

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)
Грегірчак Н.М.
(підпис) (прізвище та ініціали)
«__» _____ 2021 р.

«До захисту допущено»
Завідувач кафедри
Пирог Т.П.
(підпис) (прізвище та ініціали)
«__» _____ 2021 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ МАГІСТРА

зі спеціальності 162 “Біотехнології та біоінженерія”
(код та назва спеціальності)
освітньо-професійної програми “Фармацевтична біотехнологія”
на тему: «Біотехнологічний потенціал лактобактерій»

Виконав: здобувач 2 курсу, групи 01

Хижнякова Анастасія Віталіївна
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник Волошина Ірина Миколаївна
(прізвище, ім'я та по батькові повністю) (підпис)

Консультанти _____
(прізвище та ініціали) (підпис)

_____ (прізвище та ініціали) (підпис)

_____ (прізвище та ініціали) (підпис)

Рецензент Білик О.А.
(прізвище та ініціали) (підпис)

Засвідчую, що в цій кваліфікаційній
роботі немає запозичень із праць
інших авторів без відповідних
посилань.

Здобувач _____
(підпис)

Київ – 2021 р.

РЕФЕРАТ

Дипломний проект присвячений розробленню технологічної та апаратурної схеми для біосинтезу *Lactobacillus rhamnosus* 71.38 для одержання біомаси, з подальшим лізисом, для використання у виробництві Prebiotic Thermal Spring Water. Технологічна схема біосинтезу включає допоміжні роботи (підготовка миючих та дезінфікуючих засобів, підготовка та стерилізація поживного середовища для культивування) та технологічний процес (підготовка посівного матеріалу для культивування).

За літературним даними було обрано найбільш економічно доцільний штам продуцент та поживне середовище; підібраний ферментер, який задовольняє умови культивування. На основі техніко-економічного обґрунтування було розраховано та спроектовано виробництво пробіотичного лосьону Prebiotic Thermal Spring Water.

Дипломний проект складається із вступу, дев'яток розділів, списку використаної літератури (57 найменування), 3 листів технологічної схеми формату А1, 3 листів апаратурної схеми формату А1. Загальний обсяг роботи – 102 сторінки, 5 рисунків, 14 таблиць.

Ключові слова: пробіотик, *Lactobacillus rhamnosus* 71.38, лосьон, поживне середовище, Prebiotic Thermal Spring Water, лікарський засіб.

ЗМІСТ

ЗМІСТ.....	3
ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ 1. Загальна характеристика лактобактерій.....	6
1.1. Таксономічний статус.....	6
1.2. Морфолого-культуральні властивості.....	6
1.3. Фізіолого-біохімічні властивості.....	7
РОЗДІЛ 2. Властивості лактобактерій.....	9
2.1. Антагоністичні властивості.....	9
2.2. Антиоксидантні властивості.....	9
2.3. Імуномодулюючі властивості.....	10
РОЗДІЛ 3. Препарати, що отримують за допомогою лактобактерій.....	11
3.1. Пробіотичні препарати на основі лактобактерій.....	11
3.2. Бактеріоцини лактобактерій та їх характеристика.....	16
3.3. Імуномодулятори на основі лактобактерій.....	17
РОЗДІЛ 4. Технологія отримання біомаси бактерій <i>Lactobacillus rhamnosus</i> для використання її в якості імуномодулятора.....	21
4.1. <i>Lactobacillus rhamnosus</i> для виробництва пробіотиків.....	21
4.2. Технологія отримання біомаси <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	22
РОЗДІЛ 5. Техніко-економічне обґрунтування.....	27
5.1. Передумови виробництва ЛЗ.	27
5.1.1. Потреба у цільовому продукті та розрахунок потужності виробництва.....	27
5.1.2. Вибір форми випуску лікарського засобу.....	28
5.1.3. Опис лікарського засобу згідно проекту АНД.....	32
5.2. Розрахунок потреби у субстанції для випуску ЛЗ.....	35
5.2.1. Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера.....	35
5.2.2. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу... ..	36
РОЗДІЛ 6. Обґрунтування вибору технологічної схеми біосинтезу субстанції та технологічної схеми виробництва ЛЗ	39
6.1. Обґрунтування вибору біологічного агента, поживного середовища для його культивування.....	39
6.2. Обґрунтування способу підготовки поживного середовища.....	43
6.3. Обґрунтування вибору способу культивування і типу ферментера.....	45
6.4. Обґрунтування стадій виділення і очищення субстанції для виробництва ЛЗ.....	46
6.5. Обґрунтування вибору класів чистоти виробничих приміщень виробництва ЛЗ (підготовки персоналу, дезинфікуючих засобів, вентиляційного повітря), вибору первинної упаковки ЛЗ.....	50
РОЗДІЛ 7. Опис технологічного процесу виробничого біосинтезу..	59

7.1. Специфікація обладнання ділянки виробничого біосинтезу.....	59
7.2. Опис технологічної схеми виробничого біосинтезу.....	61
7.3. Контроль ділянки біосинтезу (карта постадійного контролю).....	69
РОЗДІЛ 8. Опис технологічного процесу виділення і очищення	
нанаоміцину.....	73
8.1. Специфікація обладнання процесу отримання лізату біомаси...	73
8.2. Опис технологічної схеми процесу отримання лізату біомаси...	76
РОЗДІЛ 9. Опис технологічного процесу виробництва ЛЗ.....	79
9.1. Специфікація обладнання ділянки виробництва ЛЗ.....	79
9.2. Опис технологічного процесу виробництва ЛЗ.....	82
ВИСНОВКИ.....	94
ЛІТЕРАТУРА.....	96

ВСТУП

Лактобактерії досить давно широко застосуються в приготуванні харчових продуктів. Лактобактерії та, відповідно, їх метаболіти мають статус GRAS (Generally Recognized as Safe), і як наслідок можуть бути використані в харчовій та фармацевтичній промисловостях.

В біотехнології лактобактерії використовуються для виробництва молочної кислоти, для створення пробіотиків в формі лікувальних препаратів, виробництві імуномодуляторів. Лактобактерії здатні до синтезу бактеріоцинів - токсинів білкової природи, що обумовлюють їх антагоністичну активність для інгібування іншої близькоспорідненої бактерії, а також здатні продукувати речовини, що мають антиоксидантні властивості.

В останні роки показана можливість використання біомаси лактобацил *Lactobacillus rhamnosus* як імуномодуляторів. Показана ефективність її застосування в профілактиці і лікуванні імуноасоційованих захворювань людини і розкриті механізми імунокорегуючої дії [11; 37].

Метою даної роботи був аналіз біотехнологічного потенціалу лактобацил та удосконалення технології отримання біомаси лактобацил *Lactobacillus rhamnosus* в промисловому масштабі для використання в якості імуномодулятора в фармацевтичній промисловості.

РОЗДІЛ 1. ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ЛАКТОБАКТЕРІЙ

1.1. Таксономічний статус

Рід *Lactobacillus* належить к домену Bacteria, відділу Firmicutes, класу Bacilli, ряду Lactobacillales, родині Lactobacillaceae, рід *Lactobacillus*. Рід *Lactobacillus* об'єднує більше 100 видів, а деякі види включають два або більше подвидів. В науковій літературі замість назви лактобацили (*Lactobacillus*) можна зустріти термін лактобактерії (*Lactobacterium*). Лактобацили або лактобактерії - це грам-позитивні факультативно анаеробні непатогенні неспороутворюючі бактерій. І хоч в 1971 році Міжнародним комітетом з номенклатури бактерій була прийнята назва *Lactobacillus*, правильніше було б називати їх бактеріями [28]. Лактобактерії з древніх часів широко застосовуються в приготуванні харчових продуктів, а в біотехнології для виробництва молочної кислоти, для створення пробіотиків в формі лікувальних препаратів, виробництві імуномодуляторів. Лактобактерії та, відповідно, їх метаболіти мають статус GRAS (Generally Recognized as Safe), і як наслідок можуть бути використані в харчовій та фармацевтичній промисловостях. Свою назву вони отримали завдяки властивості перетворюють лактозу і інші цукри на молочну кислоту і термін «молочнокислі бактерії» (МКБ) часто використовується по відношенню до бактерій роду *Lactobacillus*. Але треба мати на увазі, що ряд *Lactobacillales* (молочнокислі бактерії) об'єднує родини *Lactobacillaceae*, *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Leuconostocaceae* та *Streptococcaceae* [31].

1.2. Морфолого-культуральні властивості лактобактерій

Бактерії роду *Lactobacillus* характеризуються морфологічною різноманітністю: закруглені на кінцях палички поодинокі, у парах або у

					НУХТ БТЕК 02.02.17 ПР КЗ				
Зн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата					
Розроб.		Хижнякова А.В.			Вступ	Літ.		Арк.	Акрушів
Керівник		Волошина І.М.							
Консультант									
Зав.каф.		Пирог Т.П.							
						Кафедра БТМ ⁶			

ланцюжках. Зазвичай палички довгі, 0,7–1,1 до 3,0–8,0 мкм, але зустрічаються короткі, що мають вигляд коків, і навіть звивисті форми (рис. 1.1.а). Довжина палочек залежить від умов культивування, складу поживного середовища, температури вирощування, віку культури. Лактобактерії забарвлюються за Грамом позитивно, спор не утворюють (рис. 1.1.б). Більшість представників роду *Lactobacillus* нерухомі і лише деякі представники декількох видів можуть рухатися за допомогою перітріхіально розташуваних джгутиків [45].

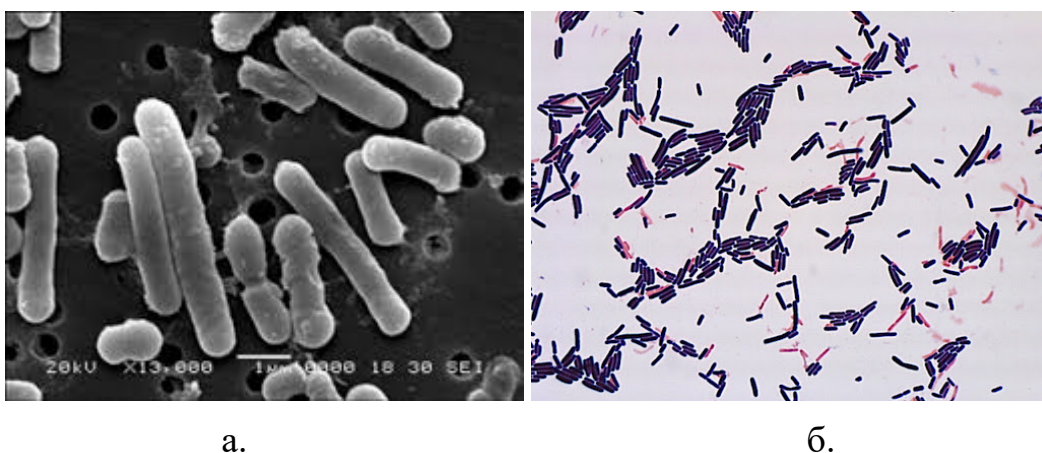


Рис. 1.1. Зображення *Lactobacillus*: а – електронна мікроскопія, б – світлова мікроскопія (забарвлення за Грамом)

На щільних поживних середовищах лактобактерії утворюють сферичні колонії округлої форми, гладкі, непрозорі, інколи блискучі, з рівним контуром. Зазвичай колонії маленькі, непігментовані, білого або кремового кольору, рідко – жовтуваті або красноваті (рис. 1.2).

1.3. Фізіолого-біохімічні властивості

Лактобактерії мають різноманітні фізіологічні та біохімічні властивості, але всі вони здатні до бродіння і лактат обов'язково є серед кінцевих продуктів бродіння. Залежно від продуктів, що утворюються в результаті бродіння та їх співвідношення розрізняють гомоферментативне і гетероферментативне молочнокисле бродіння.

Кінцевими продуктами гомоферментативного молочнокислого бродіння є молочна кислота, яка становить більше ніж 85% всіх продуктів бродіння, та незначні кількості фумаровою і бурштиною кислот, летких кислот, етилового спирту і вуглекислого газу. Кінцевими продуктами гетеоферментативного молочнокислого бродіння є молочна кислота, оцтова кислота, етанол та вуглекислий газ.



Рис. 1.2. Ріст *Lactobacillus* на середовищі МРС

По типу живлення лактобактерії відносяться до хемоорганогетеротрофів, тобто вони можуть рости тільки на складних середовищах, які містять різні органічні речовини. Лактобактерії можуть зброджувати моносахариди, такі як глюкозу, фруктозу, та дисахариди, такі як лактозу, цукрозу, а деякі види гетероферментативних бактерій можуть ще зброжджувати пентози, такі як рибоза, ксилоза та арабіноза. Лактобактерії – поліауксотрофні організми. Середовище для вирощування повинно містити різні фактори росту – амінокислоти, вітаміни - які лактобактерії не можуть синтезувати самостійно. Більшість видів лактобактерій потребують для свого розвитку такі вітаміни як рибофлавін, пантатенову та нікотинову кислоти, тіамін.

По відношенню до температури лактобактерії є мезофільними організмами з температурним оптимумом в діапазоні 30°C – 40°C, але зустрічаються і термофільні види, які ростуть при температурі 45°C.

По відношенню до кисню більшість лактобактерій є факультативними анаеробами або мікроаерофілами, але зустрічаються і строгі анаероби.

По відношенню до кислотності середовища лактобактерії є кислотостійкими. рН середовища для росту зазвичай встановлюють на рівні 5,4-6,4.

РОЗДІЛ 2. ВЛАСТИВОСТІ ЛАКТОБАКТЕРІЙ

2.1. Антагоністичні властивості

Встановлено, що лактобактерії мають антагоністичні властивості, хоч механізми дії відрізняються один від одного [23]. Антимікробний ефект може бути зумовлений утворенням молочної кислоти, як кінцевого продукту зброджування вуглеводів, що знижує рН середовища, і як наслідок оказує бактерицидну дію на сторонню мікрофлору. Лактобактерії продукують речовини, які мають високу антагоністичну активність по відношенню до споріднених видів бактерій, - бактеріоцинів, таких як лактоцин, сакацин, баваріцин, курвацин, хелветіцин, казеїцин. Лактобактерії можуть утворювати перекису водню та діацетил, що пригнічує розвиток таких патогенів як *Staphylococcus aureus* та бактерії виду *Pseudomonas*. Показано, що штам *Lactobacillus reuteri* здатний продукувати лізоцим, що призводить до руйнування стінок бактеріальних клітин [43]. Лактобацили виду *Lactobacillus reuteri* здатні також до утворення реутеріну (3-гідроксипропіональдегід), який має широкий спектр антибактеріальної активності [42].

2.2. Антиоксидантні властивості

Антиоксиданти широко застосовуються в сучасній медицині як речовини, що здатні стримувати утворення вільнорадикальне окиснення органічних речовин мономолекулярним киснем, для профілактики ряду хвороб, підвищення імунітету та загального сповільнення старіння організму. Встановлено, що лактобактерії здатні продукувати речовини, що мають антиоксидантні властивості [4]. Показано, наприклад, що штамми *L. casei* та *L. fermentum* синтезують ферменти глутатіонпероксидазу, глутатіонтрансферазу, УДФ- глюкорозилтрансферазу та інші, які мають

					НУХТ БТЕК 02.02.17 ПР КЗ					
Зн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата						
Розроб.		Хижнякова А.В.			РОЗДІЛ 2. ВЛАСТИВОСТІ ЛАКТОБАКТЕРІЙ		Літ.		Арк.	Акрушів
Керівник		Волошина І.М.								
Консультант							Кафедра БТМ ₀			
Зав.каф.		Пирог Т.П.								

антиоксидантні властивості. Супернатант, що був отриманий при вирощуванні лактобактерій, інгібував перекисне окислення ліноленової кислоти [55]. *L. acidophilus* та *L. brevis* показали високу інгібуючу активність по відношенню до перекисного окислення ліпідів, стійкість до перекису водня, гідроксильних радикалів та активності глутатіонпероксидази [40]. Показана здатність штаму молочнокислих бактерій *L. rhamnosus* LB3 до синтезу позаклітинного ензиму таназу, який здійснює трансформацію танінів з утворенням галоїдної кислоти, яка має антиоксидантні та онкопротекторні властивості [46].

2.3. Імуномодулюючі властивості

В багатьох наукових публікаціях показана імуномодулюючі властивості пробіотиків виготовлених на основі лактобактерій. Імуномодулятори на основі лактобактерій не просто стимулюють імунні реакції, а й підтримують збалансованість дії імунної системи. Пробіотики проявляють антагоністичну активність щодо багатьох патогенних та умовно патогенних мікроорганізмів і при цьому їх застосування не обумовлює утворення резистентних до них форм мікроорганізмів, корегують біоценоз кишкового тракту та сприяють детоксикації речовин, що утворюються в організмі під впливом патогену [14; 39; 52; 53]. В багатьох проведених дослідженнях показано позитивний вплив пробіотиків на шлунково-кишкові захворювання та при лікуванні вагінальних інфекцій, доведена також стимулююча дія пробіотиків на імунітет [54]. Показана також позитивний ефект застосування пробіотиків при алергічних та ракових захворюваннях, інфекції дихальних та сечовивідних шляхів [38]. Імуномодулятори на основі лактобактерій широко використовуються як безпечні та ефективні фармацевтичні препарати для профілактики та захисту дихальних шляхів від вірусно-бактерійних інфекцій.

					НУХТ БТЕК 02.02.17 ПР КЗ						
Зн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата							
Розроб.		Хижнякова А.В.			РОЗДІЛ 3. ПРЕПАРАТИ, ЩО ОТРИМУЮТЬ ЗА ДОПОМОГОЮ ЛАКТОБАКТЕРІЙ			Лім.	Арк.	Акрушів	
Керівник		Волошина І.М.									
Консультант								12 <i>Кафедра БТМ</i>			
Зав.каф.		Пирог Т.П.									

імунний статус [14]. Крім того, лактобактерії здатні до синтезу ферменту лактази, який гідролізує лактозу (молочний цукор), тим самим запобігає розвитку лактазної недостатності.

Лактобактерії, що застосовують для виготовлення пробіотичних препаратів, повинні відповідати наступним вимогам: мати високу здатність до адгезії до клітин; попереджувати або послаблювати адгезію патогенів; зберігати життєздатність та розмножуватися; утворювати кислоти, перекис водню та бактеріюцини як антагоністів росту патогенних мікроорганізмів; бути безпечними і сприяти формуванню нормальної збалансованої мікрофлори організму господаря [48].

Серед лактобацилл, що застосовуються для виготовлення пробіотиків, найбільш популярними є *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus reuteri*, біфідобактерії та деякі штами *Lactobacillus casei* та *Lactobacillus acidophilus* [48]. Біотехнологія виробництва пробіотичних препаратів передбачає окреме культивування різних штамів та їх подальше змішування у певних пропорціях. Препарати пробіотиків можуть містити біомасу одного штаму, або двох і більше штамів. Наприклад, пробіотик VSL3 є сумішшю восьми різних штамів. Пробіотичний ефект залежить від конкретного штаму, а конкретний штам може проявляти різні властивості залежно від того використовується він поодиноці, або в сукупності з іншими штамми. Деякі дослідження показують, що використання мультикомпонентних пробіотиків більш ефективне [34]. Дослідження пробіотиків, зокрема створених на основі *Lactobacilli*, інтенсивно ведуться у всьому світі і більш ніж 5700 наукових статей було опубліковано за 2000–2014 на тему “*Lactobacillus*” (“Probiotic *Lactobacillus*” PubMed 2014) (для порівняння лише 180 статей на цю ж тему було опубліковано за 1980–2000 роки [47]). Не всі штами лактобактерій є пробіотиками. Найбільш вивчені штами *Lactobacillus*, які використовуються про виробництві пробіотиків показані у таблиці 3.1.

Таблиця 3.1. Найбільш вивчені штами *Lactobacillus*, які використовуються на виробництві пробіотиків [48]

Штам	Фірма- дистриб'ютор	Лікування
<i>L. rhamnosus</i> GG	Valio, Хельсинки, Фінляндія, Campina, Нідерланди	Кишечковий тракт
<i>L. acidophilus</i> NCFM	Rhodia, Вісконсин Медісон	Кишечковий тракт
<i>L. casei</i> Shirota	Yakult, Токіо, Японія	Кишечковий тракт
<i>L. reuteri</i> MM53	BioGaia, Стокгольм, Швеція	Кишечковий тракт
<i>L. casei</i> CRL431	Chr. Hansen, Вісконсин Мілуокі	Сечостатеві шляхи
<i>L. rhamnosus</i> GR-1	Urex, Лондон, Канада а	Сечостатеві шляхи
<i>L. fermentum</i> RC-14	Urex, London, Canada	Сечостатеві шляхи

Різні види та штами лактобацил входять до складу пробіотиків. В таблиці 3.2 наведена характеристика деяких препаратів, які присутні на вітчизняному ринку (табл. 3.2).

