПа, τ = 30 хв, відс. мікробіоти |
| К _т , К _м 3.4.2 Приготування та стерилізація композиції Б | Композиція Б, температура, час, тиск, стерильність | Манометр технічний,, м/б контроль | Тиск визначається під час стерилізації, м/б контроль після стерилізації | t = 131 °С, p = 0,15 МПа, τ = 40 хв, відс. мікробіоти |
| К _т , К _м 3.5.1 Приготування та стерилізація композиції А | Композиція А, температура, час, тиск, стерильність | Манометр технічний,, м/б контроль об'ємний дозатор | Тиск визначається під час стерилізації, м/б контроль після стерилізації | t = 131 °С, τ = 10 хв, відс. мікробіоти |
| К _т , К _м 3.5.1 Приготування та стерилізація композиції Б | Композиція Б, температура, час, тиск, стерильність | Манометр технічний,, м/б контроль об'ємний дозатор | Тиск визна-чається під час стерилізації, м/б контроль після стерилізації | t = 131 °С, τ = 10 хв, відс. мікробіоти |
| К _т , К _м 4.1. Підтримання колекційної культури | Температура, час, асептичність | Термометр технічний, мікробіологічний контроль | Температура, час та зовнішній вигляд визначається безперервно під час підтримання культури | t = 0-4 °С, τ = 4 місяці., відсутність сторонньої мікробіоти |
| К _м , К _т 4.2. Одержання робочої культури з колекційної | Температура, час, асептичність | Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль | Температура, час і зовнішній вигляд визначається під час виробничого процесу. Мікробіологічний контроль по закінченню процесу | t = 30 °С, τ = 12 год, відсутність сторонньої мікробіоти |
| К _м , К _т 4.3. Одержання робочої культури на агаризовному середовищі | Температура, час, асептичність | Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль | Температура, час і зовнішній вигляд визначається під час виробничого процесу. Мікробіологічний контроль по закінченню процесу | t = 30 °С, τ = 12 год, відсутність сторонньої мікробіоти |

| | | | | |
|--|--|--|---|--|
| Кт, Км 4.4 Вирощування культури в колбах на качалках | Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури | Термометр технічний, годинник, тахометр, мікробіологічний контроль | Після вирощування культури в колбах на качалках | $t = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 12$ год, $w=200$ об/хв., відсутність сторонньої мікробіоти |
| Кт, Км 4.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі 30 л. | Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури | Термометр технічний, годинник, манометр, тахометр, мікробіологічний контроль | Під час вирощування культури в інокуляторі і в кінці процесу | $t = 33\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 20$ год, $w=400$ об/хв. відсутність сторонньої мікробіоти |
| Кт, Км 4.6. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі 300 л. | Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури | Термометр технічний, годинник, манометр, тахометр, мікробіологічний контроль | Під час вирощування культури в посівному апараті і в кінці процесу | $t = 33\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 20$ год, $w=400$ об/хв. відсутність сторонньої мікробіоти |
| Кт, Км 4.7. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі 3000 л. | Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури | Термометр технічний, годинник, манометр, тахометр, мікробіологічний контроль | Під час вирощування культури в посівному апараті і в кінці процесу | $t = 33\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 20$ год, $w=400$ об/хв. відсутність сторонньої мікробіоти |
| Кт, Км, Кх 5.1. Виробниче культивування | Посівний матеріал, тривалість культивування, швидкість перемішування, активність ксиланази, рН, мікробіологічна чистота культури | Термометр технічний, годинник, тахометр, манометр, мікробіологічний контроль, рН метр, колориметричний метод | Під час вирощування культури у ферментері. Відбір проби культуральної рідини відбувається кожні 8 год | $t = 70\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 40$ год, $w=400$ об/хв., відсутність сторонньої мікробіоти |

Продовження табл 5.6

| | | | | |
|---|---|---|---|--|
| Кт 6.1 Відділення біомаси | Швидкість обертання, час процесу | Датчик Годинник | Під час процесу | $n = 1730$ об/хв $\tau = 18-25$ хв |
| Кт 7.1 Дезінтеграція клітин ультразвуковим | - | - | Під час процесу | Продуктивність 5 м ³ за год |
| Кт 7.2 Відділення уламків клітин | Швидкість обертання, час процесу | Датчик Годинник | Під час процесу | $n = 4200$ об/хв $\tau = 18-25$ хв |
| Кт 8.1 Ультрафільтрація. Видалення високомолекулярної баластної складової. | Температура розчину | Годинник | Під час проведення технологічного процесу | Продуктивність 0,45 м ³ /гол робочий тиск 0,07 МПа, проникність мембран 420 м ³ /(м ² год) |
| Кт 8.2 Ультрафільтрація. Видалення низькомолекулярної складової | Температура розчину | Годинник | Під час проведення технологічного процесу | Продуктивність 0,45 м ³ /гол робочий тиск 0,07 МПа, проникність мембран 420 м ³ /(м ² год) |
| Кт 9.1 Заморожування препарату. | Температура Подача розчину Вологість продукту | Термометр технічний, годинник Датчик продуктивності Фізичний метод | Під час проведення технологічного процесу | $T = -50$ °С $\tau = 20$ год |
| Кт 9.2 Сублімаційна сушка | Температура Вологість продукту Тиск | Термометр технічний, годинник Барометр Датчик продуктивності Фізичний метод | Під час проведення технологічного процесу | $T = 34$ °С $\tau = 20$ год $P = 50$ Па |
| Кт 10.1 Дроблення і просіювання | Частота обертів Маса продукту | Тахометр Ваги | Під час проведення технологічного процесу | — |
| Кт 10.2 Пакування у поліетил. пак. | Продуктивність | Ваги, Датчик продукт. Годинник | Перед початком процесу | Вага -300 г |

Закінчення табл 5.6

| | | | | |
|----------------------------------|--------------------|-------------------|---|--------------------------------------|
| Кт 11.1 Змішування | Час | Ваги, Годинник | Під час проведення технологічного процесу | Час 15-20 хв |
| Кт 11.2 Наповнення капсул | Продуктивніст ь | Годинник | Під час проведення технологічного процесу | 2000 кап/хв |
| Кт 11.3 Первинне пакування | Продуктивніст ь | Годинник | Під час проведення технологічного процесу | Доза – 180 капсул, 11 банок/хв |
| Кт 11.4 Етикетування | Продуктивніст ь | Годинник | Під час проведення технологічного процесу | 11 ет/хв |

5.2 Мікробіологічний контроль

Упродовж всього часу культивування періодично відбирають проби культуральної рідини (кожні 4 години) для проведення мікробіологічного контролю, показників росту та синтезу, а саме: визначення концентрації біомаси і цільового продукту, а також вміст редуруючих цукрів та вільного амінного азоту.

Етап приготування, стерилізації поживних середовищ: мікробіолог перевіряє середовище на відсутність мікроорганізмів шляхом мікроскопіювання зразка простерилізованих композицій наших середовищ. Мікроскопіювання здійснюють методом «роздавленої краплі». В полі зору мікроскопа не повинна бути виявлена мікробіота. Якщо простерилізовані композиції середовища заражені мікробіотою, то їх не можна використовувати для культивування *Serratia marcescens SYBC08*.

Якість посівного матеріалу визначається відсутністю сторонньої мікробіоти. Відсутність сторонньої мікробіоти може бути визначена двома способами

Відсутність сторонньої мікробіоти демонструє нам якість посівного матеріалу. Наявність або відсутність сторонньої мікробіоти може визначатися двома способами висівом культуральної рідини на чашки Петрі, мікроскопіюванням посівного матеріалу.