Таблиця 3.2. Лактобацили, що входять до складу деяких пробіотиків

Назва препарату	Лактобацили, що входять до складу препарату	Виробник
1 покоління		
Лакто	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Хербосьютикалс СКМ, Індія
Лактобактерін	<i>Lactobacillus acidophilus</i> або <i>L. plantarum</i> або <i>L. fermentum</i>	ПрАТ «Біофарма», Україна
Біобактон сухий	<i>Lactobacillus acidophilus</i> штамм В-2991	ООО «Біобактон», Росія
БіоГая (BioGaia)	<i>Lactobacillus reuteri</i> С 55730	BioGaia, Швеція
2 покоління		
Оптілакт	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Фарма Старт ООО,

	19070-2; <i>L. reuteri</i> DSM 12246	Україна, Київ
Лінекс	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus gasseri</i>	Сандоз, Словенія
Лактинекс	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i>	США
Ацілакт	<i>Lactobacillus acidophilus</i> штами NK ₁ , 100 _{ам} та K ₃ Ш ₂₄	Фермент фірма, Росія
Аціпол	<i>L. acidophilus</i> штами NK1, NK2, NK5 та NK12	Фермент фірма, Росія
Лацидофіл	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. rhamnosus</i>	Institut Rosell, Канада
На основі продуктів життєдіяльності		
Хілак	Продукти життєдіяльності <i>Lactobacillus acidophilus</i> DSM 4149 <i>Lactobacillus helveticus</i> DSM 4183 <i>Escherichia coli</i> DSM 4087 <i>Enterococcus</i> <i>faecalis</i> DSM 4086	Merckle, Німеччина

Треба відмітити, що, спектр пробіотичних препаратів на українському ринку лікарських препаратів досить широкий, але переважають імпортовані пробіотики, а вітчизняні пробіотики, які є ліофілізованими монопрепаратами, складають лише 16 % [24].

На Україні традиційно вивчали властивості молочнокислих бактерій. В Інституті мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного впродовж багатьох років ведеться наукова робота по вивченню фізіології та пробіотичних властивостей молочнокислих бактерій. У відділі розроблено технології отримання для застосування в ветеринарії таких пробіотиків на основі молочнокислих бактерій як лактин, бовілакт та лактосан.

Розробці нових пробіотиків на основі лактобактерій присвячені сучасні розробки українських вчених. В Національному технічному університеті України "Київський політехнічний інститут" розроблена технологія нового мультипробіотику на основі 5 штамів бактерій роду *Lactobacillus* та рослинного препарату карбюлоза [7]. Розроблено технологію промислового виробництва пробіотичного препарату на основі лактобацил *Lactobacillus*

plantarum 8P-A3 та біфідобактерій штаму *Bifidobacterium bifidum* ЛВА-3 [24]. Для покриття селенодефіциту у харчуванні запропоновано використання пробіотичних продуктів на основі *Lactobacillus plantarum* збагачених селеном [12].

3.2. Бактеріоцини лактобактерій та їх характеристика

Лактобактерії здатні до синтезу бактеріоцинів - токсинів білкової природи, що обумовлюють їх антагоністичну активність для інгибування іншої близькоспорідненої бактерії. Лактобактерії продукують бактеріоцини – пептиди з високою молекулярною масою, які мають вузький спектр дії, не сприймають бактерицидних агентів, і які можна використовувати для лікувальння деяких бактеріальних інфекцій (Табл. 3.3).

Таблиця 3. Бактеріоцини лактобактерій [2]

Штам-продуцент	Бактеріоцин	Спектр дії бактеріоцина
<i>Lactobacillus sake</i>	Лактоцин S	<i>Lactobacillus</i> spp. <i>Leuconostoc</i> spp. <i>Pediococcus</i> spp.
<i>Lactobacillus sake</i>	Сакацин Р	<i>Lactobacillus</i> spp. <i>Carnobacterium</i> spp.
<i>Lactobacillus sake</i>	Сакацин А	<i>Lactobacillus</i> spp. <i>Carnobacterium piscicola</i> <i>Enterococcus</i> spp. <i>Listeria monocytogene</i>
<i>Lactobacillus bavaricus</i>	Баваріцин А	<i>Lactobacillus</i> spp. <i>Lactococcus</i> spp. <i>Pediococcus</i> spp. <i>Enterococcus</i> spp. <i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Лактацин F	<i>Lactobacillus</i> spp. <i>Enterococcus faeca</i>
<i>Lactobacillus curvatus</i>	Курвацин А	<i>Lactobacillus</i> spp. <i>Carnobacterium</i> spp. <i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Lactobacillus helveticus</i>	Хелветіцин J	<i>Lactobacillus helveticus</i> <i>Lactobacillus bulgaricus</i>

		<i>Lactobacillus lactis</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	Казеїцин 80	<i>Salmonella typhimurium</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Salmonella enteritidis</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	Казеїцин TN-2	<i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	Лактоцин 705	<i>Listeria monocytogenes</i> <i>Lactobacillus plantarum</i>

3.3. Імуномодулятори на основі лактобактерій

Імуномодулятори – препарати що використовуються для лікування та профілактики захворювань, що пов'язані із порушеннями імунітету. Відомо, що лактобактерії, що входять до складу пробіотиків, впливають на імунний статус макроорганізму, підвищуючи рівень неспецифічної резистентності організму, а також посилюючи клітинний і гуморальний імунітет. Препарати з клітинних стінок лактобактерій і препарати на основі лізатів лактобактерій відносяться до імуномодуляторів.

Одним із способів виробництва імуномодуляторів на основі лактобацил – це отримання екстрактів із їх біомаси. Отримання екстракту із лактобацилл детально описано в патенті [30]. Для отримання екстракту можливо було використовувати один або суміш будь яких штамів з числа: *Lactobacillus fermentum* I-3929, *Lactobacillus rhamnosus* 71.38, *Lactobacillus plantarum* 71.39, *Lactobacillus johnsonii* 103782, та *Lactobacillus helveticus* 103146, які зберігаються в Національній колекції культур мікроорганізмів, Париж, Франція. Для отримання екстракту проводили вирощування бактерій, виділення біомаси та лізис клітин. При виготовленні середовища для вирощування клітин використовували рослинні матеріали, наприклад сою, щоб запобігти ризику пріон асоційованих захворювань при застосуванні сировини тваринного походження. У разі необхідності біомаса після ферментації може бути інактивована температурною обробкою, сконцентрована та заморожена. Руйнування клітин (лізис) може бути

проведено механічним, ензиматичним або хімічним способом. Лізат (продукт лізису клітин) фільтрують для видалення нуклеїнових кислот та великих залишків порушених клітин, такі як нерозчинені та великі суспендовані частки. Кількість нуклеїнових кислот присутніх у екстрактах повинна становити менш ніж 100 $\mu\text{г/мл}$. Мембрани та клітинна стінки можуть бути розчинені або суспендовані в екстрактах, включаючи ліпопротеїни, діпептиди, пептидоглюкани, ліпоолігосахаріди, ліпотейхові кислоти та тейхові кислоти. В процесі лізису компоненти клітини, такі як мембрани та клітинна стінка можуть бути хімічно модифіковані, тобто розщеплені на менші структури в результаті лужного гідролізу. Однак, це не знижувало біологічну активність препарату в порівнянні з цілими клітинами. Лужна обробка може використовуватися для лізису клітин, або може застосована до клітин, які вже були лізовані іншим методом.

Екстракт фільтрували, а потім проводили очищення хроматографічним способом, ультрафільтрацією ультрацентрифугуванням, екстракцією органічними речовинами, або комбінацією цих методів. Екстракцію повторювали декілька разів. В патенті наводяться декілька прикладів отримання імуномодулятора. Наприклад, для штаму *Lactobacillus fermentum* I-3929.

Приготування посівного матеріалу вели:

1). В маленьких колбах. Середовище для культивування готується розчиненням в очищеній воді наступних компонентів, г/л: хлорид натрію (NaCl), 3; гідрофосфат натрію (Na_2HPO_4), 2; ацетат натрію (CH_3COONa), 1; соєвий пептон, 50; глюкоза ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), 12; хлорид кальцію (CaCl_2), 0,1; хлорид калію, KCl , 0,1; бікарбонат натрію (NaHCO_3), 0,5; піруват, ($\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_3$), 0,1; глутамату натрію ($\text{C}_5\text{H}_8\text{NNaO}_4$), 0,2; розчин слідових елементів 0,5 мл/л середовища (сульфат міді (CuSO_4), 3; хлорид заліза (FeCl_2), 830; сульфат цинку (ZnSO_4), 860; сірчана кислота (H_2SO_4), 1,1 мг/л). Поліпропіленгліколь (0,02 мл/л, питома вага 1,005 г/мл) було добавлено. рН середовища не корегували. Після стерилізації в кожную маленьку колбу Ерленмейера вносили

по 1,5 мл заморожених бактеріальних клітин та інкубували при 37°C протягом 8 годин.

2). *В великих колбах.* Потім 20 мл культури переносили в колби Ерленмейера кожна з 1000 мл подібного середовища і інкубували при в тих же умовах 16 годин. Культуральна рідина з 1 л колби переносили в посівний ферментер.

3). *Посівний ферментер.* Посівний ферментер містить 20 л поживного середовища того ж самого складу, що описано вище. Вирощування вели без аерації, температура інкубації була 37°C, частота обертів мішалки 100 об/хв. Після 24 годин вирощування 7 л культуральної рідини з оптичною щільністю (ОЩ) 1,23 (при 700 нм) з посівного ферментера передали в стерильних умовах в ферментери.

4). *Основна ферментація.* Вирощування бактерій в ферментері з 70 л поживного середовища вели на середовище того ж складу, що описано вище. Після стерилізації в середовище додатково вносили глюкозу, 8 г/л. Вирощування вели без аерації, температура інкубації була 37°C, частота обертів мішалки 100 об/хв. рН 5,7 підтримували протягом вирощування. Після 16 годин вирощування бактеріальну культуру (ОЩ 2,3 при 700 нм) інактивували нагрівом до 65°C протягом 35 хв і передавали в збірник для зберігання. Бактеріальна культуру подавали на ультрафільтрацію для віддалення біомаси від рідкої фази, концентрували та промивали розчином NaCl (9 г/л) в очищеній воді. Вихід отриманої біомаса складав 31,8 мг сухої біомаси на г концентрованої бактеріальної суспензії (маса концентрованої бактеріальної суспензії була 2000 г). Біомасу заморожували при -15°C для зберігання.

5). *Отримання лізату.* Лужний гідроліз: 6 г сухої бактеріальної біомаси *Lactobacillus fermentum* I-3929 відтаювали при кімнатній температурі, розчиняли у очищеній воді до концентрації 12 г сухої бактеріальної біомаси на л. Лужну обробку проводили 0,03 М гідроксидом натрію. рН перед початком лізису становило 10,3. Лізис проводили протягом 6 годин при 40°C

при постійному перемішуванні. Після закінчення лужної обробки рН становило 9,9.

Кислотний гідроліз: рН бактеріальної біомаси після лужного гідролізу доводили до 3,6 соляною кислотою, 25% і витримували на водяній бані при 40°C протягом 1 години при статичних умовах.

6). *Очищення лізату.* Лізат центрифугували при 3000 x g протягом 20 хвилин. рН супернатанту доводили до 6,8 NaOH 10N та фільтрували через каскад фільтрів з діаметром пор 0,45 μm та 0,2 μm, і остаточно через стерильний фільтр з діаметром пор 0,22 μm. Концентрат мав наступну характеристику: протеїн: 2,8 мг/мл; ДНК: 17,4 μг/мл.

РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЯ ОТРИМАННЯ БІОМАСИ *LACTOBACILLUS RHAMNOSUS* ДЛЯ ВИКОРИСТАННЯ ЇЇ В ЯКОСТІ ІМУНОМОДУЛЯТОРА

4.1. *Lactobacillus rhamnosus* для виробництва пробіотиків

Lactobacillus rhamnosus GG детально вивчених штам лактобактерій. Цей штам було відділено з кишечника здорової людини у 1983 американськими вченими Шервудом Горбачем та Баррі Голдіном, що залишилося у його назві: GG - це скорочено від прізвищ дослідників - Sherwood Gorbach та Barry Goldwin [51]. Цей пробіотик вважається одним з найбільш досліджених у світі: про нього було опубліковано біля 900 наукових статей та проведено 200 клінічних іспитів [33].

В останні роки інтенсивно ведуться дослідження в напрямку використання біомаси лактобацил як імуномодуляторів. Показана їх ефективність в профілактиці і лікуванні імуноасоційованих захворювань людини і розкриті механізми імунокорегуючої дії [11; 37]. Доведена доцільність використання пробіотику *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) для лікування гострої діареї та профілактики респіраторних захворювань [41]. Було показано, що пептидоглюкан клітинної стінки *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505 має унікальні імуномодельючі властивості, яких не виявлено для пептидоглюканів інших молочнокислих бактерій, наприклад, *L. plantarum* CRL1506. Показано, що пептидоглюкан *L. rhamnosus* CRL1505 зберігав імуномодуляторні властивості живих бактеріальних клітин [41].

Lactobacillus rhamnosus GG показав високу виживаність шлунковому соку та високу адгезійну властивість до клітин епітелію кишечника. Він також стимулює проліферацію епітеліальних клітин кишечника та посилює секрецію муцинів, які забезпечують захист епітелію кишечника проти дії

					НУХТ БТЕК 02.02.17 ПР КЗ				
Зн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата					
Розроб.		Хижнякова А.В.			РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЯ ОТРИМАННЯ БІОМАСИ ДЛЯ ВИКОРИСТАННЯ ЇЇ В ЯКОСТІ ІМУНОМОДУЛЯТОРА	Літ.	Арк.	Аркушів	
Керівник		Волошина І.М.							
Консультант									
Зав.каф.		Пирог Т.П.				Кафедра БТМ ²¹			

патогенів, антибіотиків та негативних факторів при неправильному харчуванні. Основна специфіка цього штаму – це його здатність посилювати та підтримувати імунну систему та його позитивний вплив на процес перетравлення [44]. В квітні 2020 *L. rhamnosus* офіційно рекласифіковано як *Lacticaseibacillus rhamnosus*, тобто повна назва штаму нині *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG [57].

Роботами останніх років підтверджені імуномодулюючі властивості також у бактерій *Lactobacillus fermentum* [56].

Показана можливість використання структурно-метаболітичних комплексів штаму *Lactobacillus rhamnosus* GG для створення нових протимікробних засобів [9].

4.2. Технологія отримання біомаси *Lactobacillus rhamnosus*

Детальний опис отримання біомаси лактобактерій *Lactobacillus rhamnosus* 71.38 дано в патенті [30].

Приготування посівного матеріалу вели:

Лабораторні умови в колбах:

Середовище для культивування готується розчиненням в очищеній воді наступних компонентів, г/л: хлорид натрію, 3; гідрофосфат натрію, 2; ацетат натрію, 1; соєвий пептон, 50; глюкоза, 12; хлорид кальцію, 0,1; хлорид калію, 0,1; бікарбонат натрію, 0,5; піруват, 0,1; глутамату натрію, 0,2; розчин слідових елементів 0,5 мл/л середовища (сульфат міді, 3; хлорид заліза, 830; сульфат цинку, 860; сірчана кислота, 1,1 мг/л, очищена вода до 1 л. рН не корегували. Після стерилізації середовища в маленькі колби Ерленмейера вносили 1,5 мл заморожених бактерій і інкубували при 35°C протягом 9 годин. 20 мл цієї культури переносили в колби Ерленмейера з 1000 л поживного середовища і інкубували при 35°C 15 годин. Після цього 1 л культуральної рідини переносили у посівний ферментер.

Посівний ферментер.

20 л поживного середовища того ж складу, що описано вище, заливали в посівний ферментер, додавали поліпропілен гліколь, 0,02 мл на л, рН не корегували. Вирощування вели при 35°C з перемішуванням 100 rpm, але без аерації. Після 9 годин вирощування 7 л культуральної рідини передавали в ферментер (ОЩ при 700 нм посівної культури після 9 годин 3,75). Культуральну рідину із посівного ферментера стерильно передавали ферментери.

Основна ферментація.

Готували 70 л поживного середовища того ж самого складу що і для посівного ферментера. Після стерилізації додавали 8/л глюкози і інкубацію вели при 35°C з перемішуванням 100 об/хв без аерації. Після 14 годин культуру (ОЩ при 700 нм 5,43) інактували нагрівом при 65°C протягом 35 хвилин і передавали в збірник. Бактеріальна культура подавали на ультрафільтрацію для віддалення біомаси від рідкої фази, концентрували та промивали розчином NaCl (9 г/л) в очищеній воді. Маса концентрованої бактеріальної суспензії була 2798 g (при 51,7 мг сухої біомаси на 1 г концентрованої бактеріальної суспензії) і заморожувалася при -15°C.

Пошуку середовищ для вирощування молочнокислих бактерій *Lactobacillus rhamnosus* присвячено багато досліджень. Найбільш розповсюдженим середовищем, яке застосовується для вирощування молочнокислих бактерій є MPC (MRS) – середовище, що було запропановано Де Маном, Рогоза и Шарпом (de Man, Rogosa, Sharp) і на сьогодні вважається оптимальним для культивування лактобактерій. MRS містить, г/л: пептон з казеїну, 10,0; м'ясний екстракт, 8,0; дріжджовий екстракт, 4,0; глюкоза, 20,0; фосфат калію двозаміщений, 2,0; твін-80, 1,0; амоній лимоннокислий двозаміщений, 2,0; ацетат натрію, 5,0; сульфат магнію, 0,2; сульфат магнану, 0,04, вода дистильована до 1 л. Автори [49] проводили порівнянні ефективності росту лактобактерій *Lactobacillus rhamnosus* PEN на середовищі MPC і оптимізованому середовищу, що містило, г/л: глюкоза, 13,4; натрій піруват, 3,4; м'ясний екстракт, 7,2; калій фосфат, 2,0; натрій

ацетат, 5,0: цитрат амонію, 2,0. Вирощування вели в біореакторі об'ємом 1 л, який було заповнено на 50% відповідним середовищем з внесенням 2% інокуляту. Оптимальним рН для росту лактобацил було значення 6,0. Вирощування вели при температурі 37°C, при перемішванні 100 об/хв, без аерації. Отримані результати показали, що концентрація біомаси по сухій масі після 16 годин інкубації в біореакторі на оптимізованому середовищі була 5,5 г/л, що було навіть вище ніж на середовищі МРС. До того ж запропановане середовище було дешевше ніж МРС.

В роботі [1] було проведено порівняння показників росту лактобактерій *L. rhamnosus* LB при використанні глюкозо-піруватного середовища, яку було описано [49] і середовища на соєвого борошна [27] (табл. 4.1).

Таблиця 4.1. Ефективність живильних середовищ для вирощування лактобактерій *L. rhamnosus* LB

Показники інтенсивності накопичення біомаси	Середовище культивування		
	МРС	Глюкозо-піруватне	Соєве
Суха біомаса, г/л	5,8	4,3	4,7
Оптична густина	0,74	0,48	0,69
Кількість КУО, КУО/мл	$2,5 \times 10^8$	$6,0 \times 10^6$	$1,9 \times 10^8$

Оптимальними умовами вирощування молочнокислих бактерій на соєвому середовищі була температура 37°C, рН середовища 7,0, кількість посівного матеріалу з концентрацією клітин 10^9 КУО/мл складала 5% від об'єму о середовища. Культивування лактобактерій вели глибинним способом без аерації протягом 24 год. Автори вважають, що глюкозо-піруватне живильне середовище є більш технологічним і економічним ніж МРС, а соєве живильне середовище при додатковом внесенні глюкози дешеве ніж обидва вище зазначених середовища, але склад його не постійний і залежить від складу соєвого порошку. Соєве середовище готували розведенням сухого соєвого порошку в воді (75 г на 1 л), відстоювали, фільтрували через бейтінг, кип'ятили, охолоджували до 38 – 40°C, вносили пепсин, 10 г/л, і термостатували при температурі 37°C протягом 4 годин,

доводили рН гідролізату до 4,5 20% розчином NaOH, кип'ятили та фільтрували. Отриманий гідролізат розбавляють дистильованою водою 1: 1 і додають, г/л,: глюкозу, 15; фосфат калію двозаміщений, 2,0; натрій ацетат, 5,0; цитрат амонію, 2,0, і стерилізують [27].