При мікроскопіюванні роблять препарат «роздавлена крапля». Препарат готують на знежиреному предметному склі, на яке наносять маленьку краплю культуральної рідини, накривають покривним скельцем і мікроскопіюють. Коли ми перевіряємо метеріал для посіву на препараті повинна

При перевірці посівного матерілу, на препараті повинна бути наявна тільки наша культура, а на поживних середовищ – повинна бути відсутня мікробіота.

На етапах культивування продуцента визначають відсутність сторонньої мікробіоти. Відсутність сторонньої мікробіоти визначається такими ж способами, як і при визначенні відсутності сторонньої мікробіоти у посівному матеріалі.

Щоб перевірити відсутність сторонньої мікробіоти висівом, здійснюється висів культуральної рідини (або посівного матеріалу) на чашки з агаризованим середовищем, а потім мікроскопіюємо. Культуральну рідину розсівають петлею до ізольованих колоній на чашки Петрі з МПА для виявлення бактерій. Сусло-агар або

глюкозо-картопляний агар ГКА використовують для визначення наявності дріжджів, грибів. На чашках Петрі повинна вирости тільки культура *Serratia marcescens SYBC08*. Якщо на наших середовищах проросла інша мікробіота – бактерії, гриби або дріжджі, – це вказує нам, що відбулося зараження культури продуцента і її культивування на далі неможливе[104].

5.3 Визначення активності каталази

Відділення та очищення від біомаси

Культуральну рідину центрифугували при 4°C і 10800×g протягом 15 хв. Осад висушували при 105°C до постійної ваги з наступним зважуванням для визначення біомаси. Клітинні залишки видаляли центрифугуванням при 4 ° C і 18000×g протягом 15 хв[13].

Очищення каталази

Об'єднаний сирий ферментний екстракт спочатку осаджували за допомогою насиченням 40% (w · v – 1) сульфату амонію. Гранули видаляли і супернатанти з каталазною активністю збирали центрифугуванням при 4°C і 10800×g протягом 20 хв. Після осадження з використанням 60% (w·v–1) насиченим сульфатом амонію, осад збирали центрифугуванням при 4°C і 12000×g протягом 20 хв. Осад повністю розчинили у невеликій кількості 50 мМ Na₂HPO₄-NaH₂PO₄-буфера (рН 8,0) з наступним центрифугуванням (4°C та 17300×g протягом 20 хв) для викидання нерозчинених фракцій. Супернатанти діалізували проти того ж буфера протягом 12 год, а потім піддавали колоні DEAE (1,0 см × 10,0 см), яка була збалансована тим же буфером. Адсорбований фермент елюювали лінійним градієнтом NaCl від 0 до 0,7 М у 50 мМ буфері Na₂HPO₄ – NaH₂PO₄ (рН 8,0) при швидкості потоку 1 мл × хв. Фракцію з каталазною активністю об'єднували і 2 мл активної фракції завантажували на колонку Sephacryl Tm S-200 (16 мм × 60 см), яка була збалансована тим же буфером. Фермент елюювали тим же буфером при швидкості потоку 1 мл × хв – 1, і елюовані фракції каталази збирали. Розчин на кожній очищеній стадії збирали для оцінки активності каталази та вмісту білка[13].

Активність каталази вимірювали спектрофотометрично, шляхом моніторингу зменшення поглинання при 240 нм, викликаного розкладанням перекису водню. Для

розрахунку швидкості реакції використовували лінійний діапазон реакції (30 с), а одну одиницю активності каталази визначали як кількість ферменту, необхідного для перетворення 1 мкмоль перекису водню у воду та кисень на хв. Активність каталази розраховували та аналізували за допомогою програмного забезпечення SPSS 11.5[13].

5.4 Визначення нітрогену

Метод Дюма. Суть методу полягає в тому що, наважку речовини, що аналізується, спалюють у кварцовій трубці за рахунок кисню твердого окисника в атмосфері CO_2 . Як тверді окисники найчастіше використовують CuO . Продукти спалення (CO , CO_2 , O_2 , H_2O , оксиди азоту та ін.) витискають струмом CO_2 в азотометр, який заповнюють водним розчином лугу. Оксиди азоту, які проходять крізь шар відновника (зазвичай нагріта металічна Cu), відновлюються до азоту. Таким чином із трубки для спалювання в азотометр надходить суміш двох газів — CO_2 та N_2 . При цьому CO_2 поглинається розчином лугу, а N_2 збирається в азотометрі. Вимірюють об'єм N_2 , який виділяється, і розраховують вміст N_2 у зразку, який аналізують.

Для визначення азоту методом Дюма застосовують автоматичні та напівавтоматичні аналізатори[105].

5.5 Визначення вуглецю

В основу визначення покладено метод Лібіха-Прегля. Він полягає в кількісному розкладанні органічної речовини до діоксиду вуглецю і води, що визначаються потім кількісно в спеціальних апаратах, що містять речовини, які хімічно зв'язують ці оксиди. Для поглинання діоксиду вуглецю застосовують гідроксид натрію, нанесений на азбест, а для зв'язування води – перхлорат магнію.

Точно зважену наважку речовини (4-6 мг) поміщають в платиновий човник або кварцову пробірку і спалюють в кварцевій трубці, через яку пропускають з постійною швидкістю кисень. Трубку нагрівають електричною півкою до 800-900°C, а спалювання речовини проводять в газовій горілці. За кварцовою трубкою розміщують апарати з поглиначами для води і діоксиду вуглецю, кількості яких

визначають по різниці мас до спалення і після. Знаючи кількості спожитої води і діоксиду вуглецю, розраховують вміст С і Н (в%) за формулами:

$$C = b \cdot 0,2727 \cdot 100/a; \quad H = c \cdot 0,1119 \cdot 100/a,$$

де а – наважка речовини(мг); (b) – кількість знайденої CO₂; с – кількість знайденої води; 0,2727 – фактор для C/CO₂; 0,1119 – фактор для H₂/H₂O[106]

Методи аналізу готового продукту

5.6 Визначення вологи

Метод заснований на висушуванні досліджуваного препарату до постійної маси при температурі 105 ° С.

У попередньо висушену до постійної маси бюксу поміщають 1,000-2,000 г препарату і щипцями ставлять в сушильну шафу на 2 ч, після чого бюксу закривають кришкою, охолоджують в ексікаторі і зважують. Наступні зважування проводять через кожну годину висушування навішування до постійної маси. Маса вважається постійною, коли різниця між двома наступними зважуваннями не перевищуватиме 0,005 г.

Масову частку вологи (W) у відсотках обчислюють за формулою

$$W = \frac{(m_2 - m_3) \cdot 100}{m_2 - m_4}$$

За остаточний результат випробування приймають середнє арифметичне результатів двох паралельних визначень, відносне розбіжність між якими не повинно перевищувати 0,25%.Результат округлюють до першого десяткового знака[107].

5.7 Органолептичні показники

3,00 г досліджуваного препарату поміщають на гладку чисту поверхню аркуша білого паперу і візуально визначають зовнішній вигляд і колір, перемішуючи при природному світлі [107].

Методи аналізу готового препарату

5.8 Визначення активності каталази в готовому препараті

Розчиняємо вміст капсули готового препарату ферментного комплексу у воді, після цього вимірюємо активність каталази спектрофотометрично, шляхом

моніторингу зменшення поглинання при 240 нм, викликаного розкладанням перекису водню. Для розрахунку швидкості реакції використовували лінійний діапазон реакції (30 с), а одну одиницю активності каталази визначали як кількість ферменту, необхідного для перетворення 1 мкмоль перекису водню у воду та кисень на хв. Активність каталази розраховували та аналізували за допомогою програмного забезпечення SPSS 11.5[13].

РОЗДІЛ 6. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОДЕРЖАННЯ ЛЗ.

Для прикладу розробки ЛЗ з використанням каталази було обрано комплекс ферментів «Арт Лайф». Також на його базі було виконано всі розрахунки.