Показана можливість використання гідролікатів зернової сировини при обробці протеолітичними ферментами в якості єдиного джерела поживних речовин для глибинного культивування лактобактерій [25]. Пшеничне борошно змішувалося з водою (1:5), к суспензії додавали 2% препарату протеази (Protex 40E, «Дженекор Даниско», Бельгія) з оптимальним значенням рН 8,6 і температури 60°C, гідролізат фільтрували через бейтінг та стерилізували. При порівнянні динаміки росту штаму *L. rhamnosus* B-8238 на середовищі MRS та в гідролізаті пшеничного борошна було показано відсутність значних відмінностей, а кінцева концентрація клітин лактобактерій була $1,0 \times 10^9$ КОЕ/мл. Питома швидкість росту лактобацил на середовищі MRS була 0,39 год⁻¹, а на гідролізаті пшеничного борошна 0,40 год⁻¹ (Рис. 4.1).

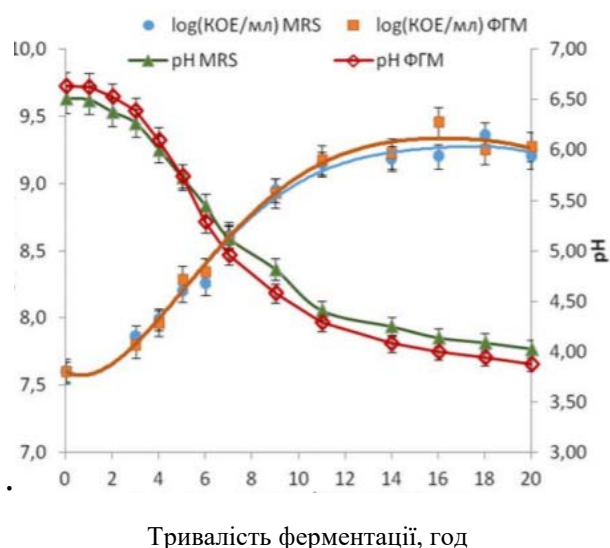


Рис. 4.1. Динаміка росту культури *L. rhamnosus* і зміна рН на середовищі MRS і ферментативному гідролізаті пшениці

При виборі поживного середовища для отримання біомаси *L. rhamnosus* використовували середовища, що містила гідролізати молока, пептонів, триптонів, дріжджових екстрактів [20]. Культивування вели в ферментері при температурі 30°C та рН 5,6 –5,8 протягом 12 годин. Перше середовище не мало ростових добавок (С), в друге вносили пептон (СП), а третє середовище було гідролізоване молоко з стимуляторами росту (ГМС). Порівняльна характеристика поживних середовищ наведена в таблиці 4.2.

Таблиця 4.2. Порівняльна характеристика поживних середовищ для культивування *L. rhamnosus*

Середовище	Кількість клітин в 1 мл за час культивування, год						рН
	0	4	6	8	10	12	
С	6×10^7	8×10^7	2×10^8	1×10^9	1×10^9	2×10^9	4,1
СП	6×10^7	8×10^7	1×10^8	4×10^8	6×10^8	2×10^9	4,2
ГМС	6×10^7	8×10^7	$2,5 \times 10^8$	$1,0 \times 10^9$	$1,3 \times 10^9$	$1,5 \times 10^9$	4,0

Найкращі результати були отримані на середовищі ГМС. Оптимізація цього середовища дозволило підвищити кількість клітин на 12 годину культивування до 6×10^9 КОЕ/мл. Склад цього середовища був наступним: гідролізоване молоко, 96,75%, дріжджовий екстракт, 3%, Актибакт-Углич-М (бактеріальний стимулятор росту молочнокислих бактерій) або інουλін, 0, 25%. Гідроліз молока вели протеолітичним ферментом протосубтілін в кількості 3 % від вмісту білка в середовищі протягом 3 годин при температурі 55°C. Доза інокулята складала 5 %. В роботі показано, що додовання солей, таких як сульфату магнію, дигідроортофосфату калію, ацетату натрію, ацетату амонію, не впливало на ріст лактобактерій.

РОЗДІЛ 5. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

5.1. Передумови виробництва ЛЗ.

5.1.1. Потреба у цільовому продукті та розрахунок потужності виробництва.

Останні роки по всьому світі спостерігається підвищена цікавість до пробіотичних препаратів, завдяки їх властивостям. Згідно з літературних джерел, пробіотичний штам *Lactobacillus rhamnosus*, що входить до складу пробіотиків, впливає на імунний статус макроорганізму, підвищуючи рівень неспецифічної резистентності організму, а також посилюючи клітинний і гуморальний імунітет. Препарати з клітинних стінок лактобактерій і препарати на основі лізатів лактобактерій відносяться до імномодуляторів.

Класична технологія виробництва пробіотиків передбачає пероральне застосування препаратів, однак останні дослідження показали позитивний ефект пробіотичних препаратів нанесених на поверхню шкіри у вигляді кремів. Шкіра — це самостійна екосистема, або мікробіом, схожий з мікрофлорою кишківнику. Вона виступає в якості першого захисного бар'єру організму та знаходиться у нерозривному зв'язку з імунною системою.

Отже косметологічн компанія La-Roche Posay розробили низку препаратів, до складу яких входять пробіотичні штами. Одним з них є Prebiotic Thermal Spring Water зроблений на основі пробіотичного мікроорганізму *Lactobacillus rhamnosus*. Цей засіб рекомендовано використовувати, на сам перед, при проблемах з підвищеною сухостою шкіри, але можливо застосовувати і в якості щоденного засобу для зволоження шкіри.

Згідно статистикою, в Україні проживає 20,009 мільйонів жінок, з них 11,328 віком від 25 до 64 років. З них близько 5% складає жінки з проблемою «сухої» шкіри.

					НУХТ БТЕК 02.02.17 ПР КЗ				
Зн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата					
Розроб.		Хижнякова А.В.			РОЗДІЛ 5. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ	Літ.		Арк.	Акрушів
Керівник		Волошина І.М.							
Консультант									
Зав.каф.		Пирог Т.П.							
						27 Кафедра БТМ			

$$20.009.000 \cdot 0,05 = 1.000.450$$

Тобто приблизно 1 мільйон потенційних споживачів нашої продукції. Але в умовах високої конкуренції на косметологічному ринку, будемо вважати, що тільки 1% від цієї кількості буде купувати нашу продукцію.

$$1000450 \cdot 0,01 = 10000$$

Отже маємо приблизно 10000 клієнтів, які будуть купувати нашу продукцію.

Випуск плануємо в 180 мл ємностях. При щоденному використанні однієї ємності буде хватати на 1 місяць. Тобто на рік

$$1 \cdot 12 \cdot 150 = 1,8 \text{ л}$$

Кількість лізованої біомаси в препараті складає 0,5 %, отже

$$1,8 \text{ л} \cdot 0,5\% = 9 \text{ г}$$

Тоді для усіх споживачів

$$9 \text{ г} \cdot 10000 = 270\,000 \text{ г} = 90 \text{ кг біомаси на рік.}$$

Продуктивність продуцента складає 5,6 г/л, тоді

$$90000 \text{ г} / 5,6 \text{ г/л} = 16070 \text{ л культуральної рідини.}$$

5.1.2. Вибір форми випуску лікарського засобу

У останні роки пробіотичні мікроорганізми все частіше використовуються у косметичних засобах. Це пов'язано з їх багатокомпонентними властивостями та речовинами, що вони синтезують. Пробіотики, які використовуються в косметичних засобах, відновлюють природний баланс шкіри і підвищують її стійкість до зовнішніх факторів. Регулярне використання косметичних засобів з пробіотиками, відновлює баланс мікробного складу шкіри і підтримує його упродовж певного часу, створюючи нормальний для шкіри рівень рН і інші умови, що забезпечують її нормальне функціонування [22].

Завдяки тому, що лактобацилли здатні синтезувати органічні кислоти (молочну, оцтову), багатоатомні спирти, ферменти глікозидази і ліпази, бактеріоцини, вітаміни групи А, В, С і К, їх лізати використовують як

компонент косметичних кремів для догляду за чутливою проблемною шкірою при зовнішньому лікуванні гіперфункції сальних залоз. Також лізати *Lactobacillus* вносять у захисні косметичні креми і маски по догляду за шкірою з ослабленим імунним захистом, для регенерації і відновлення шкіри, для боротьби з віковим старінням шкіри та старінням викликаним ультрафіолетовим опроміненням (фотостарінням), для поліпшення тургору шкіри, її еластичності і пружності та відновлення рогового шару, а також для комплексного догляду за шкірою, включаючи живлення, зволоження, профілактику старіння [22].

Для створення лікувальних косметичних засобів частіш за все використовують *Lactobacillus acidophilus*, *L. amylovorus*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. brevis*, *L. crispatus*, *L. delbrueckii* (subsp *bulgaricus*, *lactis*), *L. fermentum*, *L. helveticus*, *L. gallinarum*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. salivarius*, *L. alimentarius*, *L. curvatus* або суміші декількох різних видів. Також в останні роки для покращення лікувального ефекту шкіри використовують суміш лізатів представників *Lactobacillus* та *Bifidobacterium* [22]

Лосьйони – рідкі косметичні засоби, призначені для догляду і (або) лікування шкіри та її придатків. Згідно ДСТУ 4093—2002 [6] “Лосьйони та тоніки косметичні”, лосьйон косметичний — це водно-спиртовий, спирто-водний розчин або рідка емульсія (суспензія) біологічно активних речовин і корисних добавок, ароматизаторів і барвника (або без нього — для лосьйонів косметичних на емульсійній основі); засіб догляду за шкірою, волоссям, нігтями та для ароматизації. Однак цей стандарт не регламентує виробництво лосьйонів, які є лікарськими косметичні ми засобами.

Згідно з Британською Фармакопеєю, лосьйони є рідкими або напіврідкими лікарськими засобами, які містять одну або більше діючих речовин у відповідному розчиннику і призначені для нанесення на непошкоджену шкіру без втирання [32].

За Європейською Фармакопеею лосьйони належать до рідких лікарських засобів для нанесення на шкіру і являють собою розчини, емульсії або суспензії різної в'язкості, що можуть містити одну або більше активних речовин у відповідному розчиннику [35].

У літературі трапляються такі визначення лосьйонів: лосьйон суміш двох або більше рідин, повністю розчинних одна в одній; лосьйон – водно-етанольні розчини різних активних речовин органічного і неорганічного походження.

Лосьйон є популярною лікарською формою для лікування та профілактики захворювань шкіри завдяки низці переваг:

- до складу лосьйонів можна вводити інгредієнти розчинні у воді і спиртах, олії з емульгаторами, витяжки з лікарської рослинної сировини;
- лосьйони часто містять етанол, завдяки чому вони є мікробіологічно стабільними і не потребують додаткового введення консервантів;
- висока біологічна доступність лікарських речовин;
- можливість застосовувати на значних поверхнях шкіри, а також на ділянках, вкритих волоссям, та слизових оболонках;
- на відміну від м'яких лікарських засобів для зовнішнього застосування лосьйони легко наносяться на шкіру, терапевтична дія поєднується з процесом очищення шкіри; лосьйони швидко висихають на шкірі, не забруднюючи її;
- застосування лосьйонів не потребує змивання завдяки чому їх зручно використовувати в дорожніх умовах.

Лосьйони широко застосовують для лікування багатьох дерматологічних захворювань – вугрової висипки (акне) себореї піодермій, розацеа, грибкових уражень шкіри і волосся.

Як діючі речовини лосьйони містять антисептики (кислота саліцилова, кислота борна, резорцин, мірамістин, ефірні олії), антибіотики (левоміцетин, еритроміцин), кератолітики (кислота саліцилова, сірка), сульфаніламідні препарати (стрептоцид), в'язучі компоненти (танін, галун, солі алюмінію),

підсушувальні речовини (цинку оксид, крохмаль, тальк), кортикостероїди (гідрокортизон, бетаметазон) [3].

Зокрема, лосьйони для лікування вугрової хвороби, які представлені на фармацевтичному ринку України, містять такі діючі речовини:

- бензоїлпероксид у концентрації 10 % (кератолітик, антисептик) — “Угресол” (PharmaScience, Канада);
- еретритромідин-цинковий комплекс еритроміцину (антибіотик) 40 мг/мл, цинку ацетату дигідрату 12 мг/мл «Зинерит» (Yamanouchi, Нідерланди);
- фснокснпропанол (антисептик) — “Лосьйон від вугрів доктора Тайсса” (Naturwaren, Німеччина);
- бактимілен 1 мг/мл (ПАР, що має бактерицидні і фунгіцидні властивості та здатність зв'язувати воду) “Celebis” (фарм. фабрика НВО “Ельфа”, Україна);
- хлоргексидину біглюконат (антисептик) — «Клерасил» (Crookes Healthcare, Велика Британія).

Як допоміжні речовини у складі лосьйонів застосовують регулятори рН (кислоти – молочну, лимонну, оцтову, борну); регулятори в'язкості (гліцерин, пропіленгліколь, похідні целюлози); солюбілізатори (пентол, цетиловий спирт) – зокрема для розчинення ароматичних речовин при значних концентраціях спирту в складі лосьйону; стабілізатори (желатозу, трагакант, камеді) для лосьйонів суспензійного типу; емульгатори (ПАР різних груп – для лосьйонів емульсійного типу [5].

Допоміжні речовини у складі лосьйонів підбирають з урахуванням сумісності їх з іншими компонентами та фармакологічної дії, яку вони справляють.

Так, регулятори в'язкості лосьйонів (полівінілпіролідон, метилцелюлоза) утворюють на поверхні шкіри тонку плівку і запобігають втраті води. Застосування ефірних олій, азулену, тимолу, ментолу та інших природних ароматичних речовин у концентрації від 0,01 % до 0,3 % крім надання

приємного запаху забезпечує нормальне функціонування клітин шкіри, стимулює регенерацію тканин, запобігає процесам передчасного старіння [3].

Якість лосьйонів згідно з вимогами ДФУ оцінюють за такими показниками: опис, ідентифікація, кількісне визначення діючих речовин, значення рН, об'єм вмісту контейнера, мікробіологічна чистота [3].

5.1.3. Опис лікарського засобу згідно проекту АНД

АНАЛІТИЧНО НОРМАТИВНА ДОКУМЕНТАЦІЯ

Prebiotic Thermal Spring Water

Лосьйон для гігієнічного догляду за шкірою по 150 мл у флаконах

Склад препарату:

Діюча речовина:

Кількість інгредієнту у флаконі:

Лізат біомаси

20,0 мл

Допоміжні речовини:

Натрію тетроборат

8,0

Гліцерин

15,0

Вода очищена

107,0

СПЕЦИФІКАЦІЯ

Лосьйон для гігієнічного догляду за шкірою по 150 мл у флаконі

Найменування показників	Допустимі межі	Методи контролю
Опис	безбарвна опалесцентна рідина	За п.1, візуально
Автентичність	За показниками фізіолого-біохімічних властивостей лізату біомаси виробничого штаму мікроорганізмів.	За п.2, згідно АНД
Прозорість	безбарвна опалесцентна рідина	ЄФ, 2.2.1.
pH	pH = 6,8 – 7	ЄФ, 2.2.3
Кольоровість	Повинен відповідати еталонному зразку	ЄФ, 2.2.2
Мікробіологічна чистота	В 1 г (мл) загальна кількість життєздатних аеробних мікроорганізмів повинна бути не більше 10^3 бактерій і 10^2 грибів (пліснявих і дріжджових сумарно). <i>S. aureus</i> відсутні в 1г. <i>P.aeruginosa</i> відсутні в 1г. Бактерії сімейства <i>Enterobacteriaceae</i> відсутні в 1г.	ЄФ, 5.1.4.
Специфічна нешкідливість	Не виявляє шкідливих властивостей	
Специфічна активність	Визначають антагоністичну активність та імуномодельюючу активність	Згідно АНД
Зберігання	Зберігати в недоступному для дітей місці при температурі від +15 до +30°C.	Згідно АДН
Термін придатності	2 роки	Згідно АНД

МЕТОДИ КОНТРОЛЮ

Опис. Безбарвна, опалесцентна рідина без запаху.

Прозорість (ЄФ 2.2.1). Для визначення прозорості і ступеня каламутності речовини використовують однакові пробірки з безбарвного прозорого нейтрального скла з плоским дном, що мають внутрішній діаметр від 15 мм до 25 мм. 40-мм шар випробуваної рідини порівнюють із 40-мм шаром свіжоприготовленого еталона. Порівняння рідин проводять у розсіяному денному світлі через 5 хв після приготування еталона, переглядаючи зразки вздовж вертикальної осі пробірок на чорному фоні. Розсіяння світла має бути таким, щоб еталон І легко відрізнявся від води, а еталон ІІ легко відрізнявся від еталона І.

Випробуваний препарат повинен відповідати еталонному стандартному зразку.

Визначення рН (ЄФ, 2.2.3). Потенціометричне визначення рН проводять шляхом вимірювання різниці потенціалів між двома відповідними електродами, зануреними у випробовуваний розчин: один з електродів чутливий до іонів водню (звичайно скляний електрод), другий - електрод порівняння (наприклад, насичений каломельний електрод).

Кольоровість (ЄФ 2.2.2). 2 мл випробуваної рідини порівнюють з 2 мл води або розчинника, або еталона, зазначеного в окремій статті, використовуючи однакові пробірки з безбарвного прозорого нейтрального скла з зовнішнім діаметром 12 мм. Порівняння забарвлення проводять у розсіяному денному світлі, переглядаючи зразки горизонтально(перпендикулярно вісі пробірок) на білому фоні.

Мікробіологічна чистота (ЄФ 5.1.4). Досліджувану суспензію клітин по 0,5 мл засівають на живильний агар з 9 % NaCl, середовище Ендо (для виявлення бактерій групи кишкової палички) і на щільне середовище Сабуро (на відсутність грибів). Посіви з живильним агаром і середовищам Ендо

інкубують 8 діб при $37 \pm 1^\circ\text{C}$, спочатку в горизонтальному, а потім у вертикальному положеннях.

Посіви на середовищі Сабуро інкубують при $23 - 27^\circ\text{C}$ на протязі 8 діб. Загальне число грибів та дріжджів визначають, виходячи зі середнього значення числа колонієутворюючих одиниць.

Якщо в посівах біомаси виявилась стороння мікрофлора, яка перевищує допустимі межі, то контроль здійснюють на подвійній кількості зразків препарату. Після чого препарат бракують або вважають таким, який задовольняє вимоги, що до нього висуваються [3].

Упаковка. В упаковці міститься 1 флакон 150 мл.

Маркування. Згідно оригінал – макету упаковки.

Зберігання. Зберігати в недоступному для дітей місці при температурі від $+15$ до $+30^\circ\text{C}$.

Термін придатності. 2 роки.

5.2. Розрахунок потреби у субстанції для випуску ЛЗ

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

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

Приймаємо кількість робочих трудоднів (Трд) 300, тоді кількість культуральної рідини на добу (V_d) становитиме:

$$V_d = V_{кр} / \text{Трд} = 16070 / 300 = 53,6 \text{ л.}$$

Кількість продукту за цикл:

$$V_{ц} = (K_1 \times V_d \times T_{цф}) / 24 = (1,1 \times 53,6 \times 24) / 24 = 58,96 = 59 \text{ л/цикл,}$$

де $T_{цф}$ – цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу (14 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:

$$N_{\text{ц}} = 16070/59 = 272,3 \text{ цикл.}$$

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

$$V_{\text{Г}} = V_{\text{цк}}/K_{\text{зап}} = 59 / 0,7 = 84,3 \text{ л,}$$

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

У додатку 4 знаходимо найближчий за геометричним об'ємом ферментер $V_{\text{Гф}} = 0,1 \text{ м}^3$.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення $K_{\text{зап}} = V_{\text{ф}} / V_{\text{Гф}} = 59/100 = 0,59$, що не перевищує заданого значення (0,4 – 0,65).

5.2.2. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

За виробничий цикл отримують $V_{\text{кр}} = 59 \text{ л}$ 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:

$$V_{\text{роб.1}} = V_{\text{кр}}/(1-E_{\text{ф}}) = 59/(1-0,1) = 65,6 \text{ л,}$$

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

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері з робочим об'ємом $V_{\text{роб.1}} = 65,6 \text{ л}$.

Розраховуємо можливий геометричний об'єм ферментера ($V_{\text{ф}}$), що становить: $V_{\text{ф1}} = V_{\text{роб.1}}/K_{\text{зап}} = 59 / 0,7 = 84,3 \text{ л}$.

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{сф} = 0,1 \text{ м}^3$ (див. Додаток 4), уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення: $K_{зап1} = V_{роб.1} / V_{сф} = 65,6 / 100 = 0,656$.

Отриманий коефіцієнт заповнення входить у задані межі 0,6 – 0,8.

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

$V_{пс1} = V_{роб.1} / (1 + X_{ф}) = 65,6 / (1 + 0,1) = 59,6 \text{ л}$, де $X_{ф} = 0,1$ – доза посівного матеріалу для ферментера.