6.1. Вибір форми випуску лікарського засобу.

Каталаза буде використовуватися в якості антиоксиданту в комплексі з протеолітичними ферментами. Тому обраний лікарський засіб буде ферментним комплексом.

На нашому ринку ферментний комплекс випускають у одній формі:

- капсули;

Капсули

У світі наш поліферментний препарат випускається тільки в одній лікарській формі – капсули. Це тверда лікарська форма з м'якою чи твердою оболонкою, що містить одну дозу однієї або більше діючих речовин.

Залежно від вмісту пластифікаторів і за технологічним принципом розрізняють два типи капсул: тверді та м'які.

М'які капсули дістали таку назву, тому що наповнювач уміщується в м'яку ще еластичну оболонку в процесі їх виготовлення. Потім капсули піддаються подальшим технологічним процесам, унаслідок яких початкова еластичність оболонки може втрачатися частково або повністю. Такі капсули мають суцільну оболонку, що буває еластичною або жорсткою. Іноді до складу оболонки м'яких капсул входить діюча речовина.

Тверді капсули заповнюють після того, як цілком пройде весь технологічний процес формування, і вони набудуть відповідної пружності і стануть твердими. Тверді капсули мають двосекційну будову і можуть бути виготовлені заздалегідь,

| | | | | | НУХТ БТЕК 02.02.08 КР ПЗ | | |
|----------|----------------|--------|------|--|--------------------------|------|----------|
| Змн. | № докум. | Підпис | Дата | | Літ. | Арк. | Адквішів |
| Розроб. | Лутай О.О. | | | РОЗДІЛ 6. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОДЕРЖАННЯ ЛЗ. | | 89 | 110 |
| Керівник | Воронцов О.О. | | | | Кафедра БТМ | | |
| Реценз. | | | | | | | |
| Контр. | | | | | | | |
| Затверд. | Стабніков В.П. | | | | | | |

а наповнити їх лікарськими речовинами можна пізніше, коли виникне необхідність.

Капсули призначені для внутрішнього, іноді для ректального, вагінального й інших способів застосування. Залежно від локалізації оральні капсули поділяють: на сублінгвальні; шлунковорозчинні; кишково-розчинні.

Окрему групу складають капсули з регульованою швидкістю і повнотою вивільнення лікарських речовин. Капсули з модифікованим вивільненням мають у своєму складі або в оболонці (або там і там одночасно) спеціальні допоміжні речовини, призначені для зміни швидкості або місця вивільнення діючих речовин.

Кишково-розчинні капсули також належать до засобів із модифікованим вивільненням, які повинні бути стійкими до дії шлункового соку і вивільняти діючі речовини в кишечнику. Вони можуть бути виготовлені покриттям твердих або м'яких капсул кислотостійкою оболонкою або методом наповнення капсул гранулами або частинками, покритими кислотостійкими оболонками [112].

Ідеальним варіантом для нашого поліферментного препарату є тверді кишково-розчинні капсули.

6.2. Опис лікарського засобу згідно АНД (проект АНД)

Поліферментний препарат не класифікується та поки що не описаний в ДФУ, але ми злегкістю можемо віднести його до дієтичних добавок(ДД).

Дієтична добавка (ДД) — це харчовий продукт, який призначений для споживання в невеликих визначених кількостях додатково до звичайного харчового раціону та являє собою концентроване джерело одного або комбінації поживних або інших речовин, зокрема білків, жирів, вуглеводів, вітамінів, мінеральних речовин (цей перелік не є вичерпним), які виявляють поживний або інший фізіологічний ефект; виготовляється в дозованій формі, наприклад, таблеток, капсул, драже, порошків, ампул або інших формах.

Поліферментний препарат «Комплекс ферментів ПЛЮС» містить в своєму складі панкреатин – 50 мг, бромелайн -35 мг, папаїн – 25 мг, трипсин – 25 мг, солодка – 25 мг, екстракт ехінацеї – 17,5 мг, ліпаза – 5 мг, мальтоза – 5 мг, амілаза – 5 мг, лактаза – 5 мг, протеаза – 5 мг, жовч – 5 мг, рутин – 5 мг, супероксиддисмутаза

– 5 мг, каталаза – 5 мг, окис цинку – 4 мг, цукроза – 2,5 мг, пепсин – 1,25 мг, ренін – 1,25 мг, хімотрипсин – 0,5 мг. Випускається тільки в капсулах.

Випробування. Залежно від складу та форми ДД проводять відповідні випробування, необхідні для підтвердження безпечності та якості, згідно з чинними нормативними документами або відповідними загальними статтями й монографіями ДФУ.

Опис. Для характеристики дозованих форм ДД можуть використовуватися відповідні статті на дозовані форми: «Таблетки», «Гранули», «Капсули», «Порошки для орального застосування», «Рідкі лікарські засоби для орального застосування» тощо.

Органолептичні властивості. Випробування органолептичних властивостей (зовнішній вигляд, запах, смак, колір, ін.) можуть бути проведені відповідно до вимог статей ДФУ «Таблетки», «Гранули», «Капсули», «Порошки для орального застосування», «Рідкі лікарські засоби для орального застосування» тощо.

Ідентифікація. Для ідентифікації інгредієнтів та допоміжних речовин ДД можуть використовуватися відповідні монографії ДФУ, Європейської Фармакопеї або інших авторитетних міжнародних джерел. Для ДД, які містять живі мікроорганізми, їх ідентифікацію проводять згідно зі статтею ДФУ «Живі біотерапевтичні лікарські засоби, призначені для вживання людиною».

Важкі метали. Випробування можна проводити відповідно до статей «Важкі метали» (2.4.8) або «Важкі метали у лікарській рослинній сировині та лікарських рослинних засобах» (2.4.27).

Мікробіологічна чистота. Випробування можна проводити відповідно до вимог статей «Мікробіологічна чистота нестерильних лікарських засобів: визначення числа мікроорганізмів» (2.6.12), «Мікробіологічна чистота нестерильних лікарських засобів: випробування на окремі види мікроорганізмів» (2.6.13), «Випробування мікробіологічної чистоти рослинних лікарських засобів для орального застосування та екстрактів, що використовують для їх виготовлення» (2.6.31), «Мікробіологічна чистота живих біотерапевтичних лікарських засобів: кількісне визначення» (2.6.36), «Мікробіологічне випробування живих

біотерапевтичних лікарських засобів: специфічні мікроорганізми» (2.6.38), «Мікробіологічна чистота готових лікарських рослинних засобів для орального застосування та екстрактів, що використовують для їх виготовлення» (5.1.8)[113].

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

Річна потужність ЛЗ на рік

Каталаза буде використовуватися, як головний компонент у складі дієтичної добавки для профілактики лікування таких захворювань, як панкреатит. В Україні захворюваність на гострий панкреатит становить 4,6 випадків на 10 000 населення [63,64].

Ми підраховали кількість людей хворих на панкреатит в Україні за станом на 2021 рік і це приблизно 20300 чоловік, з урахуванням конкурентоспроможності ми візьмемо половину хворих тобто 10000 чоловік. За інформацією в інструкції ферментного комплексу вказано курс лікування в середньому 6 місяців, 1 таблетка 3 рази на день, в одній порції на день 15 мг каталази:

порція на один день – 15 мг

180 днів = 2,7 г- потреба ферменту на курс лікування

Звідси ми можемо порахувати приблизну потребу в каталазі для виготовлення ферментного комплексу на профілактику лікування даних захворювань у населення України.

2,7 г – на 1 хворого на курс лікування

X - 10000 осіб

27 кг – кількість каталази на рік для лікування усіх хворих;

Кількість партій на рік

Партією являє собою сировину (АФІ та допоміжні речовини) з якою одноразово проводять маніпуляцію на кожному етапі виробництва (просіювання, змішування, грануляція, таблетування тощо.). Знаючи загальну кількість ферменту та кількість робочих днів можна порахувати кількість партій:

$27 : 90 = 0,3$ кг - фермента повинно вироблятися в день.

Знаючи, що в складі поліферментного препарату міститься 5 мг каталаза та інші речовини, можна розрахувати кількість капсул виготовлених з однієї партії нашого ферменту.

$$27\,000\,000 \text{ мг} / 5 \text{ мг (каталази в одній капсулі)} = 5\,400\,000 \text{ капсул в рік}$$

В одній упаковці поліферментного препарату 180 капсул, з цього виходить:

$$5\,400\,000 / 180 = 30\,000 \text{ упаковок готового поліферментного препарату}$$

Знаючи, що фармацевтичний завод працює у 3 зміни по 8 годин можемо порахувати скільки необхідно буде виготовляти не розфасованої продукції за зміну. Нехай робота на першій зміні буде направлена на прийом, просіювання та змішування 0,3 кг сировини для ферментного препарату, тоді друга та третя зміна буде направлена на наповнення капсул, а отже:

$$300\,000 / 5 = 60\,000 \text{ капсул за робочий день}$$

$$60\,000 / 180 = 333 \text{ упаковок готового препарату за 1 робочий день}$$

6.4. Обґрунтування вибору класів чистоти виробничих приміщень (підготовки персоналу, дезінфікуючих засобів, вентиляційного повітря).

6.4.1. Обґрунтування вибору класу чистоти виробничих приміщень.

До виробництва стерильної та нестерильної продукції висувають особливі вимоги з метою зведення до мінімуму ризику контамінації мікроорганізмами і пірогенними речовинами. Для цього ретельно дотримуються умов і способів виготовлення, які пройшли валідацію.

До виробництва стерильних лікарських препаратів ставлять такі загальні вимоги:

1. Стерильну продукцію необхідно виробляти в чистих зонах, доступ у які персоналу і/або надходження обладнання, сировини і матеріалів має здійснюватись через повітряні шлюзи. Чисті зони слід обслуговувати таким чином, щоб вони відповідали стандарту чистоти; в них необхідно постачати повітря, що пройшло крізь фільтри відповідної ефективності.

2. Операції з підготовки компонентів первинного пакування, виготовлення продукції та дозування мають здійснюватися в окремих зонах чистої зони. Виробничі операції діляться на дві категорії: продукція остаточно стерилізується в

первинному пакуванні; операції виконуються в асептичних умовах на декількох або всіх стадіях.

3. Чисті зони для виробництва стерильної продукції класифікуються відповідно до їх характеристик згідно з вимогами GMP та потреб відповідного рівня чистоти приміщень, що їх оточують з метою зниження до мінімуму ризику можливої контамінації стерильної продукції, що виготовляється, мікроорганізмами чи частинками вихідних чи інших матеріалів. Ці зони мають бути спроектовані так, щоб забезпечувати чітко визначений рівень чистоти повітря в оснащеному стані. Оснащений стан чистого приміщення — це умова, за якої система повністю підготовлена, виробниче обладнання встановлене і придатне до роботи, але персонал відсутній. Функціонуючий стан чистого приміщення — це умова, за якої система й обладнання функціонують у встановленому режимі з визначеною кількістю працюючого персоналу. Для виробництва стерильних лікарського препарату, як правило, виділяють чотири класи.

Клас А — локальна зона для операцій, при яких контамінація може становити високий ризик для якості продукції (зона дозування, закупорювання ємностей, відкривання ампул і флаконів, змішування в асептичних умовах). Такі умови забезпечуються ламінарним потоком повітря на робочому місці (рівномірна швидкість повітря 0,45 м/с ±20%). Клас В – навколишнє середовище для зони класу А у разі виготовлення і дозування в асептичних умовах. Клас С і D — чисті зони для здійснення менш критичної стадії виробництва стерильної продукції (табл. 6.1).

Таблиця 6.1 Класифікація чистих зон за максимально допустимою кількістю часток у повітрі

| Клас чистоти | Максимально допустима кількість часток в 1 м ³ повітря, мкм | | | |
|--------------|--|-------|---------------------|-------|
| | Оснащений стан** | | Функціональний стан | |
| | 0,5 мкм | 5 мкм | 0,5 мкм | 5 мкм |
| A | 3520 | 20 | 3520 | 20 |
| B | 3520 | 29 | 352 000 | 2900 |
| C | 352 000 | 2000 | 3 520 000 | 29000 |
| D | 3 520 000 | 20000 | не нормується | |

Таблиця 6.2. Операції, які необхідно виконувати в зонах із різними класами чистоти

| Клас чистоти | Технологічні операції для продукції, що стерилізується в первинному пакуванні |
|---------------------|---|
| A | Фасування продукції, коли ризик для якості продукції внаслідок контамінації майже виключений |
| C | Приготування розчинів, коли ризик для якості продукції внаслідок контамінації майже виключений. Фасування продукції |
| D | Приготування розчинів і підготовка компонентів первинного пакування для подальшого фасування |
| | Технологічні операції для приготування продукції в асептичних умовах |
| A | Приготування і фасування в асептичних умовах |
| C | Приготування розчинів, які підлягають фільтрації |
| D | Робота з компонентами первинного пакування після миття |

Допустима кількість часток для оснащеного стану має досягатися за 15–20 хв після завершення операцій та прибирання (при відсутності персоналу). Допустима кількість часток для класу А у функціональному стані (див. табл. 6.1) повинна завжди підтримуватися в зоні, що безпосередньо оточує продукцію, якщо продукція чи відкрита ємність зазнають впливу навколишнього середовища. Визнано, що не завжди є можливим продемонструвати відповідність стандартам за кількістю часток у місці фасування при веденні технологічного процесу внаслідок утворення часток або крапель із самої продукції. Зони різних класів чистоти у функціональному стані необхідно контролювати за кількістю часток. При виконанні операцій в асептичних умовах має проводитися частковий контроль із використанням таких методів, як седиментація на пластини, відбір проб з об'єму повітря та з поверхонь (за допомогою змивів із контактних пластин). Методи відбору проб, що використовують у функціональному стані, не повинні завдавати шкоди захисту зони. Результати контролю розглядаються при проведенні огляду документації протоколу серії для видачі дозволу на випуск готової продукції. Додатково

здійснюють також мікробіологічний контроль (табл. 6.3) в стані, коли не проводять технологічних операцій (після валідації системи, очищення і санітарної обробки).

Таблиця 6.3. Рекомендовані межі при мікробіологічному контролі частин зон у функціонуючому стані

| Рекомендовані межі мікробіологічної контамінації | | | | |
|---|--|---|---|--|
| Клас | Проба повітря, КУО/м³* | Седимінація на пластину (д=55 мм), КУО/4 год** | Контактні пластини (д=55 мм), КУО/пластина | Відбиток 5 пальців у рукавичці, КУО/рукавичка |
| A | <1 | <1 | <1 | <1 |
| B | 10 | 5 | 5 | 5 |
| C | 100 | 50 | 25 | – |
| D | 200 | 100 | 50 | – |

За результатами контролю часток і мікроорганізмів можуть бути встановлені відповідні межі: попереджувальна межа та межа, що потребує вжиття заходів. У робочих методиках мають бути описані коригувальні дії, якщо ці межі перевищені.