Кількість посівного матеріалу становить:

$$V_{пм1} = V_{роб.1} - V_{пс1} = 65,6 - 59,6 = 6 \text{ л.}$$

Для одержання 6 л посівного матеріалу в малому інокуляторі враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 до 15%.

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

$$V_{роб.2} = V_{пм3} / (1 - E_{м.ін}) = 6 / (1 - 0,1) = 6,7 \text{ л.}$$

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:

$V_{пс2} = V_{роб.4} / (1 + X_{м.ін}) = 6,7 / (1 + 0,1) = 6,1 \text{ л}$, де $X_{м.ін} = 0,1$ – доза посівного матеріалу для малого інокулятора.

Кількість посівного матеріалу становить:

$$V_{пм2} = V_{роб.2} - V_{пс2} = 6,7 - 6,1 = 0,6 \text{ л.}$$

Кількість інокуляту $V_{роб.2} = 6,7$ можна одержати під час культивування продуцента в малому інокуляторі геометричним об'ємом

$V_{ін2} = V_{роб.2} / K_{зап} = 6,7 / 0,7 = 9,6 \text{ л}$. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{сф} = 10 \text{ л}$ (див. додаток 4), уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення. $K_{з2} = V_{роб.2} / V_{сф} = 6,7 / 10 = 0,67$.

Для одержання 0,6 л посівного матеріалу в колбах враховуємо втрати, які становлять 1 %.

Кількість посівного матеріалу $V_{роб.3} = 0,6$ 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:

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

Таким чином, для одержання посівного матеріалу необхідно 4 качалочних колб.

Отже, за результатами розрахунків для біосинтезу *Lactobacillus rhamnosus* 71.38 приймаємо до встановлення один ферментер об'ємом $0,1 \text{ м}^3$ (і один запасний), а також один посівний апарат об'ємом $0,01 \text{ м}^3$ (і один запасний).

РОЗДІЛ 6. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ СУБСТАНЦІЇ ТА ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА ЛЗ

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

Пошуку середовищ для вирощування молочнокислих бактерій *Lactobacillus rhamnosus* присвячено багато досліджень. Найбільш розповсюдженим середовищем, яке застосовується для вирощування молочнокислих бактерій є MPC (MRS) – середовище, що було запропоновано Де Маном, Рогоза і Шарпом (de Man, Rogosa, Sharp) і на сьогодні вважається оптимальним для культивування лактобактерій. Однак слід зазначити, що існують альтернативні поживні середовища. Наприклад: Вауер пропонує наступне середовище: хлорид натрію, 3; гідрофосфат натрію, 2; ацетат натрію, 1; соєвий пептон, 50; глюкоза, 12; хлорид кальцію, 0,1; хлорид калію, 0,1; бікарбонат натрію, 0,5; піруват, 0,1; глутамату натрію, 0,2; розчин слідових елементів 0,5 мл/л середовища (хлорид заліза , 830; сульфат цинку, 860.

Автори [49] проводили порівняння ефективності росту лактобактерій *Lactobacillus rhamnosus* PEN на середовищі MPC і оптимізованому середовищу, що містило, г/л: глюкоза, 13,4; натрій піруват, 3,4; м'ясний екстракт, 7,2; калій фосфат, 2,0; натрій ацетат, 5,0; цитрат амонію, 2,0.

В роботі [1] було проведено порівняння показників росту лактобактерій *L. rhamnosus* LB при використанні MPC і середовища на основі соєвого борошна.

Соєве середовище включало такі компоненти г/л: гідролізат соєвий пептон 75; глюкоза, 15; фосфат калію двозаміщений, 2,0; натрій ацетат, 5,0;

					НУХТ БТЕК 02.02.17 ПР КЗ			
Зн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Хижнякова А.В.			РОЗДІЛ 6. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ СУБСТАНЦІЇ ТА ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА ЛЗ	Літ.	Арк.	Акрушів
Керівник		Волошина І.М.						
Консультант						Кафедра БТМ		
Зав.каф.		Пирог Т.П.						

цитрат амонію, 2,0.

Для вибору оптимального середовища проведемо їх порівняння.

Таблиця 6.1

Порівняльна характеристика бактерій *Lactobacillus rhamnosus*

Продуцент	Склад поживного середовища, г/л	Концентрація біомаси, г/л	Умови культивування	Література
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> 71.38	NaCl, 3; Na ₂ HPO ₄ , 2; ацетат натрію, 1; соєвий пептон, 50; глюкоза, 20; CaCl ₂ , 0,1; NaHCO ₃ , 0,5; піруват, 0,1; глутамату натрію, 0,2; FeCl ₃ , 415 мкг; ZnSO ₄ , 430 мкг.	5,6	Температура 35°C Перемішування 100 об/хв без аерації. Час культивування 14 год	[30]
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> PEN	глюкоза, 13,4; натрій піруват, 3,4; м'ясний екстракт, 7,2; K ₃ PO ₄ , 2,0; натрій ацетат, 5,0; цитрат амонію, 2,0	5,5	Температура 37°C, Перемішвання 100 об/хв, без аерації рН 6,0 Час культивування 16 год	[49]
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LB	соєвий пептон 75; глюкоза, 15; Na ₂ HPO ₄ , 2,0; натрій ацетат, 5,0; цитрат амонію, 2,0	4,7	Температура 37°C, без аерації рН 7,0 Час культивування 24 год	[1]
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LB	Пептон – 10; М'ясний екстракт – 10; Дріжджовий екстракт – 5; Глюкоза – 20; Твін-80 – 1; C ₆ H ₅ O ₇ (NH ₄) ₃ – 2; Ацетат натрію – 5; MgSO ₄ x 7H ₂ O – 0,1; MnSO ₄ x 4H ₂ O –	5,8	Температура 37°C, без аерації рН 7,0 Час культивування 24 год	[1]

	0,05; K ₂ HPO ₄ – 2;			
--	---	--	--	--

Порівняльна характеристика технологічного процесу, наведена у таблиці 6.1, якою мірою дозволяє скласти уявлення про переваги того чи іншого продуцента, однак її недостатньо, щоб чітко сформулювати свій вибір, тому у таблицях 6.2 і 6.3 наведено порівняльну характеристику економічної сторони культивування.

Таблиця 6.2

Вартість компонентів поживного середовища для культивування

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації*
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> 71.38	соєвий пептон, 50;	432	21,6	1
	глюкоза, 20;	30	0,6	2
	NaCl, 3	30	0,09	2
	Na ₂ HPO ₄ , 2	110	0,22	2
	ацетат натрію, 1	41	0,041	2
	NaHCO ₃ , 0,5;	12	0,006	4
	глутамату натрію, 0,2	43	0,0086	4
	CaCl ₂ , 0,1	24	0,0024	2
	натрій піруват, 0,1	18090	1,809	3
	FeCl ₃ , 0,000415	410	0,000001	2
	ZnSO ₄ , 0,00043.	31	0,00000013	4
	Вартість 1 л середовища – 24,38 грн			
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> PEN	глюкоза, 13,4	30	0,402	2
	м'ясний екстракт, 7,2;	5053	36,36	5
	натрій піруват, 3,4;	18090	61,516	3
	ацетат натрію, 5,0	41	0,21	2
	цитрат амонію, 2,0	525	1,05	2
	K ₃ PO ₄ , 2,0	125	0,25	8
	Вартість 1 л середовища – 99,79 грн			
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LB	соєвий пептон, 75;	432	32,4	1
	глюкоза, 15;	50	0,75	2
	ацетат натрію, 5,0;	41	0,21	3
	цитрат амонію, 2,0	525	1,05	2

	Na ₂ HPO ₄ , 2,0;	110	0,22	2
	Вартість 1 л середовища – 34,63 грн			
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LB	Пептон – 10	750	7,5	6
	М'ясний екстракт – 10	5053	50,53	5
	Дріжджовий екстракт – 5	186,30	0,93	1
	Глюкоза – 20	50	1	2
	Твін-80 – 1	248	0,25	7
	C ₆ H ₅ O ₇ (NH ₄) ₃ – 2	525	1,05	3
	Ацетат натрію – 5	41	0,21	2
	MgSO ₄ – 0,1	65	0,006	2
	MnSO ₄ – 0,05	43	0,0022	2
	K ₂ HPO ₄ – 2	48	0,1	2
	Вартість 1 л середовища – 61,58 грн			

Примітка. * – Ціни наведено станом на травень 2020 р. 1 –

<https://russian.alibaba.com>, 2 – <https://prom.ua/>, 3 – <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/> 4 – <https://flagma.ua/>, 5 - <http://art-medika.com/catalog/mikrobiologia/components/product-2814.html>; 6 - <https://www.systopt.com.ua/ru/pepton-fermentatyvnyj-2/>; 7 - <https://www.aromasoap.com.ua/pav/polisorb-80-ercasorb-2080-tvin-80.html>; 8 - <https://agreemarket.com.ua/monophosphat-kalija-p-52k-34-03-kg-.html>

Таблиця 6.3

**Умовна вартість 1 г біомаси при культивуванні на різних
середовищах**

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища, грн	Концентрація біомаси СР, г/л	Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн	Тривалість культивування, год	Кількість утвореного продукту за годину, г/год
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> 71.38	24,38	5,6	4,35	14	0,40
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> PEN	99,79	5,5	18,40	16	0,34
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LB	34,63	4,7	7,36	24	0,19
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LB	61,58	5,8	10,61	24	0,24

Отже проаналізувавши данні таблиці 6.2 та 6.3 можна зробити висновок, що найбільш економічно доцільним для виробничого культивування є штам *Lactobacillus rhamnosus* 71.38, так як ціна за 1 грам біомаси буде найменшою, в також, час культивування складає лише 14 годин.

6.2. Обґрунтування способу підготовки поживного середовища

Для обраного штаму *Lactobacillus rhamnosus* 71.38 було обране оптимальне середовище наступного складу, компоненти якого наведені в табл. 2.4.

Згідно розрахунків, наведених у розділі 1, виробниче вирощування біомаси *Lactobacillus rhamnosus* 71.38 здійснюється в ферментері об'ємом 100 л з робочим об'ємом 56,6 л. Одержання інокуляту відбувається у 3 етапи (у колбах на качалці, інокуляторі об'ємом 10 л та ферментері об'ємом 100 л).

Таблиця 6.4.

Склад поживного середовища для одержання біомаси

Lactobacillus rhamnosus 71.38

Компоненти поживного середовища	Вміст компоненту в 1 л поживного середовища, г
Соєвий пептон	50
Глюкоза	20
NaCl	3
Na ₂ HPO ₄	2
Ацетат натрію	1
NaHCO ₃	0,5
Глутамат натрію	0,2
CaCl ₂	0,1
Натрій піруват	0,1
FeCl ₃ · 6H ₂ O	0,000415
ZnSO ₄	0,00043

Компоненти, що входять до складу поживного середовища, мають різні температурні режими і тривалість стерилізації, при стерилізації разом деяких компонентів утворюються осад, тому необхідно розділити їх на такі композиції:

А) Глюкоза, соєвий пептон, глутамату натрію, ацетат натрію, натрій піруват, стерилізуються при температурі 112 °С упродовж 30 хв;

Б) Na₂HPO₄, NaCl, NaHCO₃, CaCl₂, стерилізується при температурі 131 °С впродовж 40 хв;

В) Для FeCl₃ · 6H₂O, ZnSO₄, готується концентрований розчин, якій стерилізуються при температурі 131 °С впродовж 40 хв.

6.3. Обґрунтування вибору способу культивування і типу ферментера.

Як було показано раніше, біологічним агентом було обрано *Lactobacillus rhamnosus* 71.38 який є анаеробним мікроорганізмом і має такі умови культивування: оптимальна температура складає $t=35\text{ }^{\circ}\text{C}$ та швидкості перемішування 100 об/хв [30].

Для культивування молочнокислих бактерій *Lactobacillus rhamnosus* 71.38 в промислових умовах можливо використовувати тільки глибинний спосіб культивування, тому, що при цьому способі найбільший економічний коефіцієнт та він забезпечує стерильність процесу біосинтезу.

Оптимальні умовами для культивування *Lactobacillus rhamnosus* 71.38: температура культивування $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ та оберти мішалки – 100 об/хв. За даних умов культивування є ризик контамінації культуральної ріднини мезофільними і нейтрофільними мікроорганізмами, яких в навколишньому середовищі найбільше, тому необхідне забезпечення асептичних умов при біосинтезі. Асептичність підтримується протягом всього часу культивування. Такі умови забезпечуються попередньою стерилізацією обладнання і комунікацій, компонентів поживного середовища, та усіх компонентів і речовин які потрапляють у ферментер [8,9].

Для одержання біомаси бактерій *Lactobacillus rhamnosus* 71.38 культивування закінчується на прикінці експоненційної фази росту культури, і так як біомаса буде використовуватися в косметологічній промисловості й повинна не містити сторонніх домішок, доцільно буде обрати періодичний спосіб культивування.

Також необхідно підібрати ферментер для одержання біомаси бактерій *Lactobacillus rhamnosus* 71.38. Ферментер повинен бути оснащений перемішуючим пристроєм для рівномірного розподілу поживних речовин, продуктів метаболізму та клітин в об'ємі культуральної рідини, відбивними перетинками, що запобігають утворенню застійних зон при обертанні

мішалки, парову сорочку для підтримки температури 35 °С, бути оснащеним температурними датчиками та датчиками рН.

Так як об'єм ферментера становить 100 л, то для культивування бактерій обираємо ферментер з двохярусною лопатевою мішалкою.

Отже, культивування продуцента *Lactobacillus rhamnosus* 71.38 здійснюють в асептичних умовах глибинним способом у періодичному режимі протягом 14 годин. Температура культивування становить 35 °С, рН середовища культивування становить 6,0, рН, швидкість перемішування – 100 об/хв.

6.4. Обґрунтування стадій виділення і очищення субстанції для виробництва ЛЗ.

6.4.1. Відділення культуральної рідини.

Обґрунтування способу концентрування культуральної рідини

Отриману на стадії виробничого біосинтезу культуральну рідину далі необхідно сконцентрувати. Відомі такі методи концентрування: сепарування, центрифугування, осадження, фільтрування, випарювання.

Широкого застосування набув спосіб отримання біомаси лактобацил що включає вирощування біомаси лактобацил с подальшим концентруванням біомаси методом центрифугування [30].

Недоліком цього способу є механічні втрати цільового продукту, що мають місце при центрифугуванні. З відокремлюваною рідиною йдуть розчинені у воді продукти життєдіяльності лактобацил, відсутність яких негативно позначається на кінцевій якості лізату.

Усунути подібні недоліки дозволяє спосіб отримання лізату лактобацил, що включає вирощування лактобацил, концентрування біомаси перед проведенням лізису і лізис біомаси, в якому попереднє концентрування біомаси здійснюють упарювання у вакуумі в інтервалі температур $t = 35-40^{\circ}\text{C}$, що забезпечує збереження усіх компонентів і ефективність процесу.

Перевага запропонованого способу полягає в тому, що в порівнянні з центрифугуванням, під час вакуум-випарювання в пропонованому діапазоні температур найбільш повно зберігаються біологічні показники (виживання бактерій, кислотоутворення та ін), повністю відсутні механічні втрати. Крім того, попереднє вакуумування біомаси покращує якість препарату [30].

Після вирощування біомаси лактобацил у поживному середовищі, її завантажують у вакуум-випарну установку, де за допомогою підтримки певного рівня вакууму, витратою і температурою гріючого агента встановлюють температурний режим у діапазоні $t = 35-40^{\circ}\text{C}$, необхідний для забезпечення збереження біологічної активності усіх компонентів препарату.

Для забезпечення зниження втрат біомаси необхідно скоротити час перебування термолабільної біомаси в теплообмінних апаратах. Для цього необхідно інтенсифікувати процес тепло- і масообміну, що здійснюється за рахунок створення тонкої плівки рідини. До таких апаратів відносяться трубчаті та роторні випарні апарати [Сидоров Ю.І.].

Для випарювання культаральної рідини, що містить живу біомасу найбільш ефективним є застосування роторного вакуум-випарювача (рис. 6.1), основною відмінністю від трубчатих використання не в'язки труб, а однієї труби, а також спеціальної механічної мішалки (ротора), яка регулює товщину плівки, що стікає по внутрішній поверхні труби.

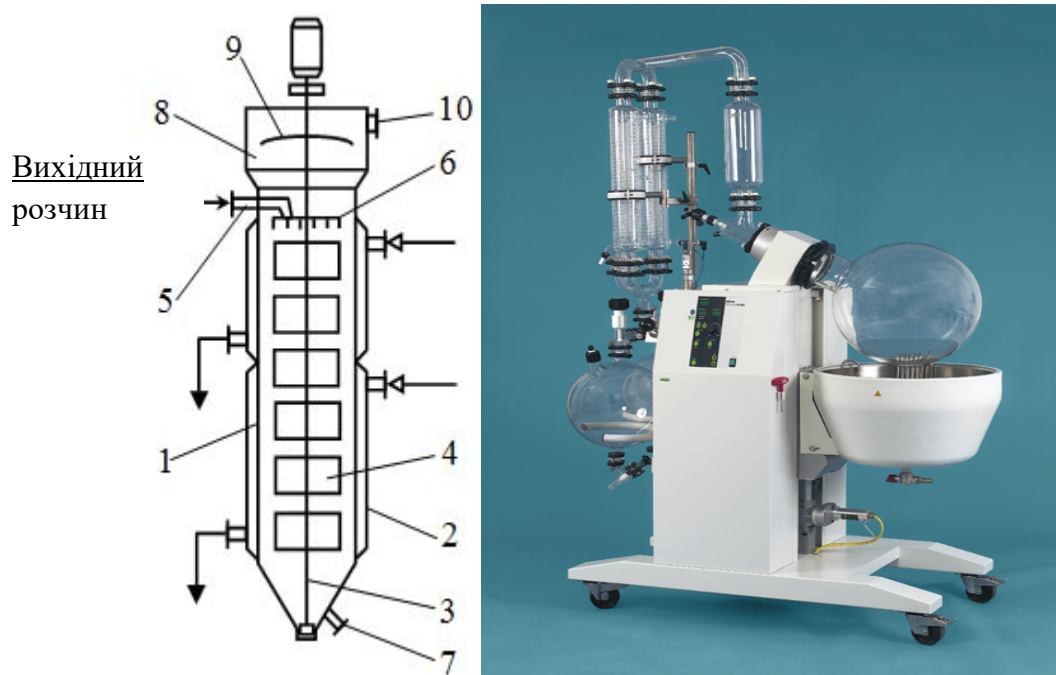


Рис.6.1. Схематичне зображення роторного вакуум-випарювача

Роторний прямоточний апарат (рис. 6.1.) має вертикальний корпус (1) з паровою сорочкою (2). По центру корпусу розташований ротор у вигляді вертикального обертового валу (3) з шарнірно закріпленими на ньому шкребками, за допомогою яких розчин розтирається по внутрішній поверхні труби, утворюючи рівномірну плівку (4).

Необхідний для упарювання вихідний розчин подається у верхню частину корпусу роторного випарного апарату через штуцер (5) у порожнину розподільного кільця (6) з якого випливає у вигляді численних цівок. Зі скребків витяжка розбризкується на обігрівуючу циліндричну поверхню корпусу у вигляді тонкої плівки, з якої відбувається випаровування розчинника. Згущений вихідний розчин біомаси знімається шкребками і під дією сили тяжіння стікає в нижню конічну камеру, з якої безперервно відводиться через штуцер (7). У сепараційній камері (8) з вторинної пари відокремлюються краплі рідини за допомогою краплевідбійника (9). Утворений вторинний пар без крапель захопленої рідини надходить у верхню частину сепараційної камери (8) і через патрубок (10) відводиться до

конденсатора. Роторний випарник може працювати як під атмосферним тиском, так і під вакуумом [26].

Велика швидкість руху рідини в трубках (до 20 м/с) і випарювання в тонкому шарі дозволяють випарювати в цих апаратах витяжки, що містять термолабільні речовини, не побоюючись погіршення їх властивостей.

Найбільш повно життєздатність клітин зберігається при температурі випарювання в діапазоні 35-40°C. Підвищення температури випарювання понад 45°C призводить до інтенсивного відмирання клітин, так при $t = 50^{\circ}\text{C}$ вихід життєздатних клітин склав менш ніж 55% [30]. Концентрування завершували після зменшення об'єму в 5 разів.

Зниження температури випарювання нижче 30°C недоцільно з економічних міркувань, зменшується продуктивність процесу по випаровуванню вологи, збільшується витрата охолоджуючої води і т.д.

6.4.2. Лізування сконцентрованої біомаси *Lactobacillus rhamnosus* 71.38.