Виробництво нестерильних лікарських препаратів рекомендується здійснювати у приміщеннях класів частоти C і D (табл. 6.4) або у приміщеннях, в яких не проводиться контроль на вміст часток і мікроорганізмів, за умови відсутності контакту відкритої продукції з навколишнім середовищем. 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. Якщо технологічний процес і вид лікарської форми, що виробляється, не дозволяють забезпечити клас чистоти за максимально допустимою кількістю часток (див. табл. 6.2), у виробництві таких лікарських препаратів допускається встановлювати клас частоти лише за кількістю життєздатних мікроорганізмів в 1 м³ повітря. Приміщення для етикетування та

оформлення готової продукції, зберігання лікарських препаратів, допоміжних речовин і субстанцій, прання одягу для працюючих у виробничих приміщеннях допускається не контролювати на вміст часток та мікроорганізмів.

Таблиця 6.4. Класифікація приміщень виробництва нестерильних ЛЗ за максимально допустимою кількістю часток та мікроорганізмів у повітрі

| Клас чистоти | Максимально допустима кількість часток в 1м ³ | | Максимально допустима кількість життєздатних мікроорганізмів |
|--------------|--|--------|--|
| | 0,5–5 мкм | >5 мкм | КУО/м ³ |
| C | 352 000 | 2 900 | 100 |
| D | 3 520 000 | 29 000 | 200* |

Примітка. * у приміщеннях D класу чистоти максимально допустима кількість життєздатних мікроорганізмів у повітрі може становити 500 КУО/м³, якщо в процесі валідації доведено, що при цьому не відбувається погіршення якості ЛП за показником «мікробіологічна чистота»[114].

З даної інформації можна зробити висновок, що для виготовлення нашого препарату підходять приміщення класу C та D, оскільки такі показники, як кількість частинок у повітрі та мікробіологічна чистота знаходяться у допустимих межах для даного класу поліферментного препарату.

6.5. Обґрунтування вибору первинної упаковки.

Первинна упаковка - упаковка, що невіддільна від товару до його споживання і в якій товар подається для роздрібного продажу.

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.

Карпула (картридж) використовують для пакування ін'єкційних розчинів. Дана первинна упаковка складається з прозорого циліндричного корпусу з силіконовим поршнем з одного кінця і силіконовою пробкою з іншого кінця, що розділяється еластичною перегородкою з тонкою серединною частиною на дві камери. Еластична перегородка розташовується в корпусі карпули з таким розрахунком, щоб в першій камері містилася достатня кількість розчину для введення 0,1 мл, з урахуванням розчину, що виходить при витискуванні бульбашок повітря, перед ін'єкцією.

«Флоу-пак» (плавник, брикет) - це пакування продукції в трьохшовні пакети, які використовують для лікарських засобів і виробів медичного призначення у вигляді гелів, суспензій, паст для перорального застосування. Основне для «флоу-паків»: економічність, привабливий вигляд, зручність і тривале збереження продукту.

Пластикова тара(баночки) - здійснює функції упаковки самостійно або в поєднанні з допоміжними пакувальними засобами, які є іншими елементами упаковки.

Для нашої лікарської форми та кількості капсул в одній упаковці препарату, зручно використовувати пластикову тару, а саме баночки.

6.5.1 Стадій отримання готового лікарського препарату

Змішування. Проводимо змішування нашого компоненту з іншими допоміжними речовинами. Для цього використовуємо фармацевтичний змішувач сипучих продуктів, який забезпечує нам рівномірне і однорідне змішування, що досягається за допомогою спеціально розробленої конструкції чотирьохполосового гелікоїдної шнека.

Наповнення капсул. Для наповнення капсул використовуємо автоматичне обладнання для наповнення капсул порошком RTC-20C. Вдосконалена конструкція поворотного механізму, оригінальні японські лійні підшипники забезпечують зносостійкість і точність машини. Обладнання оснащено комп'ютерним управлінням, безступінчастою регульованою частотою, цифровим дисплеєм, простим у користуванні, інтуїтивним та привабливим інтерфейсом. Багаторазові

отвори для наповнення забезпечують точність дозування (вона контролюється приблизно на + 3,5%).

Первинна упаковка. Наповненні капсули упаковуємо в пластикові баночки для цього використовуємо дозатор капсул CVC 1220, який проводить відлік капсул згідно заданій кількості.

Вторинна упаковка. Етикетування та упакування в коробочки з інструкцією.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- 1) Боечко Ф.Ф., Боечко Л.О. «Основні біохімічні поняття, визначення і терміни», р. 1993, с.528
- 2) Волыхина В.Е., Шафрановская Е.В., «Супероксиддисмутази: структура и свойства», ВЕСТНИК ВГМУ, 2009, Том 8, №4, с.18
- 3) Kullisaar T. «Two antioxidative lactobacilli strains as promising probiotics.» Int. J. Food Microbial., 2002, 72,р. 215–224
- 4) Guo C., Gynn M., «Extraction of superoxide dismutase, catalase, and carbonic anhydrase from stroma-free red blood cell hemolysate for the preparation of the nanobiotechnological complex of polyhemoglobin-superoxide dismutase-catalase-carbonic anhydrase», Artif Cells Nanomed Biotechnol 2015 Jun;43(3):157-62
- 5) Narendra Tuteja, Panchanand Mishra, Sandep Yadav, «Heterologous expression and biochemical characterization of a highly active and stable chloroplastic CuZn-superoxide dismutase from *Pisum sativum*», BMC Biotechnology (2015) 15:3, p.14
- 6) Trayana Nedeva, «Purification and partial characterization of Cu/Zn superoxide dismutase from *Kluyveromyces marxianus* yeast», Journal of Chromatography B, 877 (2009), p. 3529–3536
- 7) J. Wawrzykowski, M. Kankofer, «Partial biochemical characterization of Cu,Zn-superoxide dismutase extracted from eggs of hens», Food Chem 2017 Jul 15;227:390-396
- 8) Raju Madanala, Vijayta Gupta, «A highly stable Cu/Zn superoxide dismutase from *Withania somnifera* plant: gene cloning, expression and characterization of the recombinant protein», Biotechnol Lett (2011) 33:p.2057–2063
- 9) Prashani Mudika Ekanayake, «Molecular cloning and characterization of Mn-superoxide dismutase from disk abalone», Comparative Biochemistry and Physiology, Part B 145 (2006), p.318–324
- 10) Спосіб одержання ферментних препаратів каталази *flammulina velutipes* (curt.: fr.) sing. і *pleurotus ostreatus* (jacq.: fr.) kumm. Електронний ресурс: - [Режим доступу]:<https://uapatents.com/4-8713-sposib-oderzhannya-fermentnikh-preparativ-katalazi-flammulina-velutipes-curt-fr-sing-i-pleurotus-ostreatus-jacq-fr-kumm.html>
- 11) Федотов О. В. Волошко Т. Е., «Порівняльна характеристика базидіальних грибів — продуцентів каталази *Biotechnologia Acta*», V. 6, No3, 2013, p.89-91

- 12) Xinhua Fu, Wei Wang, Jianhua Hao, Xianglin Zhu and Mi Sun, «Purification and Characterization of Catalase from Marine Bacterium *Acinetobacter* sp. YS0810», *BioMed Research International*, Volume 2014, p.1-8
- 13) Hua-Wei Zeng, Yu-Jie Cai, Feng Zhang, Da-Bing Zhang , «Production, characterization, cloning and sequence analysis of a monofunctional catalase from *Serratia marcescens* SYBC08», *Journal of Basic Microbiology* 2011, 51, p.205–214
- 14) Xianbo Jia, Jichen Chen, Chenqiang Lin, Xinjian Lin, Cloning, «Expression, and Characterization of a Novel Thermophilic Monofunctional Catalase from *Geobacillus* sp. CHB1», *BioMed Research International*, Volume 2016, p. 1-9
- 15) Tuyishime Philibert, Zhiming Rao, Taowei Yang, Junping Zhou, «Heterologous expression and characterization of a new heme-catalase in *Bacillus subtilis* 168», *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* volume 43, 2016, p.729–740
- 16) Jiang Zhang, Hong Liu, Qingwei Wang, «Expression of catalase in *Lactobacillus fermentum* and evaluation of its anti-oxidative properties in a dextran sodium sulfate induced mouse colitis model», *World Journal of Microbiology and Biotechnology* volume 29, 2013, p. 2293–2301
- 17) Xianbo Jia, Xinjian Lin, Yandan Tian, «High production, purification, biochemical characterization and gene analysis of a novel catalase from the thermophilic bacterium *Ureibacillus thermosphaericus* FZSF03», *International Journal of Biological Macromolecules*, Volume 103, 2017, p. 89-98
- 18) Xianbo Jia, Xinjian Lin, «Enhanced alkaline catalase production by *Serratia marcescens* FZSF01: Enzyme purification, characterization, and recombinant expression», *Electronic Journal of Biotechnology*, Volume 30, 2017, p.110-117
- 19) Annamaria Ricciardi, Rocco Gerardo Ianniello, «Factors affecting gene expression and activity of heme- and manganese-dependent catalases in *Lactobacillus casei* strains», *International Journal of Food Microbiology*, Volume 280, 2018, p. 66-77
- 20) Irina Krallish, Svetlana Gonta, Ludmila Savenkova, «Effect of iron and aeration on superoxide dismutase and catalase activity of PHB-producing *Azotobacter chroococcum*», *Process Biochemistry*, Volume 44, Issue 3, 2009, p.369-372

- 21) Yoshiko Hanaoka, Isao Yumoto, «Manipulation of culture conditions for extensive extracellular catalase production by *Exiguobacterium oxidotolerans* T-2-2», *Annals of Microbiology* volume 65,2015, p.1183–1187
- 22) Mamata Ray, Panchanand Mishra, «Expression and purification of soluble bio-active rice plant catalase-A from recombinant *Escherichia coli*», *J Biotechnol* , 2012, p.12-19
- 23) Alaattin Sen, Mehmet Ozkarsl,» Cloning, expression, purification and characterization of *Bacillus licheniformis* catalase from Pamukkale Hot Springs», *Current Opinion in Biotechnology*, Volume 22, Supplement 1, 2011, p. 39-42
- 24) Ayşe Ezgi Ünlü, «Investigation of the simultaneous production of superoxide dismutase and catalase enzymes from *Rhodotorula glutinis* under different culture conditions», *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, Volume 40, 2012, p. 338-344
- 25) Issei Kobayashs, Takashi Tamura, Haitham Sghaier, «Characterization of monofunctional catalase KatA from radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*», *Journal of Bioscience and Bioengineering*, April 2006, p. 315-321
- 26) I Yumoto, D Ichihashi, H Iwata, «Purification and characterization of a catalase from the facultatively psychrophilic bacterium *Vibrio rumoiensis* S-1(T) exhibiting high catalase activity», *Journal of Bacteriology*, 2000, p. 1903-1909
- 27) Baljinder Singh Kauldhar, Balwinder Singh Sookh, «Tailoring nutritional and process variables for hyperproduction of catalase from a novel isolated bacterium *Geobacillus* sp. BSS-7», *Microbial Cell Factories*, 2016, p.1-19
- 28) Sha Xu, Yaqiong Guo, Guocheng Du, Jingwen Zhou, «Self-Cloning Significantly Enhances the Production of Catalase in *Bacillus subtilis* WSHDZ-01», *Applied Biochemistry and Biotechnology* volume 173, 2014, p. 2152–2162
- 29) Yanzhou Zhang, Xunhang Li, Ruchun Xi, «Characterization of an acid-stable catalase KatB isolated from *Bacillus altitudinis* SYBC hb4», *Annals of Microbiology* volume 66,2016, p.131–141

- 30) Xunlong Shi, Meiqing Feng, Yujie Zhao, Xin Guo, «Overexpression, purification and characterization of a recombinant secretory catalase from *Bacillus subtilis*», *Biotechnology Letters* volume 30, 2008, p. 181–186
- 31) Preety Vatsyayan, Pranab Goswami, «Highly Active and Stable Large Catalase Isolated from a Hydrocarbon Degrading *Aspergillus terreus* MTCC 6324», *Enzyme Research*, Volume 2016, p.1-9
- 32) Федулов А.Л., Спиридович Е.В., Рахманько Е.М., «Выделение пероксидазы из оболочек семени сои», *Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь, УДК 577.152.1'1, с.9*
- 33) Полозников А.А., Хушпульян Д.М., Захарянц А.А., Тишков В.И., «Способ получения пероксидазы из корней хрена», 2013, номер патента RU 2 486 240
- 34) P.Raja Rao, P. Kavya, «Production, Isolation and Purification of Peroxidase Using *Bacillus Subtilis*», *IPCБЕЕ vol.64 (2014), p.21-27*
- 35) Ayodeji O. Falade, Leonard V. Mabinya, Anthony I. Okoh, Uchechukwu U. Nwodo, «Studies on peroxidase production and detection of *Sporotrichum thermophile*-like catalase-peroxidase gene in a *Bacillus* species isolated from Hogsback forest reserve, South Africa», *Heliyon* 5 (2019) e03012, p. 8
- 36) Willian Daniel HahnSchneider, Roselei ClaudeteFontana, «High level production of laccases and peroxidases from the newly isolated white-rot basidiomycete *Marasmiellus palmivorus* VE111 in a stirred-tank bioreactor in response to different carbon and nitrogen sources», *Volume 69, June 2018, p. 1-11*
- 37) Christopher JA Finnis, Tom Payne, Joanna Hay, «High-level production of animal-free recombinant transferrin from *Saccharomyces cerevisiae*», *Microbial Cell Factories* 2010, 9:87, p.11
- 38) Kimihiko Mizutani, Kazuhiko Hashimoto, Nobuyuki Takahashi, Masaaki Hirose, Shigeo Aibara, Bunzo Mikami, «Structural and functional characterization of recombinant human serum transferrin secreted from *Pichia pastoris*», *Biotechnol Biochem*, 2010;74(2):p.309-315
- 39) R.Yu. Popov, T.K. Aliev, Yu.A. Mokrushina, O.G. Shamborant, E.N. Khurs, V.D. Knorre, «Production of Recombinant Human Transferrin in Eukaryotic *Pichia pastoris*

Expression System», *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* volume 167, 2019, p. 335–338

40) Hiroyuki Mukaiyama, Hideki Tohda, Kaoru Takegawa, «Overexpression of protein disulfide isomerases enhances secretion of recombinant human transferrin in *Schizosaccharomyces pombe*», *Appl Microbiol Biotechnol* (2010) 86: p.1135–1143

41) Deshui Zhang, Somen Nandi, Paula Bryan, Steve Pettit, Diane Nguyen, Mary Ann Santos, Ning Huang, «Expression, purification, and characterization of recombinant human transferrin from rice (*Oryza sativa* L.)», *Protein Expr Purif* 2010 Nov;74(1):p. 69-79

42) Xiaoxue Yin, Yanjian Yang, Kailiang Han, Liting Wu, «Purification and functional characterization of serum transferrin from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), *Fish & Shellfish Immunology* Volume 88, May 2019, p. 36-46

43) Maria Bindea, Bogdan Rusu, Alexandru Rusu, Monica Trif, Loredana Florina Leopold, Francisc Dulf, Dan Cristian Vodnar, «Valorification of crude glycerol for pure fractions of docosahexaenoic acid and β -carotene production by using *Schizochytrium limacinum* and *Blakeslea trispora*», *Microb Cell Fact* 2018, p.97

44) A. Chandra Sekhara Reddy, T. Sugantha, Dr. R. Srinivasa Reddy, «Purification and Analysis of Carotenoids from Micro Algae (*Dunaliella salina*) Growing under Stressed Conditions», *International Journal of Research in science and Technology* Vol-1 No-1, 2011, p. 7