Руйнування клітин (лізис) може бути проведено механічним, ензиматичним або хімічним способом. Лізат (продукт лізису клітин) фільтрують для видалення нуклеїнових кислот та великих залишків порушених клітин, такі як нерозчинені та великі суспендовані частки. Кількість нуклеїнових кислот присутніх у екстрактах повинна становити менш ніж 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Мембрани та клітинна стінки можуть бути розчинені або суспендовані в екстрактах, включаючи ліпопротеїни, діпептиди, пептидоглюкани, ліпоолігосахаріди, ліпотейхові кислоти та тейхові кислоти. В процесі лізису компоненти клітини, такі як мембрани та клітинна стінка можуть бути хімічно модифіковані, тобто розщеплені на менші структури в результаті лужного гідролізу. Однак, це не знижувало біологічну активність препарату в порівнянні з цілими клітинами. Лужна обробка може використовуватися для лізису клітин, або може застосована до клітин, які вже були лізовані іншим методом. Відомо, що лізування біомаси можливо

проводити наступними способами: фізичними (термічним, зміною тиску, ультразвуковим) та хімічними (кислотний, лужний гідроліз, обробка ПАВ, наприклад додецилсульфатом натрію, або під дією ферментів.

Для збереження біоактивності усіх компонентів Bauer запропонована технологія двох ступеневого м'якого лізису. Спочатку лужного а потім кислотного. Цей метод дозволяє найбільш повністю зберегти усі біологічно активні компоненти.

Отримання лізату.

Лужний гідроліз: 6 л сконцентрованої бактеріальної біомаси *Lactobacillus rhamnosus* 71.38 піддавали лужної обробці 0,5 М гідроксидом натрію. рН перед початком лізису становило 10,3. Лізис проводили протягом 4 годин при 40°C при постійному перемішуванні. Після закінчення лужної обробки рН становило 9,9.

Кислотний гідроліз: рН бактеріальної біомаси після лужного гідролізу доводили до 3,6 6М соляною кислотою, і витримували при 40°C протягом 1 години при статичних умовах.

6.4.3. Очищення лізату біомаси *Lactobacillus rhamnosus* 71.38.

Лізат центрифугували при 9000 об/хв протягом 20 хвилин.

рН супернатанту доводили до 6,8 NaOH 0,5М та фільтрували через фільтри з діаметром пор 0,45 μm та 0,2 μm для видалення великих залишків клітин, і остаточно через стерильний фільтр з діаметром пор 0,22 μm . Отриманий концентрат використовувався для подальшого виготовлення лікарської форми.

6.5. Обґрунтування вибору класів чистоти виробничих приміщень виробництва ЛЗ (підготовки персоналу, дезінфікуючих засобів, вентиляційного повітря), вибору первинної упаковки ЛЗ.

Стадії та операції технологічного процесу повинні здійснюватися за чітко встановленими методиками; повинні відповідати принципам НВП з

метою одержання продукції необхідної якості та бути у відповідності до ліцензії на виробництво і реєстраційної документації, які їх стосуються.

Стадія підготовки персоналу. Персонал є одним з найбільш активних учасників технологічного процесу, що потребує відповідної підготовки та контролю. Тому необхідна достатня кількість кваліфікованого персоналу для вирішення всіх завдань, які перебувають у сфері відповідальності виробника. Кожен співробітник повинен чітко розуміти індивідуальну відповідальність, яка має бути документована. Весь персонал повинен знати принципи належної виробничої практики, що стосуються його діяльності, а також пройти первинне і подальше навчання відповідно до його обов'язків, включаючи інструктаж із виконання гігієнічних вимог [16].

Складовою частиною відповідної підготовки персоналу є організація його навчання. На підприємстві, в першу чергу потрібно забезпечити навчання персоналу, службові обов'язки якого передбачають перебування у виробничих зонах або контрольних лабораторіях, а також персоналу, діяльність якого може вплинути на якість продукції.

У склад навчання крім основного навчання, що включає теорію і практику GMP, кожний прийнятий на роботу співробітник повинен пройти навчання відповідно до обов'язків, що за ним закріплені. Повинні бути розроблені навчальні програми і затверджені відповідно або керівником виробництва, або керівником відділу контролю якості [16].

Кожен тип виробництв лікарських засобів (виробництво стерильних та нестерильних лікарських засобів) потребує формування відповідних гігієнічних вимог до персоналу. У зв'язку з тим що, даний препарат є стерильним, були складені детальні програми з гігієни праці, адаптовані до потреб підприємства.

При зарахуванні на роботу персонал повинен пройти медичне обстеження. Повинні бути вжиті заходи, що гарантують, наскільки це можливо, що жодний співробітник з інфекційним захворюванням або

відкритими ранами на відкритих ділянках тіла не зайнятий у виробництві лікарських засобів [16].

Кожна особа, яка входить у виробничі зони, повинна носити захисний одяг, що відповідає виконуваним нею операціям. Повинні бути заборонені всі дії, які порушують гігієнічні вимоги усередині виробничих зон або в будь-якій іншій зоні, якщо вони можуть негативно вплинути на продукцію.

Стадія підготовки технологічного одягу. Необхідно, щоб одяг і його якість відповідали процесу і класу робочої зони. Одяг слід носити таким чином, щоб захистити продукцію від контамінації.

Клас D: волосся має бути закрите. Слід носити звичайний захисний костюм і відповідне взуття або бахіли.

Клас C: волосся має бути закрите. Необхідно носити комбінезон або брючний костюм, а також відповідне взуття або бахіли. Від них практично не повинні відокремлюватися волокна або часточки [16].

Стадія підготовки дезінфікуючих розчинів. При використанні мийно-дезінфекційних засобів поєднують стадії миття та дезінфекції об'єктів в одній операції (виключають використання розчинів мийних засобів).

Рекомендується чергувати дезінфекційні та антисептичні засоби кожні 1-3 місяці з метою запобігання розвитку та розповсюдженню стійких варіантів мікроорганізмів [16].

Перекис водню – медичний за ГОСТ -177 являє собою безбарвну прозору рідину, яка містить 30-40 % АДР. Перекис водню стабілізують не більш ніж 0.6 г/дм³. Пірофосфорнокислим натрієм або однозаміщеним фосфорнокислим натрієм. Температура замерзання перекису водню з масовою часткою АДР 30 % становить – 25,7°C, з масовою часткою АДР 40 % становить – 41,4°C.

Перекис водню – негорюча пожежовибухонебезпечна рідина, сильний окислювач. Розкладається на воду та кисень, змішується з водою в будь-якому співвідношенні. Як засіб пожежогасіння використовують сильний струмінь води.

Перекис водню ушкоджує об'єкти з заліза, хрому, свинцю, срібла, марганцю, чавуна, міді, латуні, нелегірованих і низьколегірованих сталей. Несумісний з лугами.

Перекис водню відноситься до високонебезпечних речовин (2 клас небезпеки по ГОСТ 12.1.007). Подразнює шкіру, слизову оболонку очей та верхніх дихальних шляхів.

Гарантійний термін зберігання 6 місяців з дати виготовлення. Зберігають у складських приміщеннях, які забезпечують захист від дії сонячних променів, при температурі не вище 30°C. Допускається зберігання перекису водню на відкритих майданчиках оснащених наметом, що виключає дію прямих сонячних променів, у складських ємкостях з ізотермічним пристроєм, який забезпечує температуру не вище + 30°C і не нижче -30°C [12].

Перекис водню виявляє бактерицидні, віруліцидні та спороцидні властивості. Використовують для дезінфекції в суміші з 0.5 % синтетичного мийного засобу («Лотос»).

Рекомендується використовувати 1,0 3,0 та 4,0 % розчини перекису водню для поточної дезінфекції технологічного обладнання, комунікацій, інвентарю та внутрішньоцехової тари, а також 6.0 % розчини перекису водню для дезінфекції технологічного обладнання, комунікацій, інвентарю та внутрішньоцехової тари, які контаміновані споровими формами мікроорганізмів [8].

Етиловий спирт 76% - безбарвна рідина з характерним запахом. Належить до легкозаймистих рідин. Категорія та група вибухонебезпечної суміші спирту з повітрям ПА-Т2 згідно ГОСТ 12.1.011. Під час виконання робіт зі спиртом етиловим повинні застосовуватись герметичні апарати, обладнання та герметична транспортна тара.

Виявляє бактерицидні та фунгіцидні властивості щодо грампозитивних та грамнегативних бактерій та деяких видів грибів. Не виявляє спороцидної дії.

Рекомендується використовувати 76 % розчини для дезінфекції обладнання та антисептичної обробки рук персоналу [8].

Деконекс 50 ФФ – дезінфекційний засіб виробництва фірми «Borer Chemie AG» (Швейцарія). В якості АДР містить гліюксаль, глютаровий альдегід, дидецилдиметиламонійхлорид. До складу засобу введені гліколі, суміш ефірних олій і вода. Являє собою в'язку рідину блакитно-зеленого кольору з характерним запахом запашки. Добре розчиняється у воді. Для приготування робочих розчинів деконексу 50 ФФ використовують холодну воду (при застосуванні гарячої води можливе випаровування отруйних парів альдегідів) [8].

Водні розчини деконексу 50 ФФ прозорі забарвлені у зелений колір мають мийні властивості. Не кородують об'єкти, виготовлені з металу скла полімерних матеріалів та гуми легко змиваються, не залишаючи нальоту. Засіб відноситься до помірно небезпечних речовин при інгаляційному надходженні до організму (3 клас небезпеки по ГОСТ 12.1.007). У нативному вигляді та концентрованих розчинах подразнює шкіру, слизову оболонку очей і верхніх дихальних шляхів. Не виявляє сенсibilізуючих і канцерогенних властивостей.

Гарантійний термін зберігання 5 років з дати виготовлення. Зберігають у пакуванні виробника в критих складських приміщеннях, які недоступні для загального користування, при температурі від 5 до 30°C.

Деконекс 50 ФФ виявляє бактерицидні, включаючи туберкулоцидні, фунгіцидні та віруліцидні властивості [8].

Рекомендується використовувати 0,25, 0,5 і 1,0 % розчини деконексу 50 ФФ для поточної дезінфекції поверхонь приміщення (стіни, підлога, вікна, двері), прибирального інвентарю та санітарно-технічного обладнання, а також технологічного обладнання, комунікацій, інвентарю і внутрішньоцехової тари.

Октенісепт – засіб для гігієнічної дезінфекції шкіри рук виробництва фірми «Schulke & Mayr» (Німеччина). Являє собою безбарвну прозору рідину

без специфічного запаху. Температура кипіння 100°C, температура запалення більше 100°C [8].

Октенісепт належить до малонебезпечних речовин (4 клас небезпеки за ГОСТ 12.01.2007) при введенні в шлунок. Не виявляє шкіряно – подразнюючих властивостей при одно- та багаторазовому нанесенні на шкіру. У нативному вигляді подразнює слизову оболонку очей.

Гарантійний термін зберігання 4 роки з дати виготовлення. Октенісепт зберігають у пакуванні виробника у критих добре провітрюваних приміщеннях, які недоступні для загального користування, при температурі від – 5°C до + 40°C. Октенісепт виявляє бактерицидні (включаючи туберкулоцидні), віруліцидні та фунгіцидні властивості.

Рекомендується використовувати для гігієнічної дезінфекції шкіри рук персоналу. Октенісепт використовують з метою гігієнічної дезінфекції шкіри у нерозведеному вигляді шляхом нанесення на попередньо очищену шкіру до повного її зволоження за допомогою дозатора. Експозиція становить від 2 до 5 хв. Персонал повинен приступати до роботи після повного висихання октенісепту [8].

Хлорантоїн – дезінфекційний засіб з мийними властивостями виробництва НВТ «Фармакос» (Україна). В якості АДР містить дихлорантин. До складу засобу введені мийні компоненти, диспергатор, інгібітор корозії та наповнювач. Являє собою сипучий порошок світлих тонів з помірним запахом хлору. Хлорантоїн марки Т випускають у формі таблеток.

Розчинність у воді не менше 20 мг/дм³. Водні розчини хлорантоїну прозорі, безбарвні, мають слабкий запах хлору, наділені мийними властивостями, не ушкоджують об'єкти з нержавіючої сталі, алюмінію, дерева, емалі, фаянсу, кахлю, скла, полімерних матеріалів, добре змиваються, не залишаючи нальоту. Хлорантоїн не сумісний з катіонними поверхнево-активними речовинами, одно- та багатоатомними спиртами [8].

Засіб належить до помірно небезпечних речовин (3 клас небезпеки по ГОСТ 12.1.007). У сухому вигляді та концентрованих розчинах подразнює

слизову оболонку очей та верхніх дихальних шляхів. У рекомендованих до застосування концентраціях не володіє шкіряно-подразнюючими, шкіряно-резорбтивними та сенсibiliзуючими властивостями.

Гарантійний термін зберігання 3 роки з дати виготовлення. Зберігають в пакуванні виробника в критих складських приміщеннях не більше ніж у 3 яруси осторонь від джерел відкритого вогню та тепла.

Хлорантоїн виявляє бактерицидні, туберкулоцидні, віруліцидні та фунгіцидні властивості [8].

Рекомендується використовувати 0,2 % розчини хлорантоїну для поточної дезінфекції поверхонь приміщення (стіни, підлога, вікна, двері), прибирального інвентарю, технологічного та санітарно-технічного обладнання, комунікацій, інвентарю та внутрішньоцехової тари 1,0 % розчини – для дезінфекції об'єктів, що контаміновані *Mycobacterium tuberculosis* 2,0 % розчини – для дезінфекції об'єктів, що контаміновані пліснявими грибами.

Стадія підготовки обладнання та комунікацій. Базовою, відправною точкою вимог НВП (GMP) є функціональна відповідність обладнання. Обладнання необхідно розміщати й обслуговувати таким чином, щоб воно відповідало своєму призначенню.

Виробниче обладнання повинно бути спроектоване таким чином, щоб його можна було легко і ретельно очищати. Очищення повинне проводитися відповідно до методик, докладно викладених в письмовому вигляді.

Устаткування (інвентар), що застосовують для миття й очищення, слід вибирати і використовувати так, щоб воно не стало джерелом контамінації.

Обладнання повинно бути встановлене таким чином, щоб не допустити ризику помилок або контамінації.

Стадія підготовки очищеного технологічного повітря. Одним з найважливіших факторів забезпечення чистоти в чистих приміщеннях, де відбувається виробництво лікарських засобів є очищення великих обсягів вентиляційного повітря відповідно до технологічних особливостей процесів,

які проводяться у цих приміщеннях. Необхідний ефект досягається застосуванням декількох ступенів очищення, причому вирішальне значення має фінішна (термінальна) ступінь, у якій повинні використовуватися фільтри здатні уловлювати практично всі частки діаметром більше 0,1 мкм.

Повітря, що подається в чисті приміщення, повинне бути стерильним, тому першочергового значення набуває його очищення і стерилізація.

Фільтр – найважливіший компонент системи очистки повітря для чистих приміщень, оскільки з його допомогою остаточно встановлюється необхідний ступінь чистоти приміщення. Треступінчасте очищення повітря за допомогою фільтрів грубого, тонкого очищення на першому й другому ступені, відповідно, і мікрофільтрів або фільтрів абсолютно тонкого очищення на третьому ступені дозволяє досягти необхідного результату [23].

У відповідності з європейськими стандартами EN 779, EN 1822 та ДСТУ EN 1822-1-2001 фільтрувальні елементи класифікуються на групи і класи залежно від якості фільтрування (ефективності або проникності).

Згідно з стандартом фільтрувальні елементи підрозділяються на такі групи:

Група **G** – фільтри грубого очищення – фільтри попередньої очистки(course dust filters);

Група **F** – фільтри тонкої очистки (fine dust filters);

Група **H** – фільтри (High Efficiency Particular Airfilters) HEPA;

Група **U** – фільтри (Ultra Low Penetration Air) ULPA.

Належна виробнича практика GMP орієнтована на застосування спеціальних систем очистки (стерилізації), повітря і які використовують принцип високоефективної фільтрації, повітря що подається в приміщення за допомогою HEPA фільтрів (High Efficiency Particulate Air/Particle Absorption) [29].

Стадія підготовки води. Вода, яка використовується у виробництві лікарських засобів, являється одним з найбільш важливих продуктів. Вона застосовується як для технологічних цілей, для первинного миття

обладнання, для остаточного споліскування обладнання, для виготовлення парентеральних розчинів (в нашому випадку лосьйону), так і для теплоенергетики. У залежності від призначення води у технологічному процесі і від потребуючого ступеня її очистки розрізняють наступні категорії води у фармацевтичному підприємстві:

- вода питної якості – (якість води регламентується ГОСТ 2874-82 «Вода питна»);
- вода очищена – (якість її регламентується Державною Фармакопеею України – ГФУ доповнення 1. Вид.1, 2004 р і Європейською Фармакопеею);

РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ

7.1. Специфікація обладнання ділянки виробничого біосинтезу

Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт та виробничого одержання біомаси *Lactobacillus rhamnosus* 71.38 зображено в табл. 7.1.

Таблиця 7.1.

Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт та технологічного процесу отримання біомаси *Lactobacillus rhamnosus* 71.38

Позиція	Позначення	Найменування	Кількість	Примітка
Д-1 Д-7 Д-10	Дозатор	Ваговий дозатор СВЕДА ДВС-301-70-1. Габарити 820х615х610 мм. Фірма ООО НПФ "Сведа, Лтд", Україна. Продуктивність 0,05 – 620 кг.	3	Об'ємно-ваговий дозатор
РЗ-2 РЗ-8	Реактор- змішувач для приготування композиції А, яка містить термолабільні компоненти	Реактор-змішувач марки СМ500. Фірма «Станко Групп». В залежності від типу продукту мішалку в середині апарату можна змінювати. Підігрів відбувається за допомогою металічних ТЕНів.	2	Реактор- змішувач оснащений паровою сорочкою та перемішуючим пристроєм. Об'єм 3,2 м ³ відповідно. Швидкість обертів мішалки 50-300 об/хв., сталь 12Х18Н10Т

НУХТ БТЕК 02.02.17 ПР КЗ

Зн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Хижнякова А.В.			РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ	Літ.	Арк.
Керівник		Волошина І.М.					
Консультант							
Зав.каф.		Пирог Т.П.					
					Кафедра БТМ⁵⁹		

Н-3 Н-9 Н-12	Магнітний насос	Насос MS1 потужність 120-7600 л/год, діаметр шлангу 4 см.	3	Насос з магнітною муфтою
ЗП-4	Засівний пристрій	Засівний бачок для внесення посівного матеріалу в інокулятор в стерильних умовах.	1	Нержавіюча сталь
Ф-5 Ф-13	Фільтр тонкої очистки	Фільтр для стерилізуючої фільтрації. Площа фільтрувального матеріалу 2,9 . Продуктивність – 1700 м ³ /год.	2	Фільтруючий матеріал фторопласт
ФР-6	Ферментер	Ферментер марки BioFlo 510 об'ємом 10 л. Перемішування 100-700 об/хв.	1	Полірована нержавіюча сталь марки 316L.
ФР-14	Ферментер	Ферментер тип-Р. об'ємом 400 л. Фірма «Bioengineering», Швейцарія. Перемішування макс. 750 об/хв. Максимальна температура 150°C. Потужність привода 10 кВт. Габарити 1700× 2450× 245	1	Нержавіюча сталь марки 316L.
РЗ-11	Реактор-змішувач для приготування композиції Б	Реактор-змішувач марки СМ500. Фірма «Станко Групп». В залежності від типу продукту мішалку в середини апарату можна змінювати.	1	Реактор-змішувач оснащений паровою сорочкою та перемішуючим пристроєм.

		Підігрів відбувається за допомогою металічних ТЕНів.		Загальний об'єм 20 л, швидкість обертів мішалки 50-300 об/хв., сталь 12X18H10T
--	--	--	--	--

Примітка* підбір обладнання відбувався за допомогою таких сайтів:
 1. <http://www.condvent.ru/>; 2. <http://www.ukrvent.ua/fyar.html>; 3. https://elmir.ua/oil_filters/oil_filter_mann_mw_65.html; 4. <https://parker-filter.ru/index.php?id=153>

7.2. Опис технологічної схеми виробничого біосинтезу

Технологічна схема біосинтезу біомаси бактерій *Lactobacillus rhamnosus* 71.38 включає допоміжні роботи (підготовка та стерилізація поживних середовищ) та технологічний процес (підготовка посівного матеріалу та біосинтез біомаси бактерій *Lactobacillus rhamnosus* 71.38).

ДР 1. Приготування та стерилізація поживних середовищ

ДР 1.1. Приготування запасного розчину елементів

Для приготування запасного розчину елементів на аналітичних вагах зважуємо 0,415 г $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ та 0,43 г ZnSO_4 . Переносять наважку у колбу об'ємом 2000 мл. Додають 1000 мл дистильованої води, ретельно перемішують. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С 40 хв. При культивуванні додають запасний розчин з розрахунку 1 мл розчину на 1 л поживного середовища.

ДР 1.2. Приготування і стерилізація поживних середовищ для колб на качалках

Вміст компонентів для приготування 1000 мл середовища наведено у табл.7.2.

Таблиця 7.2.

**Розрахунок вмісту компонентів для приготування 500 мл
середовища.**

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 1 л середовища, г (мл)	Композиція	Об'єм води, мл	Об'єм композиції, л
Соєвий пептон	50	25	А	325	0,35
Глюкоза	20	10			
Ацетат натрію	1	0,5			
Глутамат натрію	0,2	0,1			
Натрій піруват	0,1	0,05			
Na ₂ HPO ₄	2	1	Б	150	0,15
NaCl	3	1,5			
NaHCO ₃	0,5	0,25			
CaCl ₂ ·H ₂ O	0,1	0,05			
Разом:				475	0,5

ДР 1.2.1 Приготування і стерилізація композиції А

На аналітичних вагах зважують 10 г глюкози, 25 г соєвого пептону, 0,1 г глютамату натрію, 0,05 г пірувату натрію, 0,5 г ацетату натрію, переносять в колбу об'ємом 1000 мл, додають 325 мл дистильованої води, перемішують. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при температурі 112 °С 30 хв. Після стерилізації передають на ТП 2.4.

ДР 1.2.2 Приготування і стерилізація композиції Б

На аналітичних вагах зважують 1 г Na₂HPO₄, 1,5 г NaCl, 0,25 г NaHCO₃ та 0,05 г CaCl₂·H₂O переносять в колбу об'ємом 500 мл, додають 150 мл дистильованої води, перемішують. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С 40 хв. Після стерилізації передають на ТП 2.4.

ДР 1.3 Приготування та стерилізація поживних середовищ для 10 л інокулятора

Вміст компонентів для приготування 5 л середовища наведено у табл.4.2. Так як 0,5 л буде подано зі стадії, як інокулят, об'єм поживного середовища повинен дорівнювати 4,5 л.Таблиця 7.3.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 5 л середовища.

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 5 л середовища, г (мл)	Композиція	Об'єм води, мл	Об'єм композиції, л
Соевий пептон	50	250	А	3500	3,75
Глюкоза	20	100			
Ацетат натрію	1	5			
Глутамат натрію	0,2	1			
Натрій піруват	0,1	0,5			
Na ₂ HPO ₄	2	10	Б	750	0,750
NaCl	3	15			
NaHCO ₃	0,5	2,5			
CaCl ₂ ·H ₂ O	0,1	0,5			
Разом:				4250	4,5

ДР 1.3.1 Приготування і стерилізація композиції А

На вагах зважують 100 г глюкози, 250 г соєвого пептону, 1 г глутамату натрію, 0,5 г пірувату натрію, 5 г ацетату натрію, переносять в інокулятор Рз-2 об'ємом 10 л, через об'ємно-ваговий дозатор Д-1. додають 3,5 л питної води, вмикають мішалку та подають пару в сорочку до температури 40 °С, для повного розчинення, по закінченню процесу розчинення збільшують температуру в реакторі. Стерилізацію проводиться за температури 112 °С протягом 30 хв.

ДР 1.3.2 Приготування і стерилізація композиції Б

На вагах зважують 10 г Na_2HPO_4 , 15 г NaCl , 2,5 г NaHCO_3 та 0,5 г $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ переносять в колбу об'ємом 2000 мл, додають 750 мл дистильованої води, перемішують. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С 40 хв. Стерильний розчин передають через засівну колбу в ФР-6.

ДР 1.4.3 Приготування та стерилізація поживних середовищ для 100 л ферментера

Для культивування в ферментері об'ємом 100 л необхідно приготувати 50 л поживного середовища. Але треба врахувати 5 л інокуляту, та 10% конденсату. Вміст компонентів поживного середовища наведено у табл. 4.3.

Таблиця 7.4.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 50 л середовища.

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 50 л середовища, г (мл)	Композиція	Об'єм води, мл	Об'єм композиції, л
Соевий пептон	50	2500	А	21500	27,5
Глюкоза	20	1000			
Ацетат натрію	1	50			
Глутамат натрію	0,2	10			
Натрій піруват	0,1	5			
Na_2HPO_4	2	100	Б	15750	17,5
NaCl	3	150			
NaHCO_3	0,5	25			
$\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,1	5			
Разом:				39000	45

ДР 1.4.1 Приготування і стерилізація композиції А

На вагах зважують 1000 г глюкози, 2500 г соєвого пептону, 10 г глютамату натрію, 5 г пірувату натрію, 50 г ацетату натрію, вносять через об'ємно-ваговий дозатор Д-7 в реактор-змішувач РЗ-8 додають 21,5 л питної води, вмикають мішалку та подають пару в сорочку до температури 40 °С, для повного розчинення, по закінченню процесу розчинення збільшують температуру для стерилізації поживного середовища, стерилізація проводиться за температури 112 °С протягом 30 хв. Далі стерильне поживне середовище за допомогою насосу Н-9 передається в попередньо простерелізований ферментер Фр-14.

ДР 1.4.2 Приготування і стерилізація композиції Б

На вагах На технічних вагах зважують 100 г Na_2HPO_4 , 150 г NaCl , 25 г NaHCO_3 та 5 г $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, та переносять в реактор-змішувач Р-10, за допомогою об'ємного-вагового дозатора вносять 15,75 л питної води, та вмикають мішалку для повного розчинення солей, по закінченню процесу розчинення, розчин солі за допомогою насосу Н-12 передається в ферментер Фр-14, для подальшої стерилізації, стерилізують при температурі 131 °С 40 хв.

ТП 2. Виробниче культивування

ТП.2.1. Підтримання колекційної культури

Колекційну культуру *Lactobacillus rhamnosus* 71.38 зберігають у пробірках на агаризованому середовищі з МРС в холодильнику при 3 – 4 °С. Для збереження фізіолого-біохімічних властивостей штаму здійснюють пересіви (через 3 – 4 місяці). Всі роботи з колекційною культурою проводяться в строго асептичних умовах.

ТП 2.2. Одержання робочої культури на агаризованому середовищі

Колекційну культуру, що зберігається в пробірках на середовищі з МРС, розсівають у пробірки зі скошеним середовищем МРС. Вирощують при температурі 35 °С упродовж 24 год.

ТП 2.3. Вирощування посівного матеріалу I генерації

Отримані ізолювані колонії (від ТП 4.2) пересівають петлею у пробірки з середовищем МРС (одна ізолювана колонія використовується для засіву однієї пробірки). В пробірки пересівають ізолювані колонії, що знаходяться на відстані не менше 1 см. Тривалість вирощування – 48 год.

ТП 2.4. Вирощування посівного матеріалу II генерації

Для вирощування рідкого посівного матеріалу у колбу об'ємом 2 л в асептичних умовах вносять 350 мл розчину композиції А від ДР 1.2.1 та 150 мл розчину композиції Б від ДР 1.2.2. Додають 0,5 мл запасного розчину від ДР 1.1. Перемішують і розливають по 125 мл в 4 стерильних колби об'ємом 750 мл.

У пробірку з робочою культурою *Lactobacillus rhamnosus* 71.38, вирощеною на агаризованому середовищі з МРС, вносять 2 мл стерильної питної води, за допомогою петлі суспендують і піпеткою в асептичних умовах вносять у колбу з поживним середовищем. Для засіву однієї колби використовують бактерії, одержані з однієї пробірки.

Після вирощування мікроорганізму у колбах на качалці (100 об/хв) впродовж 24 год при 35 °С, культуральну рідину в асептичних умовах з колб переносять в засівну колбу об'ємом 2 л.

ТП 2.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 10 л.

В інокулятор об'ємом 10 л, з стерильною композицією А, в асептичних умовах вносять 750 мл стерильної композиції Б (від ДР 1.3.2) та 5 мл

стерильного розчину елементів вид ДР1.1. Після цього вмикають перемішуючий пристрій. Температура вирощування посівного матеріалу в малому інокуляторі – 35 °С, тривалість – 14 год. Швидкість перемішування становить 100 об/хв.

З дотриманням правил асептики з малого інокулятора відбирають проби через кожні 8 годин, в якій аналізують: вміст вуглецю, азоту та мікробіологічну чистоту.

Процес закінчують по досягненні 14 годин культивування. Після закінчення культивування культуральну рідину перекачують за допомогою труби перетискання в ферментер об'ємом 100 л.

ТП 3. Біосинтез

ТП 3.1 Виробничий біосинтез

Виробниче культивування здійснюють у ферментері об'ємом 100 л. У попередньо простерилізований ферментер в якому вже знаходиться попередньо простерилізована композиція Б (від ДР 1.4.2.) в асептичних умовах самоплином вносять стерильне поживне середовище композиції А (від ДР 1.4.1.) та в асептичних умовах вносять композицію В (запасний розчин) в кількості 50 мл (від ДР 1.1.).

Через штуцер в асептичних умовах за допомогою труби перетискання вносять посівний матеріал (від ТП 2.5) і вмикають перемішуючий пристрій. Перемішуючим пристроєм слугує лопатева мішалка, якою обладнаний ферментер. Швидкість перемішування становить 110 об/хв. Тривалість виробничого культивування становить 24 годин при температурі 35 °С.

З дотриманням правил асептики з посівного апарату відбирають проби через кожні 8 годин, в якій аналізують: вміст вуглецю, азоту, концентрацію біомаси та мікробіологічну чистоту.

Процес біосинтезу завершують, коли концентрація біомаси становить 5,6 г/л і культуральна рідина передається на стадію виділення біомаси.

ЗВ 6 Знешкодження відходів

ЗВ 6.1 Знешкодження газоподібних відходів

Знешкодження газоподібних викидів здійснюють шляхом фільтрації їх на фільтрах з попереднім охолодженням газів та зниженням вологи у вологовідбійниках з подальшим нагріванням, для уникнення змочування фільтрів.

7.3. Контроль ділянки біосинтезу (карта постадійного контролю)

7.1. Мікробіологічний контроль

Шляхом розсіву зразків культуральної рідини на чашки Петрі з агаризованими середовищами різноманітного складу і мікроскопуванням здійснюється мікробіологічний контроль.

Мікробіологічний контроль культури проводять мікроскопіюванням та висівом на МПА з 5 % глюкози й агаризоване середовище Сабуро (для розпізнавання сторонньої бактеріальної та грибної мікрофлори відповідно). У термостаті за температури $(38\pm 1)^{\circ}\text{C}$ протягом 48 год витримують посіви на МПА, за $(22\pm 1)^{\circ}\text{C}$ упродовж 72 год - на середовищі Сабуро. Ще методом Коха на агаризованому середовищі МРС встановлюють кількість живих клітин (повинна бути не нижче ніж 10^9 КУО/см³).

Препарати «роздавлена крапля» застосовують для мікроскопування. Готують препарат на знежиреному предметному склі, куди наносять краплю культуральної рідини, накривають накривним скельцем та розглядають з об'єктивом 40х, ще застосовують мікроскопування з імерсійною системою (Рис 7.1.) [18].

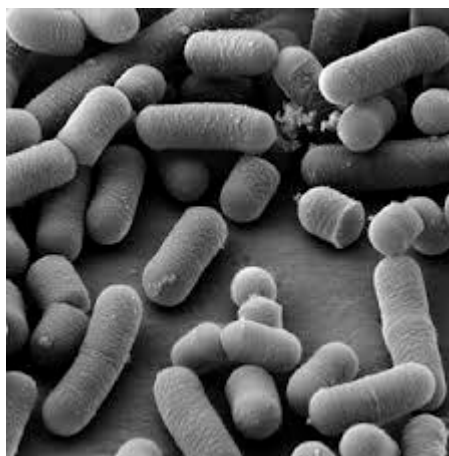


Рис 7.1. *Lactobacillus rhamnosus* GG

7.2. Показники росту і синтезу цільового продукту

7.2.1. Визначення концентрації біомаси

Концентрація біомаси. Біомасу встановлюють за оптичною густиною клітинної суспензії при довжині хвильового спектру 600 нм (непрямий метод) з подальшим перерахунком на суху біомасу, використовуючи калібрувальний графік [19].

7.2.2. Визначення концентрації цільового продукту

Визначення кількості життєздатних клітин. Щоб встановити вміст живих бактерій в одній пробі культуральної рідини, проводять випробування на трьох зразках. 0,9% розчином натрію хлориду з розрахунку 1 мл на одну пробу розводять вміст проби. Приготовлені бактеріальні суспензії по 1 мл переносять у пробірки, що мають по 9 мл середовища Блаурокка і перемішують за допомогою 12-15-кратного прокачування, формуючи при цьому у об'ємі 10 мл середовища 1 пробу бактерій. Наступні десятикратні розведення проводять з цих пробірок. Пробірки з розведеннями випробуваних зразків препарату у поживних середовищах переносять у термостат при температурі 35 ± 1 °C і витримують упродовж 4-х діб .

Після цього відзначають розведення, де присутній ріст колоній бактерій. Обчислюють кількість живих бактерій у одній дозі, помножуючи кількість колоній на рівень розведення мікробної суспензії у даній пробірці.

Проба є придатною, коли ріст бактерій у серії десятикратних розведень випробуваного препарату є не меншим як у пробірці з розведенням 1×10^9 (9-ма пробірка), що дорівнює вмісту 1×10^9 живих мікробних клітин у одній дозі.

Коли у 1 мл міститься менше 1×10^9 живих бактерій, то контроль варто повторити на новій серії середовища. Коли вміст живих мікробних клітин у 1 мл пробіотика менше 1×10^9 , то контроль варто зробити на подвійній кількості зразків.

7.3. Визначення концентрації джерел вуглецю і азоту

Визначення концентрації джерела нітрогену. Оскільки джерелом азоту є пептон, то визначаємо амінний азот.

Визначення амінного азоту методом формольного титрування

Підготовка проби. Пробу культуральної рідини 50 мл центрифугують при 3000 об/хв протягом 20 хв. Для подальшого дослідження беруть супернатант. Амінні групи амінокислот вступають в реакцію з формальдегідом із утворенням метиленових з'єднань (метиленамінокислот).

Метиленамінокислоти володіють більш сильними кислотними властивостями та легко відтитровуються лугом. По кількості розчину лугу, який пішов на титрування, можна розрахувати вміст азоту аміногруп. При цьому приймають що кількість карбоксильних груп, відтитрованих лугом, еквівалентна кількості аміногруп, прореагувавших з формальдегідом. Перевагою даного методу є швидкість та зручність визначення амінного азоту [26].

Хід роботи

В стаканчик чи конічну колбу наливають 20 мл розчину супернатанту. В другу таку ж ємність наливають 20 мл води, яка слугує контролем. В обидві ємності додають по 3 каплі індикатора метиленового червоного і титрують 0,05 н розчином їдкого натру до появи жовтого забарвлення. Після цього в ємності доливають по 10 мл формольної суміші. Після додавання формольної суміші обидві проби (дослідну і контрольну) титрують 0,2 н розчином їдкого натру до появи інтенсивного червоного забарвлення. При розрахунках вмісту амінного азоту в 20 мл досліджуваного розчину приймають до уваги, що 1 мл 0,2 н розчину NaOH відповідає 2,8 мг азоту. Отриманий результат потім перераховують на 100 г досліджуваної речовини [26].

Концентрація глюкози

Визначення глюкози проводять глюкозооксидазним методом. Для цього культуральну рідину центрифугують 20 хв при 3000 об/хв. Отриманий

супернатант розбавляють дистильованою водою в 100 разів, далі змішують в пробірці 0,3 мл супернатанту та 15 мл трихлороцтової кислоти. В іншу пробірку наливають 15 мл трихлороцтової кислоти (контроль). В обидві пробірки додають 2 мл розчину фосфату натрію та 0,1 мл розчину глюкозооксидази. Перемішують. Залишають при кімнатній температурі на 1 год, потім аналізують на ФЕК при довжині хвилі 530 нм. Розрахунок проводять за калібрувальним графіком [15].

РОЗДІЛ 8. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ ОТРИМАННЯ ЛІЗАТУ БІОМАСИ

8.1. Специфікація обладнання процесу отримання лізату біомаси

Таблиця 8.1

Специфікація обладнання для апаратурної схеми виробничого отримання лізату біомаси *Lactobacillus rhamnosus* 71.38.

Позиція	Позначка	Найменування	Кількість
-	Терези електронні	Тип Eurore-6000. Діапазон зважування, кг: до 100. Ціна поділки шкали, мг: 100. Гранично припустима похибка: при зважуванні від 2 г до 5000 г - $\pm 50,0$ мг; від 5000 г і вище - $\pm 100,0$ мг. Виробник: фірма «Gibertini», Італія.	3
P3-1	Ємність для приготування Хлорантоїну	Геометричний об'єм, 60 л, Частота обертання зовнішньої тихохідної мешалки 60 об/хв., Частота обертання внутрішньої лопастной мішалки, 100 об/хв., Потужність приводу змішувача, 4 кВт, Робоча температура, до 60°C	1
P3-2	Ємність для приготування Біомою	Геометричний об'єм, 60 л, Частота обертання зовнішньої тихохідної мешалки 60 об/хв., Частота обертання внутрішньої лопастной мішалки, 100 об/хв., Потужність приводу змішувача, 4 кВт, Робоча температура, до 60°C	1
P3-3	Ємність для приготування гідроокису натрію	Геометричний об'єм, 60 л, Частота обертання зовнішньої тихохідної мешалки 60 об/хв., Частота обертання внутрішньої лопастной мішалки, 100 об/хв., Потужність приводу змішувача, 4 кВт, Робоча температура, до 100°C	1

					НУХТ БТЕК 02.02.17 ПР КЗ		
Зн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Хижнякова А.В.			РОЗДІЛ 8. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ ОТРИМАННЯ ЛІЗАТУ БІОМАСИ	Літ.	Арк.
Керівник		Волошина І.М.					
Консультант							
Зав.каф.		Пирог Т.П.					
					73 Кафедра БТМ		

РЗ-4	Ємність для приготування гідроокису натрію	Геометричний об'єм, 60 л, Частота обертання зовнішньої тихохідної мешалки 60 об/хв., Частота обертання внутрішньої лопастної мішалки, 100 об/хв., Потужність приводу змішувача, 4 кВт, Робоча температура, до 100°C	1
РЗ-5	Збірник культуральної рідини	Геометричний об'єм, 1500 л, Частота обертання зовнішньої тихохідної мешалки 300 об/хв., Частота обертання внутрішньої лопастної мішалки, 100 об/хв., Потужність приводу змішувача, 4 кВт, Робоча температура, до 200°C	1
НВ-6	Насос відцентровий	Продуктивність 9 м3/год. Потужність приводу, 4 кВт, Робоча температура, до 200°C.	1
ВУ-7	Випарна установка	Продуктивність, 600 л/год, Глибина вакууму 0,8 атм., Робоча температура, до 200°C. Глибина вакууму 0,8 атм.	1
К-8	Конденсатор	Геометричний об'єм, 60 л.	1
НВ-9	Насос відцентровий	Продуктивність 0,9 м3/год. Потужність приводу, 4 кВт, Робоча температура, до 200°C.	1
Р-10	Реактор для гідролізу	Об'єм: 600 л. Потужність: 35 кВт. швидкість обертання мішалки від 10 до 200 об/хв, наявний пульти управління, електрохімполіровка (пасивація) зварних швів. Виробник: Normit (Франція).	1
Ц-11	Центрифуга	Центрифуга марки "NORMIT" з кутовою швидкістю до 15000 об/хв з плавним регулюванням обертальної швидкості, що забезпечує плавне розділення	1
З-12	Збірник фугату	Об'єм: 60 л. Потужність: 3,5 кВт. швидкість обертання мішалки від 10 до 200 об/хв, наявний пульти управління, електрохімполіровка (пасивація) зварних швів. Виробник: Normit	1

		(Франція).	
НВ-13	Насос відцентровий	Продуктивність 0,9 м3/год. Потужність приводу, 4 кВт, Робоча температура, до 200°C.	1
Ф-14	Фільтр	Фільтр. Фільтруючий матеріал: два шари капронової сітки з діаметром пор від 0,1 до 3 мікрон.	1
НВ-15	Насос відцентровий	Продуктивність 0,9 м3/год. Потужність приводу, 4 кВт, Робоча температура, до 200°C.	1
З-16	Збірник	Об єм: 60 л. Потужність: 3,5 кВт. швидкість обертання мішалки від 10 до 200 об/ хв, наявний пульт управління, електрохімполіровка (пасивація) зварних швів. Виробник: Normit (Франція).	1
НВ-17	Насос відцентровий	Продуктивність 0,9 м3/год. Потужність приводу, 4 кВт, Робоча температура, до 200°C.	1
Ф-18	Фільтр	Фільтр. Фільтруючий матеріал: два шари капронової сітки з діаметром пор від 0,1 до 0,22 мікрон.	1

8.2. Опис технологічної схеми процесу отримання лізату біомаси

РОЗДІЛ 3 Опис стадій технологічного процесу

Отримання лізату біомаси *Lactobacillus rhamnosus* 71.38 включає допоміжні роботи (підготовка мийних засобів) та технологічний процес (концентрування біомаси, лізис, очистка лізату).