45) Bohua Wang, Liping Lin, Lei Lu, Weiping Chen, «Optimization of β -carotene production by a newly isolated *Serratia marcescens* strain», *Electronic Journal of Biotechnology*, 2012, p. 8

46) Fang Xu, Qi-Peng Yuan, Yan Zhu, «Improved production of lycopene and β -carotene by *Blakeslea trispora* with oxygen-vectors», *Process Biochemistry* Volume 42, Issue 2, 2007, p. 289-293

47) Sheetal Choudhari, Rekha Singhal, «Media optimization for the production of β -carotene by *Blakeslea trispora*: A statistical approach», *Bioresource Technology* 99 (2008), p.722–730

48) Hong-Bo Wang, Rong-Gang Xu, Long-Jiang Yu, Jun Luo, Li-Wei Zhang, Xiao-Yan Huang, Wen-An Zou, Qian Zhao, and Ming-Bo Lu, «Improved β -Carotene and Lycopene

- Production by *Blakeslea trispora* with Ultrasonic Treatment in Submerged Fermentation», *Z Naturforsch CJ Biosci.*, 2014; 69 (5-6): p.237-244
- 49) Martín Moliné , Diego Libkind, María van Broock, «Production of Torularhodin, Torulene, and b-Carotene by *Rhodotorula* Yeasts», *Methods Mol Biol* 2012, p.275-283
- 50) J. M. Araya-Garay, L. Feijoo-Siota, F. Rosa-dos-Santos, P. Veiga-Crespo, T. G. Villa, «Construction of new *Pichia pastoris* X-33 strains for production of lycopene and β -carotene», *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, p.2483–2492
- 51) Davinder Pal SinghI, Jasvirinder Singh Khattar , Alka Rajput , Rajni Chaudhary, Ramsarup Singh, «High production of carotenoids by the green microalga *Asterarcys quadricellulare* PUMCC 5.1.1 under optimized culture conditions», *PLoS One*. 2019 p. 6-14»
- 52) Lili Gao , Yudong Hu , Jie Liu , Guocheng Du, Jingwen Zhou , Jian Chen, «Stepwise metabolic engineering of *Gluconobacter oxydans* WSH-003 for the direct production of 2-keto-L-gulonic acid from D-sorbitol», *Metabolic Engineering* 24, 2014,p.30–37
- 53) Teruhide Sugisawa, Taro Miyazaki,Tatsuo Hoshino, «Microbial production of L-ascorbic acid from D-sorbitol, L-sorbose, L-gulose, and L-sorbose by *Ketogulonicigenium vulgare* DSM 4025», *Biotechnol Biochem* 2005, 69(3), p.659-662
- 54) Jing Zhang, Jie Liu, Zhongping Shi, Liming Liu, Jian Chen, «Manipulation of *B. megaterium* growth for efficient 2-KLG production by *K. Vulgare*», *Process Biochemistry* 45,2010, p. 602–606
- 55) Temitope Banjo, Sarafadeen Kareem, Paul Akinduti, Temitope Popoola, Oluseyi Akinloye, «Optimization and production of ascorbic acid by fusant cell of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamarii*», *Journal of King Saud University*, 2018, p.6
- 56) Konstantinos Papoutsisa, Simona Grassob, Ajay Menona, Nigel P. Bruntona, James G. Lyng, Jean-Christophe Jacquiera, Deep Jyoti Bhuyan, «Recovery of ergosterol and vitamin D₂ from mushroom waste - Potential valorization by food and pharmaceutical industries», *Trends in Food Science & Technology* 99,2020, p.351–366
- 57) Tan T., Zhang M., Gao H., «Ergosterol production by fed-batch fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology*», 33(4),2003, p. 366–370

- 58) Ankita Nandi, Liang-Jun Yan, Chandan Kumar Jana, Nilanjana Das, «Role of Catalase in Oxidative Stress- and Age-Associated Degenerative Diseases», Volume 2019, p.19
- 59) Poonam Singh, “Chapter 2 - Microbial Enzyme in Food Biotechnology”, Production, Applications, and Future Prospects, 2019, p.19-28
- 60) «Biotics Research Corporation» [Электронный ресурс: - [Режим доступа]: <https://www.bioticsresearch.com/our-story>
- 61) Catalase Antioxidant [Электронный ресурс: - [Режим доступа]: https://shop.suzcohen.com/products/catalase?_pos=1&_sid=ee4d6d2af&_ss=r
- 62) Основний постачальник субстанції [Электронный ресурс: - [Режим доступа]: https://www.alibaba.com/product-detail/Catalase-Catalasecatalase-Food-Grade-Catalase-Enzyme_1600267318473.html?s=p
- 63) Захараш М.П., Пойда О.І. Кучер М.Д. «Хірургія». — Київ : Медицина, 2006. С. 150—178.
- 64) Населення [Электронный ресурс: - [Режим доступа]: <https://www.pravda.com.ua/rus/news/2020/01/23/7238191/>
- 65) Кукурудзяний екстракт [Электронный ресурс: - [Режим доступа]: https://www.alibaba.com/product-detail/High-Quality-Food-Grade-Corn-Steep_60046720411.html?spm=a2700.7724857.normal_offer.d_title.726a58acf7ajKk;
- 66) Лимонна кислота [Электронный ресурс: - [Режим доступа]: <https://prom.ua/p1286831197-limonnaya-kislota-25kg.html?;>
- 67) Пептон [Электронный ресурс: - [Режим доступа]: https://www.alibaba.com/product-detail/Bulk-Peptone-Industrial-Grade-Bulk-Peptone_1600194350518.html?spm=a2700.7724857.normal_offer.d_title.6739331d4NeMoB&s=p&bypass=true;
- 68) М'ясний екстракт [Электронный ресурс: - [Режим доступа]: <https://www.carlroth.com/com/en/extracts/meat-extract/p/x975.2>
- 69) NH₄Cl [Электронный ресурс: - [Режим доступа]: <https://prom.ua/p756844734-ammonij-hloristyj.html?&primelead=MC42NA;>

- 70) $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ Електронний ресурс: - [Режим доступу]: <https://prom.ua/p1026096734-kalij-fosfornokislyj-zameschennyj.html?;>
- 71) Калунянц К. А., Голгер Л. И., Балашов В. Е. Оборудование микробиологических производств. – М.: Агропромиздат, 1987. – 398 с.
- 72) Ушаков В.М., Скиба А.И. Балістичний дезінтегратор мікроорганізмів Електронний ресурс: - [Режим доступу]: <http://www.freepatent.ru/patents/2021348>
- 73) Шапхаев Е.Г., Циренов В.Ж., Чебунина Є.И., «Основі біотехнологі. Дезінтеграція мікробних клітин» - ВСГТУ, Улан-Уде, 2005. – 53 с.
- 74) Схеми сушильних установок Електронний ресурс: - [Режим доступу]: <https://dl.sumdu.edu.ua/textbooks/22852/266179/index.html>
- 75) Дозатори : [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://technowagy.com.ua/product-category/dozandpack-ua/dosing-uk/>
- 76) Промышленное смешивающее оборудывание. ХимМикс: [Електронний ресурс] - Режим доступу: <http://himmiks.com.ua>
- 77) Відцентровий насос :[Електронний ресурс]– https://prom-nasos.com.ua/catalog/pumps-by-type/console_pumps/bz-40-125-22-v-dcentroviy-monoblochniy-nasos-z-nerzhav-yucho-stal/
- 78) Емкости из нержавеющей стали от 20 до 20000 литров:[Електронний ресурс] – Режим доступу:<http://stprom.com.ua/p15745045-emkosti-nerzhaveyuschej-stali.html>
- 79) Приточно-витяжні установки АФ: [Електронний ресурс]– Режим доступу:<http://v-z.com.ua/ua/category/pritочно-vytzhnye-ustanovki -af/>
- 80) . Фильтр карманный грубой очистки воздуха G3-G4:[Електронний ресурс]– Режим доступу: <http://air-klimat.prom.ua/p203201321-filtr-karmannyj-gruboj.html>
- 81) Компрессор винтовой Atlas Copco GX 7 10P / 400В 3ф 50Гц без N / CE: [Електронний ресурс] – Режим доступу:<http://www.companyair.ru/kompressor-vintovoj-atlas-copco-gx7-10p-400v-3f-50hz-bez-n-ce>
- 82) Системы воздухоподготовки: [Електронний ресурс] - Режим доступу:http://www.ukm.ru/systemy_vozduhopodgotovki/28.
- 83) Электрический канальный нагреватель: [Електронний ресурс] – Режим доступу: http://www.airone.ru/s2/catalog_2/?ID=59&SECTION_ID=303