ДР 1. Санітарна підготовка та приготування допоміжних розчинів

Для дезінфекції та миття поверхонь приміщення використовують 0,2 % розчин засобу Хлораміну, для миття обладнання використовують 0,3 % розчин Біомой.

ДР 1.1. Підготовка розчину хлораміну

Хлорамін є антисептичною і дезінфікуючою речовиною, використовується для неметалевих інструментів. Хлорамін Б – білий порошок, добре розчинний у воді. Концентрація робочого розчину для миття поверхнею - 1%. У змішувачі надходить хлорамін у кількості 300 г і додається питна вода 30 л, після чого концентрація такого водного розчину повинна бути 1 %.

ДР 1.2. Приготування розчину «Біомой»

Розчин «Біомой» являє собою миючий засіб, що містить поверхнево-активні та протеолітичні ферменти. Розчинність його у воді становить не менше 30 г/дм³ при температурі 20° С. Для циркуляційного миття технологічного обладнання та комунікацій використовують 0,3 %. Температура розчинів 40° С.

Розчин готується у збірнику об'ємом 100 л (3-), куди вносяться 120 г порошку «Біомой» та 40 л питної води.

ДР 1.3. Приготування 0,5М розчину NaOH.

На технічних вагах у скляну ємність зважують 20 г гідроксиду натрію та додають 1 л води питної. Ретельно перемішують та охолоджують до температури 30 °С. Передають на стадію ТП-.

ДР 1.4. Приготування 6М розчину HCl.

Для підкислення до рН 3,6 на стадії ТП3 необхідно приготувати 1 л 6М розчину HCl. Концентрована соляна кислота має концентрацію 11 М. Отже в скляну ємність об'ємом 2 л додають 727,5 мл питної води. При постійному перемішуванні додають 227,5 мл концентрованої соляної кислоти. Охолоджують до температури 30 °С та подають на стадію ТП4.

ТП 2. Концентрування біомаси лактобактерій.

ТП 2.1. Вакуум-випарювання

По закінченню культивування в ферментері культуральна рідина насосом перекачується в збірник (З-) звідки вона надходить до вакуум-випарної роторної установки (В-).

Концентрування біомаси здійснюють за допомогою підтримки певного рівня вакууму $p=26,6$ Па, витратою і температурою гріючого агента встановлюють температурний режим у діапазоні $t = 35 - 40^{\circ}\text{C}$, необхідний для забезпечення збереження біологічної активності і максимальної ефективності процесу вакуум-випарювання. Після досягнення біомасою необхідної концентрації (50 г/л) її передають на стадію лізування біомаси.

ТП 3. Лізис біомаси лактобактерій.

ТП 3.1. Лушний гідроліз біомаси лактобактерій

6 л сконцентрованої бактеріальної біомаси *Lactobacillus rhamnosus* 71.38 зі стадії ТП2.1 подається у збірник (З-) об'ємом 10 л. Додають 0,5 М гідроксидом натрію зі стадії ДР1.3., щоб рН перед початком лізису становило 10,3. Лізис проводимо протягом 4 годин при 40°C при постійному перемішуванні. Після закінчення лужної обробки рН становило 9,9.

ТП 3.2. Кислотний гідроліз біомаси лактобактерій

pH су спеції бактеріальної біомаси після лужного гідролізу доводили до 3,6 6М соляною кислотою, і витримували при 40°C протягом 1 години при статичних умовах. Отриману суспензію передавали на стадію ТП4.

ТП 4. Центрифугування лізованої біомаси лактобактерій.

Лізат центрифугували при 9000 об/хв протягом 20 хвилин. Супернатант передавали у збірник 3- на стадію ТП5, а тверду фракцію на 3В6

ТП 4. Фільтрування.

У збірнику 3- pH супернатанту доводили до 6,8 0,5М NaOH та подавали на фільтрування через мембрани з діаметром пор 0,22 μм для видалення великих залишків клітин, і остаточно через мембрану з діаметром пор 0,22 μм. Після фільтрування отриманий концентрат використовувався для подальшого виготовлення лікарської форми.

РОЗДІЛ 9. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ ВИРОБНИЦТВА ЛЗ.

9.1. Специфікація обладнання ділянки виробництва ЛЗ.

Позиція	Позначка	Найменування	Кількість
ПЗ-1	Повітрозабірник	Повітрозабірники. Обладнаний металевою сіткою для видалення механічних забруднень.	1
Ф-2	Фільтр грубої очистки повітря	Фільтр першого ступеня очистки комірковий повітряний.	1
В – 3	Вентилятор	Апарат середнього тиску	1
Т-4	Теплообмінник	Теплонагрівач з спуском конденсату.	1
Ф-5 Ф-6	Фільтри тонкої очистки (ФРП)	Циліндричний апарат зі сферичною кришкою і днищем для тонкої очистки повітря.	2
3-9 3-10 3-11 3-12	Реактри для приготування миючих та дезінфікуючих розчинів	Змішувачі для приготування розчинів	5
ПФ- 13	Фільтр для грубої фільтрації води	Установка для грубої фільтрації (пісочний фільтр) води працює в автоматичному режимі. Попередній тиск до 0.08 Мпа. Поріг затримання 5 мкм. Циліндричної форми: діаметр 120 мм, висота 250 мм.	1

					НУХТ БТЕК 02.02.17 ПР КЗ			
<i>Зн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	РОЗДІЛ 9. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ ВИРОБНИЦТВА ЛЗ.	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрцшів</i>
Розроб.		Хижнякова А.В.						
Керівник		Волошина І.М.						
Консультант								
Зав.каф.		Пирог Т.П.						
						79 Кафедра БТМ		

К-14	Компресор	Тип KRSН 32/160, продуктивність 30 м3/год, потужність двигуна 2,5 кВт, висота напору 40 м.	1
ПФ- 15	Фільтр для грубої фільтрації води	Установка для фільтрації (вугільний фільтр) води працює в автоматичному режимі. Попередній тиск до 0.08 Мпа. Поріг затримання 5 мкм. Циліндричної форми: діаметр 120 мм, висота 250 мм.	1
К-16	Компресор	Тип KRSН 32/160, продуктивність 30 м3/год, потужність двигуна 2,5 кВт, висота напору 40 м.	1
ЗБ-17	Збірник для води очищеної	Горизонтальний, Місткість,м ³ ,1.0. Наповне-ння та злив стисненим повітрям. Робочий тиск,МПА:0,3(3 гс/см ²).	1
ГФ-19	Установка для зворотного осмосу	Установка для зворотного осмосу. Виробник: фірма"Рохем", Німечинна. Продуктивність 115-140 л/год. Керування роботою установки здійснюється мікропроцесором.	3
ЗБ-20	Збірник для води очищеної	Горизонтальний, Місткість,м ³ ,1.0. Наповне-ння та злив стисненим повітрям. Робочий тиск,МПА:0,3(3 гс/см ²).	1
Д-21	Дозатор	PAULHARTMANN, Німеччина	1
ЗБ-22	Реактор	Горизонтальний, Місткість,м ³ ,1.0. Наповне-ння та злив стисненим повітрям. Робочий тиск,МПА:0,3(3 гс/см ²).	1
НВ-23	Насос відцентровий	Продуктивність 9 м3/год. Потужність приводу, 4 кВт, Робоча температура, до	1

		200°C.	
Ф-24	Фільтр	Фільтр. Фільтруючий матеріал: два шари капронової сітки з діаметром пор від 0,1 до 0,22 мікрон.	1
36-25	Збірник	Горизонтальний, Місткість,м³,1.0. Наповне-ння та злив стисненим повітрям. Робочий тиск,МПА:0,3(3 гс/см²).	1
АН –26	Наповнююча машина	Автомат для наповнення пляшок Nordenmatic 902. Продуктивність: 100 туб/хв. Об'єм наповнення: 1-300 мл. Довжина пляшки (станд.): 150-250 мм. Діаметр туби: 30-70 мм. Design-A-Seal ® і Scoop Seal ®: опція. Система подачі туб: робот, магазин, бункер або касета. Автоматична продувка пляшок. Виробник: («NORDEN», Швеція).	
АН-27	Автоматична пакувальна лінія	Модель: AS100. Метод закриття пачки: гортання. Максимальна швидкість: 100 пачок в хвилину. Електропідключення: 220 В, 50 Гц. Потужність: 1 кВт. Витрата повітря: 2 л/цикл. Виробник: фірма PROMATIC (Італія).	
АН-29	Упаковочна лінія	PVC/PVdC, 1000 пляшок за годину	1
АН-29	Упаковочна лінія	PVC/PVdC, Палетна машина	1

9.2. Опис технологічного процесу виробництва ЛЗ.

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

Виробництво фармацевтичних препаратів зазвичай проводиться в асептичних умовах, в зв'язку з цим проводиться санітарна підготовка виробництва: приміщень, персоналу, обладнання, повітря та води.

ДР 1.1. Підготовка персоналу до виробництва

При виробництві лікарських препаратів персонал повинен дотримуватися правил гігієни. Кожна особа, яка входить у виробничі зони, повинна носити захисний одяг, що відповідає виконуваним нею операціям. Слід уникати прямого контакту між руками оператора і продукцією, а також частинами обладнання, що контактує з продукцією. Персонал повинен бути навчений правилам застосування засобів для миття рук. Одяг слід носити таким чином, щоб захистити продукцію від контамінації. Маски і рукавички необхідно змінювати принаймні кожну зміну [29].

ДР 1.1.1. Навчання та інструктаж персоналу.

Навчання персоналу (внутрішнє та зовнішнє) здійснюється відповідно до СТП «Навчання та розвиток персоналу», Програми навчання персоналу на поточний рік та Персонального графіку навчання фахівців. Програма навчання на поточний рік складається з урахуванням потреб у навчанні та затверджується генеральним директором підприємства.

Дані про проходження навчання вносяться до Реєстрів зовнішнього та внутрішнього навчання персоналу [29].

Внутрішнє навчання здійснюється за напрямками: правила підприємства, вимоги СУЯ та НС (у тому числі – правила GMP, стандарти серій ISO 9000 та ISO 14000), вимоги СТП, СОП та внутрішніх документів підприємства; охорона праці, екології та пожежна безпека; професійне навчання та підвищення кваліфікації працівників.

Після проходження навчання персонал, що пройшов навчання, проходить перевірку знань у вигляді тестування або екзамену. Результати

іспиту оформлюються Протоколом перевірки знань, результати тестування – Протоколом підсумків тестування (зберігаються у ВПРП не менше п'яти років).

При незадовільному результаті іспиту або тестування здійснюється повторна перевірка знань. При незадовільному результаті повторної перевірки знань працівник може бути рекомендований начальником ВПРП до відсторонення від роботи або переведення на роботу, що не потребує «високої» кваліфікації.

Результати перевірки знань враховуються відділом кадрів при вирішенні питань з відповідності займаний посаді, укладанні трудових договорів, вирішенні питань про необхідність перепідготовки або перекваліфікації працівника.

ДР 1.1.2. Санітарна підготовка персоналу.

У гардеробній персонал знімає верхній одяг, головні убори, вуличне взуття та одягає майку, шорти, халат, носки та тапочки.

В 1 санпропускник робітники знімають халати і, знаходячись у шортах і майці, миють ретельно руки під краном теплої води з туалетним милом протягом 1-2 хв, звертаючи увагу на простір біля нігтів, за необхідності використовують для обробки рук щітку (ОСТ 605-291-74). Після видалення мила руки ополіскують водою та висушують електрополотенцем. Робітники одягають стерильний перехідний одяг – бріджи і футболку.

У 2 санпропускнику персонал одягає стерильний одяг (блузон та брюки, шолом, маску, тапочки, бахилі), обробляють руки спиртовим розчином хлоргексидина біглюконата (масова частка 76%), одягає гумові рукавички.

У 3 санпропускнику персонал проходить через шлюз і наступаючи на коврик «Липкий» заходить у стерильний бокс [29].

Під час роботи кожні 1,5 або 2,0 год персонал у «чистих» приміщеннях проводить обробку рук етиловим спиртом.

Протягом зміни гумові рукавички міняють не менше 1-2 разів, а також по мірі передчасного зношення. Зміну бахіл, які використовуються у стерильній зоні, проводять не менше 3 рази у тиждень.

Вхід у чисті приміщення і вихід із них суворо обмежений. Забороняється курити і їсти у «чистих» приміщеннях, не дозволяється користуватися pudroю до і під час роботи, покривати волосся і нігті лаком, красити губи, носити ювелірні вироби (сережки, перстні, буси), не можна піднімати і знову користуватись предметами, які впали на підлогу під час роботи.

Після відвідування туалету персонал знову проходить повну обробку.

Контроль мікробної контамінації рук персоналу здійснюється за допомогою змивів тампонами. Визначення мікробної контамінації рук персоналу проводиться 2 рази на тиждень під час виробничого процесу у кожному стерильному приміщенні вибірково у декількох робітників і 1 раз протягом 2 тижнів після обробки рук дезінфікуючими розчинами. Мікробіолог ВКЯ – вибірково. Після обробки дезрозчином у змивах рук не повинно міститися мікроорганізмів [23].

В процесі роботи дозволяється наявність не більше 2 колоній неспороутворюючих мікроорганізмів у змивах з рук одного робітника, у виробничих приміщеннях 2 класу чистоти, і не більше 5 колоній у змивах з рук одного робітника у приміщеннях 3 класу чистоти.

Результати контролю мікробної контамінації рук персоналу фіксують у журналі мікробіологічного контролю і маршрутному листі, який додається до протоколу серії.

ДР 1.2. Підготовка технологічного одягу

Необхідно, щоб одяг і його якість відповідали процесу і класу робочої зони. Одяг слід носити таким чином, щоб захистити продукцію від контамінації.

ДР 1.2.1. Підготовка спецодягу для класу D і C.

Підготовка одягу полягає у його сортуванні, пранні, сушінні, прасуванні та подальшому зберіганні.

ДР 1.2.1.1. Сортуння одягу.

Перш за все одяг перевіряють на його цілісність, потім сортують окремо кожен вид один від одного (білизна, штани, куртка) . Бахіли відокремлюються від іншого одягу і перуться окремо. Маски одноразові пранню не підлягають.

ДР 1.2.1.2. Прання одягу.

Прання відбувається у пральних машинах при температурі 30 – 40°C, протягом 40хв.

ДР 1.2.1.3. Сушіння одягу.

Відбувається у сушильних шафах при температурі повітря 85 – 90°C, протягом 70хв.

ДР 1.2.1.4. Прасування спецодягу.

Так як це одяг для класу С, то замість стерилізації використовуємо прасування з лицевого боку при температурі 120°C, тиску 1,11МПа протягом 30хв.

ДР 1.2.1.5. Зберігання технологічного одягу.

Готовий запакований одяг зберігається протягом 24 годин та КУО повинно становити менше 5.

ДР 1.3. Підготовка дезінфікуючих розчинів

Для запобігання контамінації та дотримання стерильності на підприємстві використовують миючі засоби. Розчини готують в емальованому або фаянсовому посуді або в бутлях з товстого темного скла. Посуд, де зберігаються розчини, обов'язково повинен бути щільно прикритим кришкою або корком. Приготування розчинів звичайно проводиться у спеціальній кімнаті, що прилягає до санвузла. Бажано, щоб це темна або напівтемна кімната, стіни та підлога її вистелені плиткою, там є раковина для миття рук.

ДР 1.3.1. Підготовка дезінфікуючих розчинів для персоналу

ДР 1.3.1.1. Приготування розчину Октенісепту.

Для приготування 10 л 1% розчину октенісепту використовують 100 г октенісепту та 9900 мл води очищеної та ретельно перемішують (Р –).

Зберігають у пакуванні виробника в закритих добре провітрюваних приміщеннях, що недоступні для загального користування. При зберіганні потрібно запобігати дії прямого сонячного проміння.

ДР 1.3.2. Підготовка дезінфікуючих розчинів для обладнання

ДР 1.3.2.1. Приготування розчину перекису водню.

Для приготування 10 л – 3 % розчину перекису водню використовують 300 мл перекису водню та 9700 мл води очищеної, а для 6 % – 600 мл перекису водню та 9400 мл води очищеної та ретельно перемішують протягом 20–25 хв.

ДР 1.3.2.2. Приготування спирту етилового 76%.

Для приготування 0,8 л спирту етилового 76% до 0,66 л спирту етилового ректифікованого додають 0,16 л води очищеної, ретельно перемішують. Витрата спирту етилового 76% для обробки рук складає 0,8 л на одну операцію.

ДР 1.3.3. Підготовка дезінфікуючих розчинів для приміщень

ДР 1.3.3.1. Приготування розчину Хлорантоїн.

Для приготування 10 л 0,2 % розчину 20 г хлорантоїну розчиняють в 9980 мл води очищеної.

ДР 1.3.3.2. Приготування розчину деконексу 50 ФФ.

Для приготування 10 л 1 % розчину деконексу використовують 100 г деконексу та 9900 мл води очищеної та ретельно перемішують.

ДР 1.4. Підготовка виробничого приміщення.

Санітарну підготовку приміщень проводять в одязі, призначеної для виробничих приміщень того ж класу чистоти і, при необхідності, респіраторі. Дезінфекційна обробка виробничих приміщень, в яких не проводиться контроль мікробіологічної чистоти, не обов'язкова.

ДР 1.4.1. Щоденне прибирання приміщень.

Щоденне очищення і дезінфекцію приміщень проводять безпосередньо після закінчення виробничого процесу, після кожної зміни. Забирають розсипані тверді інгредієнти, механічні забруднення за допомогою пилососа,

втирають пролиті рідини. Проводять вологе прибирання теплою водою із застосуванням 0,5% розчину миючого засобу (температурою 40–50°C), протираючи паролоновою губкою панелі, стіни, двері, ручки дверей, повітроводи, опалювальні прилади і простір за ними, потім цим розчином миють підлогу. Обробку приміщень починають в точці, найбільш віддаленій від дверей. Після обробки з миючими засобами, всі поверхні потім промивають водою очищеною, висушують та проводять дезобробку (1-3)% розчину перекису водню.

У разі виявлення в повітрі приміщень грибів, концентрацію перекису водню збільшують до 4%, а за наявності спороутворюючих мікроорганізмів – 6%. Очищення освітлювального обладнання, зашкленних поверхонь, віконних рам проводять у міру забруднення, але не рідше одного разу на тиждень.

ДР 1.4.1 Генеральне прибирання.

Генеральне прибирання проводять раз у 5 – 6 днів. Проводять очищення стелі, обробку всієї підлоги, прибирання та наведення порядку в шафах, стелажах, очищення і дезінфекцію повітроводів і вентиляційних камер, а також проводять очищення освітлювального обладнання, зовнішніх поверхонь вікон, та навіть проводять планові ремонтні та слюсарні роботи.

Контроль мікробної контамінації виробничих приміщень проводить мікробіолог за допомогою змивів тампонами не рідше 1 разу на 2 тижні безпосередньо після обробки приміщень дезінфікуючими розчинами, 1 раз на тиждень під час виробничого процесу.

У змивах з поверхонь приміщень і зовнішніх поверхонь обладнання з площі 10 x 10 см допускається наявність не більше 10 колоній неспороутворюючих мікроорганізмів на двох паралельних чашках Петрі.

Приміщення, в яких відбувається виробничий процес, повинні представляти мінімальний ризик у плані контамінації вихідної сировини, матеріалів або продукції. Підготовку виробничих приміщень проводять у відповідності до вимог СТП 00481212-03-01-2001 “Санітарна підготовка виробничих

приміщень”, ТІ №Т-45 “Інструкція по підготовці до роботи і оброблення після технологічного процесу виробничих приміщень, обладнання і інвентаря” та Методичних рекомендацій, затверджених наказом МОЗ України від 14.12.01 г №502.

У разі проведення дезінфекції необхідно застосовувати декілька типів дезінфікуючих засобів.

ДР 1.5. Підготовка обладнання та комунікацій

Виробниче обладнання не має подавати ніякої небезпеки для продукції. Підготовку обладнання та комунікацій проводять у відповідності з ТІ № Т-45 “Інструкція по підготовці до роботи і оброблення після технологічного процесу виробничих приміщень, обладнання і інвентаря” та Методичних рекомендацій, затверджених наказом МЗ України від 14.12.01 г №502.