- 84) Реактор високого тиску: [Електронний ресурс] – Режим доступу
https://russian.alibaba.com/product-detail/stainless-steel-high-pressure-stirred-chemical-reactor-60439334283.html?spm=a2700.md_ru_RU.maylikeexp.1.6b0877b4DIv4Yr
- 85) Хімічний реактор [Електронний ресурс] – Режим доступу
<https://russian.alibaba.com/product-detail/farfly-tank-mixer-stirring-kettle-chemical-reactor-with-high-quality-713052052.html?spm=a2700.galleryofferlist.0.0.44625b23RyTGII>
- 86) Airpol. Фільтри тонкої очистки: [Електронний ресурс] // Режим доступу:
<http://www.airpol.com.ua/catalog/ochystka-povtria/filters/filtry-tonkoj-ochystky/>
- 87) ТОВ.Агромаш. Ферментери: [Електронний ресурс] // Режим доступу:
<http://www.agro-mash.ru/fermenter.html>
- 88) Стерелізаційні системи безперервної дії: [Електронний ресурс] // Режим доступу: // <http://sdlcentrifuge.ru/9-continuous-sterilization-system/192767>
- 89) Збірник культуральної рідини Chinz Електронний ресурс: - [Режим доступу]:
<https://russian.alibaba.com/product-detail/high-quality-stainless-steel-chemical-reactor-with-jacket-60322172411.html?spm=a2700.galleryofferlist.0.0.6dbf1fbbwE2U2I&s=p>
- 90) Центрифуга відстійна Електронний ресурс: - [Режим доступу]:
https://russian.alibaba.com/product-detail/settling-for-avocado-oil-drilling-mud-dehydration-decanter-centrifuge-1600308288959.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal_offer.d_title.524e26absYBwly
- 91) Реактор-збірник Електронний ресурс: - [Режим доступу]:
<https://russian.alibaba.com/product-detail/high-quality-304-and-316l-stainless-steel-chemical-reactor-stirrer-62028576539.html?spm=a2700.galleryofferlist.0.0.31f023b7NLzqjc>
- 92) Дезінтегратор ультразвуковий промисловий Електронний ресурс: - [Режим доступу]: https://www.hielscher.com/de/i16000_p.htm
- 93) Реактор для збирання концентрату Електронний ресурс: - [Режим доступу]:
https://www.alibaba.com/product-detail/50-10000-L-Stainless-Steel-Stirred_1600072258584.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal_offer.d_title.75593eecBy7vzD

- 94) Мала сублимаційний сушарка місткістю 140 кг Електронний ресурс: - [Режим доступу]: <http://ru.chinafreeze-dryer.com/product/small-freeze-dryer-1g10-with-130kg-capacity>
- 95) Ваговий дозатор ВД-1 Електронний ресурс: - [Режим доступу]: <https://packtech.com.ua/uk/obladnannya/dozuvalne/dozatory-sypuchykh-produktiv/vd-1-vd-4>
- 96) Термотоннель с ручным запайщиком ТТ-15-Р Електронний ресурс: [Режим доступу]: <https://packtech.com.ua/oborudovanie/termousadochnye/termotonnel/tt-15-p>
- 97) Дробарка валкова Електронний ресурс: - [Режим доступу]: https://russian.alibaba.com/product-detail/direct-selling-reliable-quality-customized-stainless-steel-salt-roller-crusherrock-salt-crusher-1600218648939.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal_offer.d_title.1ffb78caSMcCTC&s=p
- 98) Вібросито 220В, Електронний ресурс: - [Режим доступу]: https://russian.alibaba.com/product-detail/high-output-round-vibrating-screen-separator-screener-sifter-grader-60784836884.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal_offer.d_title.1b84db30Kditho&s=p
- 99) Насоси відцентрові Електронний ресурс: - [Режим доступу]: https://teploradost.com.ua/centrobezhnyj-poverhnostnyj-nasos-speroni-cs-32160-b-22-kvt?clid=Cj0KCQjw-Mr0BRDyARIsAKEFbeeybOantyJh19S-jwWqnMHCgtTmoRZ5D_mqujT1ga2y65xDgSKBb9kaAt-LEALw_wcB
- 100) Змішувач сипучих продуктів Електронний ресурс: - [Режим доступу]: <https://tehnolog.com.ua/uk/catalog/pharma/mixer-of-bulk-materials/>
- 101) Обладнання для автоматичного заповнення капсул Електронний ресурс: - [Режим доступу]: <https://minipress.ru/pharma/ukrainian/equipment-with-reviews/filling-of-gelatin-capsules/powder-rtc-20c/>
- 102) Дозатор капсул Електронний ресурс: - [Режим доступу]: <https://www.oborud.info/product/jump.php?25960&c=1385>

- 103) Етикетувальник автоматичний НПЛ40 Електронний ресурс: - [Режим доступу]: <https://packhouse.com.ua/ua/p1175403639-etiketirovschik-avtomaticheskij-npl40.html>
- 104) Пирог Т.П., Пенчук Ю.М., Технологія мікробного синтезу лікарських засобів: методичні рекомендації до виконання курсової роботи // К.: НУХТ, 2015. с.44-45
- 105) Климова В.А., «Основные микрометоды анализа органических соединений», М.:Химия, 1975, с. 224
- 106) Визначення вуглецю Електронний ресурс: - [Режим доступу]: <https://chem21.info/page/105046224125199217100170064075061155219065081033/>
- 107) Препараты ферментные. Методы определения органолептических, физико-химических и микробиологических показателей Електронний ресурс. – [Режим доступу]: <http://docs.cntd.ru/document/1200023407>
- 108) Змішувач сипучих продуктів Електронний ресурс: - [Режим доступу]: <https://tehnolog.com.ua/uk/catalog/pharma/mixer-of-bulk-materials/>
- 109) Обладнання для автоматичного заповнення капсул Електронний ресурс: - [Режим доступу]: <https://minipress.ru/pharma/ukrainian/equipment-with-reviews/filling-of-gelatin-capsules/powder-rtc-20c/>
- 110) Дозатор капсул Електронний ресурс: - [Режим доступу]: <https://www.oborud.info/product/jump.php?25960&c=1385>
- 111) Етикетувальник автоматичний НПЛ40 Електронний ресурс: - [Режим доступу]: <https://packhouse.com.ua/ua/p1175403639-etiketirovschik-avtomaticheskij-npl40.html>
- 112) В. І.Чуєшов, «Технологія ліків промислового виробництва», НФаУ; Золоті сторінки, 2003. — с. 384
- 113) ДФУ. Доповнення 4. – Х., 2020, с.256
- 114) «Лікарські засоби. Належна виробнича практика», СТ-Н МОЗУ 42-4.0, 2016, с.140