ДР 1.5.1. Миття.

Перед початком будь-якої технологічної операції повинні бути вжиті заходи, які гарантують, що обладнання є чистим і вільним від будь-якої сировини, залишків продукції, що не використовуються в запланованій операції. Обладнання, яке задіяне з сировиною, потрібно ретельно вимити в розчині миючого засобу при температурі 60 °С, тривалістю 30 хв. Після закінчення миття залишки води зливають з установки. Далі здійснюють пропарювання апарату шляхом подачі пари під тиском 0,3 – 0,4 МПа.

ДР 1.5.2. Дезінфекція та ополіскування.

Обладнання ополіскують очищеною водою та дезінфікують розчином.

ДР 2. Підготовка вентиляційного повітря

ДР 2.1. Забір повітря

Забір повітря здійснюється через повітрозбірник ЗШ- на висоті 20м.

ДР 2.2. Попереднє очищення повітря від механічних часток

Повітря, що поступає в систему вентиляції проходить попереднє очищення від механічних часток за допомогою коміркового фільтру ФЯУБ Ф-.

ДР 2.3. Кондиціювання

Повітря проходить через вентилятор В- і конденсатор К- де відбувається стабілізація термодинамічних показників повітря : $P= 0,35-0,5$ МПа, $t=60^{\circ}\text{C}$, $W=60\%$.

ДР 2.4 Очищення повітря для приміщень класу D

На наступному фільтрі типу НЕРА Ф- повітря очищається для приміщень класу чистоти D. Ступінь очищення становить $E=95\%$.

ДР 2.5. Очищення повітря для приміщень класу C

На наступному фільтрі типу НЕРА Ф- повітря очищається для приміщень класу чистоти C. Ступінь очищення становить $E=99,5\%$.

ДР 3. Підготовка води

Відповідно, в залежності від потрібної якості води для даного фармацевтичного виробництва застосовують різні схеми обробки води питної якості.

ДР 3.1. Підготовка води очищеної

ДР 3.1.1. Забір води з міського водопроводу.

Вибір води, яка використовується в технологічному процесі, повинен виходити із потреб, який тип води допускається застосовувати на окремих стадіях виробництва лікарських засобів. Принципово важливо знати чітке призначення кінцевого продукту:

- асептичні парентеральні продукти;
- стерильні продукти, які підлягають термічній стерилізації;
- нестерильні продукти зі спеціальними потребами по мінімізації мікробного забруднення;
- нестерильні продукти;

- решта продуктів.

ДР 3.1.2. Очищення води від механічних часток.

Груба фільтрація дає можливість знищувати частинки розміром більше 80 -100 мкм. В якості для обладнання грубої фільтрації використовують фільтри з пісочною набивкою (Ф –). Вибір сорту піску залежить від результатів аналізу води з врахуванням сезонних змін. Фільтр періодично промивається.

ДР 3.1.3. Очищення на вугільних фільтрах.

Фільтрація через вугільний фільтр (Ф –) дозволяє знизити концентрацію органічних речовин і хлору. Використовуються стандартні патронні фільтри з активованим вугіллям. Придатність фільтрів контролюється різницею тисків води до і після фільтра.

ДР 3.1.4. Пом'якшення води.

Пом'якшувач (ГФ –) працює за принципом іонного обміну та зменшує жорсткість води. Він складається із двох іонно обмінних колон, які послідовно зв'язанні. В колонах іони кальцію та магнію замінюються натрієм. Вміст інших солей в воді залишається незмінним.

Лічильник води FQI 270.0.1, встановлений на вході в пом'якшувач, вимірює кількість поживної води. Дві іонно – обмінні колони зв'язанні послідовно. Колона F 270.2.1 завжди працює як робоча, а колонна F 270.3.1 – як резервна.

Регенерація робочої колони починається автоматично, після того як через колону пройде заданий на ПТ об'єм води. Тривалість інтервалу між двома циклами регенерації встановлюється на ПУ. Протягом регенерації робочої колони, відкривається клапан V 270.2.3, для того щоб поживна вода поступала на другу (резервну) колону, яка працює як єдиний пом'якшувач під час регенерації робочої колони. Як тільки регенерація закінчена, робоча колона повертається в нормальний режим роботи.

Друга (резервна) колона регенерується після трьох циклів регенерації робочої колони. Робоча та резервна колони ніколи не регенеруються

одночасно. Протягом регенерації робочої колони відкривається клапан V 270.3.3, щоб пом'якшена вода поступала на стадію зворотнього осмосу, обходячи резервну колону. Як тільки регенерація закінчується, резервна колона повертається в нормальний режим роботи.

Регенерацію іонообмінних колон проводиться розчином хлорида натрія, який знаходиться в резервуарі В 270.0.1..

Для запобігання росту мікроорганізмів, пом'якшувач обладнаний генератором хлору, який виробляє вільний хлор, при подачі соляного розчину на регенерація колон. Також в резервуар поміщається таблетка гіпохлориду натрія не рідше чим 1 раз на місяць.

Контроль якості води на відсутність в ній іонів жорсткості проводиться приладом «Тестомат», який розміщений на рамі установки. При перевищенні вмісту іонів жорсткості в регенованій воді горить аварійний сигнал на Testomat.

ДР 3.1.5. Зворотній осмос.

Пом'якшена вода згідно СПС – 2 – 121 *Вода пом'якшена* проходить через картриджний фільтр та поступає під тиском 5 – 20 Бар. Вода проходить через мембрани зворотнього осмосу (ГФ –), які затримують солі та макромолекули. З модуля зворотнього осмосу виходить пермеат. Частина утвореного концентрата повертається на насос через рециркуляційний отвір, а частина на злив через клапан. За допомогою клапану можна міняти водний конвенсійний фактор (відношення витрат пермеату до витрат помякшеної води). Вихід пермеата складає 70% від помякшеної води. Вміст солі в пермеаті біля 2% від вмісту пом'якшеної води.

ДР 3.1.6. Зберігання та розподілення очищеної води.

Після очищення води її зберігають в спеціальних ємностях (З –).

ТП 4. Підготовка компонентів

ТП 4.1. Зважування компонентів.

На вагах зважуємо лізат біомаси, натрію тетроболат та гліцерин які подаються у Р-. Їх кількість розраховується із зазначеної кількості у АНД (див. розд. 5.1.3).

ТП 5. Підготування розчину лізату біомаси

ТП 5.1. Змішування всіх компонентів розчину

У реактор Р- подається вода очищена з загально дільничної установки одержання води очищеної. Також у реактор подаються компоненти зі стадії ТП 4.1. Реактор оснащений мішалкою для перемішування всіх компонентів для приготування розчину. Готується розчин об'ємом 900 л. Час перемішування складає 20 хв.

ТП 5.2. Стерилізуюча фільтрація розчину

Стерилізуюча фільтрація здійснюється на попередньо простерилізований і перевіреної на герметичність установці Ф-. Для стерильної фільтрації використовуються мембранні фільтри з розміром пор 0.22 мкм. Після фільтрації розчин подається до збірника 3-44

У процесі фільтрації і зберігання товарних розчинів збірник прийому нестерильного розчину і збірник прийому стерильного розчину постійно охолоджують, подаючи «захожену» воду в сорочку збірника. Фільтрація розчину відбувається 2 год.

ТП 6. Наповнення флаконів.

Важливою характеристикою процесу наповнення–закупорювання є стерильне та апірогенне наповнення та закупорювання флаконів в повністю асептичних умовах на одній машині (ГФ-). Суспензію про біотичного препарату отримуємо із стадії ТП 6.1. дозують у флакони і закривають стерильною кришкою.. Переміщення контейнерів для подальшого процесу відбувається за допомогою конвеєрної системи.

ТП 8. Перевірка флаконів на герметичність.

Після стадії запайки флаконів, вони надходять по конвеєрній стрічці до автоматичної машини для перевірки на герметичність (ГФ-). Принцип роботи

ґрунтується на методі високовольтної перевірки та електропровідності продукту, розлита в пластиковий флакон. Флакони розроблені спеціально для повністю автоматичної перевірки на герметичність.

ПМВ 9. Пакування готової продукції

Флакон з Prebiotic Thermal Spring Water разом з інструкцією індивідуально пакується в картонну коробку. Потім у групову і транспортну тару відповідно до ДСТ 17768-90.

ЗВ 10. Знезараження відходів

Технологічний процес розфасовки пробіотичних препаратів не передбачає утворення стічних вод. Однак, при промиванні устаткування, мийці змінних комплектуючих деталей і пранню утворюються стоки зі змістом залишкових кількостей субстанції лікарської речовини.

ЗВ 10.1. Знешкодження твердих відходів.

Відходи від стадії ПМВ 8, які не підлягають переробці передають на полігони заповнення. Ці відходи у вигляді коробок передають на підприємства по переробці відходів, у вигляді етикеток і бандеролей – сміттєспалюючий завод «Енергія»

ЗВ 10.2. Знешкодження рідких відходів.

Стоки, що утворюються, збираються по окремій системі каналізації в заглиблену ємність, відкіля насосом перекачують у збірники, аналізуються і, при необхідності, нейтралізуються додаванням 2-4% розчин лугу. Використовувані у виробництві субстанції нестабільні і розкладаються у воді, при рН більш 8,5 відбувається інтенсивний гідроліз. Для ефективної нейтралізації передбачене перемішування стоків насосом. Після нейтралізації проаналізовані стоки, що містять припустиму кількість домішок, скидаються у виробничо-побутову каналізацію.

ВИСНОВКИ

1. Молочнокислі бактерії широко використовуються в харчовій технології, а в біотехнології знаходять застосування для виробництва молочної кислоти, для створення пробіотиків в формі лікувальних препаратів, виробництві імуномодуляторів та компонентів косметичних засобів.

2. На теперішній час лактобактерії найчастіше за інші мікроорганізми застосовуються у виробництві пробіотиків. Пробіотики, які містять лактобактерії, посилюють рівень неспецифічної резистентності макроорганізму і тим самим покращують його імунний статус.

3. Лактобактерії, що застосовують для виготовлення пробіотичних препаратів, повинні мати високу здатність до адгезії до клітин господаря; попереджувати або послаблювати адгезію патогенів; зберігати життєздатність та розмножуватися; утворювати кислоти, перекис водню та бактеріоцини як антагоністів росту патогенних мікроорганізмів; бути безпечними і сприяти формуванню нормальної збалансованої мікрофлори організму господаря.

4. Технологія екстрактів із біомаси лактобацил включає вирощування бактерій, виділення біомаси та лізис клітин.

5. В останні роки інтенсивно ведуться дослідження в напрямку використання біомаси лактобацил, головним чином *Lactobacillus rhamnosus*, як імуномодуляторів.

6. Середовища для вирощування лактобацил в промисловому масштабі повинно містити рослинні матеріали, наприклад сою, зерно або гідролізоване молоко, щоб запобігти ризику пріон асоційованих захворювань при застосуванні сировини тваринного походження. У разі необхідності біомаса після ферментації може бути інактивована температурною обробкою, сконцентрована та заморожена. Руйнування клітин (лізис) може бути проведено механічним, ензиматичним або хімічним способом.

7. Розроблено технологію отримання лосьйону з Prebiotic Thermal Spring Water з використанням бактерій *Lactobacillus rhamnosus* для сухої шкіри. Наведено технологічну та апаратурну схему, опис та специфікацію. Також наведено основну аналітично-нормативну документацію готового лікарського засобу.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Акулевич О.В., Орябінська Л.Б., Дуган О.М. Кінетика росту молочнокислих бактерій роду *Lactobacillus* на живильних середовищах з різноманітними джерелами вуглецевого й азотного живлення. Проблеми Біології та Біотехнології. Наукові вісті НТУУ "КПІ" 2013, 3, 8 – 11.
2. Борцюх В.В., Шугай М.О. Бактеріюцини молочнокислих бактерій як природні консерванти харчових продуктів. Продовольчі ресурси, 2016, 6, 167 – 175. http://nbuv.gov.ua/UJRN/pr_2016_6_20.
3. Головній В.О., Борищук В.О., Кащенко Г.Ф., Головній В.В. Аромозасоби для аромотерапії та косметології. Навч. посіб. для студентів вищ. фармац. навч. закл. — Внд-во “Просвіта”, 2007. — 225 с.
4. Дзюба О.С., Богдан Т.З., Орябінська Л.Б., Дуган О.М. Біотерапевтичні властивості лактобактерій. Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології, 2013, 4(118), 19-29.
5. Дрибноход Ю.Ю. Пособие по косметологии. — СПб: ИД. 2004. — 544 с.
6. ДСТУ 4093—2002 “Лосьйони та тоніки косметичні”. — к .. Держстандарт України, 2002. — 7 с.
7. Дуган О. М. Розробка технології нового пробіотику на основі молочнокислих бактерій роду *Lactobacillus*: звіт про НДР (заключ.) НТУУ "КПІ" ; кер. роб. О. Дуган. - К., 2012. - 108 л. - Д/б №2468-п. <https://ela.kpi.ua/handle/123456789/5762>.
8. Закон України «Про затвердження методичних рекомендацій щодо виконання санітарно-гігієнічних вимог та проведення мікробіологічного контролю у виробництві нестерильних лікарських засобів». № 502 від 14.12.2001.—К.: – МОЗ України.
9. Ісаєнко О.Ю., Книш О.В., Фалько О.В., Прокопюк В.Ю., Прокопюк О.С. Цитотоксичність структурно-метаболітних комплексів *Lactobacillus rhamnosus* GG та *Saccharomyces boulardii*. Фізіологічний

журнал, 2019; 65(5), 45 – 48. https://fz.kiev.ua/journals/2019_V.65/2019-5/5-2019-40-48.pdf.

10. Калініченко С.В., Бабич Є.М., Рижкова Т.А., Маслій І.Г., Коротких О.О., Даніліна С.С., Солянік О.Г., Шикова О.А., Скляр Н.І., Ткач Л.М., Балак А.К., Нємкова С.М., Десятникова О.В. Сучасний стан розробки та застосування пробіотичних, пребіотичних та синбіотичних препаратів. *Annals of Mechnikov Institute*, 2013; 3, 5 – 12. www.imiamn.org.ua/journal.htm.

11. Калюжин О.В. Пробиотические штаммы лактобацилл как иммуномодуляторы: в фокусе - *Lactobacillus rhamnosus* GG. Медицинский Совет, 2017; 9, 108-115. <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2017-9-108-115>.

12. Капрельянц Л. В., Трегуб Н.С. (2016) Селензбагачені пробіотичні продукти функціонального призначення. *Мікробіологія і біотехнологія*, 1(33), 6 - 18. DOI: [https://doi.org/10.18524/2307-4663.2016.1\(33\).65353](https://doi.org/10.18524/2307-4663.2016.1(33).65353).

13. Коноплянко В.В., Воробей Л.І., Ткачук Р.Р. Ефективність пероральних пробіотиків для відновлення вагінальної флори. *Збірник наукових праць асоціації акушерів-гінекологів України*, 2014, 1/2 (33/34), 160 - 177.

14. Кордон Т.І. Принципи створення, механізм дії та клінічне застосування пробіотиків. *Annals of Mechnikov Institute*, 2014; 2, 8 – 16. www.imiamn.org.ua/journal.htm.

15. Лукомская И.С., Городецкий В.К. Применение микроцида глюкозооксидазы // *Биохимия*. – 1996. – Т. 26, № 3. – С. 477-482.

16. Належна виробнича практика лікарських засобів. Настанова 42-4.0-2011.–К.:МОЗ України, 2011. – 289 с.

17. Новик Г.И., Сидоренко А.В. Лактобациллы: биотехнологический потенциал и проблемы идентификации. *Проблемы здоровья и экологии*, 2007, № 1 (11), 141-149. <http://elib.gsmu.by/handle/GomSMU/1184>.

18. Пирог Т.П., Пенчук Ю.М. Технологія мікробного синтезу лікарських засобів: метод. рекомендації до викон. курс. роботи для студ.

напрямку підготовки 6.051401 “Біотехнологія” ден. форми навч. – К.: НУХТ, 2014 — 60 с.

19. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія: Підруч. – 2-е вид., доп. і перероб. – К.: НУХТ., 2010. – 632 с.

20. Раскошная Т.А., Семенихина В.Ф., Рожкова И.В. Исследование влияния состава питательной среды на интенсивность развития *L. rhamnosus*. 2014; http://www.vniitti.ru/conf/conf2014/article/RaskoshnayaT.A._

21. SemhekhinaV.F._RozhkovaI.V._statya.pdf

22. Рубель М.О., Волошина І.М. Використання про біотичних мікроорганізмів у косметичних лікарських засобах // Наукові праці НУХТ. – 2014. – Т. 20, № 2. – С. 23-29.

23. Чорногор Н. П., Большакова В.Л., Вінніков А.І. Антагоністична активність молочнокислих бактерій. Вісник Дніпропетровського університету, 2006, 14(2), 187 – 191.

24. Хижняк О.С. Розробка складу та біотехнології отримання комплексного пробіотичного препарату. Дис. кан.фарм. н., 2016; 203 с.

25. Хромова Н.Ю. Биотехнологическая конверсия зернового сырья для получения пробиотических продуктов и кормовых белковых добавок. Дис. канд. т.н., М. 2019.

26. Шапиро Д.К. Практикум по биологической химии. 2-е изд. Минск: Выш. школа, 1996. – 288 с.

27. Цинберг М.Б., Дерябин Д.Г., Денисова И.В. и др. Ростовые и морфологические характеристики производственных штаммов *Bifidobacterium* и *Lactobacillus* при использовании гидролизатно-молочной и гидролизатно-соевой сред. Антибиотики и химиотерапия, 2003; 48, 12, 9—13.

28. Яруллина Д.Р., Фахруллин Р.Ф. Бактерии рода *Lactobacillus*: общая характеристика и методы работы с ними. Казань, 2014, 51 с.

29. Anderson R.C., Cookson A.L., McNabb W.C., Kelly W.J., Roy N.C. *Lactobacillus plantarum* DSM 2648 is a potential probiotic that enhances intestinal

barrier function. FEMS Microbiology Letters, 2010; 309 (2), 184–192.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.02038.x>

30. Bauer J.A., Salvagni M., Vigroux J.P.L., Chalvet L.L.G., Chiavaroli C. KR20117007527. Immunomodulatory extract derived from *Lactobacillus* bacteria and its manufacturing method and use thereof. Patent Republic of Korea, 20110051268 (A). 2008. <http://europepmc.org/article/PAT/KR20110051268#full-text-links>; EP 2161329A1. <https://patents.google.com/patent/EP2161329A1/en>.

31. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume One : The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria, 2nd Edition, Garrity G.M., Boone D.R., Castenholz R.W. (Eds.), 721p.

32. British Pharmacopoeia. — London: The Stationery Office, 1999. 750 p.

33. Ceapa C., Davids M., Ritari J. The variable regions of *Lactobacillus rhamnosus* genomes reveal the dynamic evolution of metabolic and host-adaptation repertoires. Genome Biology and Evolution. 2016; 8(6), 1889-905. doi: 10.1093/gbe/evw123.

34. Chapman CMC, Gibson GR, Rowland I. Health benefits of probiotics: are mixtures more effective than single strains? European Journal of Nutrition, 2011; 50(1), 1–17. doi: 10.1007/s00394-010-0166-z.

35. European Pharmacopoeia. Fifth edition. — Strasbourg, 2005. Vol. 1. — 901 p.; Vol. 2. — 2779 p.

36. FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Ontario, Canada: 2002. <http://www.fao.org/es/ESN/Probio/probio.htm>.

37. Fong F., Kirjavainen P., El-Nezami H. Immunomodulation of *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG)-derived soluble factors on antigen-presenting cells of healthy blood donors. Scientific Reports, 2016; 6, Article number: 22845. <https://doi.org/10.1038/srep22845>.

38. Harish K, Varghese T. Probiotics in humans—evidence based review. Calicut Medical Journal, 2006; 4(4):e3. Microsoft Word - CMJ_Template___PROBIOTICS- Revised.doc.
39. Kechagia M., Basoulis D., Konstantopoulou S., Dimitriadi D., Gyftopoulou K., Skarmoutsou N., Fakiri E.M. Health Benefits of Probiotics: A Review. 2013. ISRN Nutrition, 481651. doi: 10.5402/2013/481651.
40. Kim H.S., Chae H.S., Jeong S.G. In vitro antioxidative properties of Lactobacilli. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 2006, 19(2), 262-265. DOI: <https://doi.org/10.5713/ajas.2006.262>
41. Kolling Y., Salva S., Villena J., Alvarez S. Are the immunomodulatory properties of *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505 peptidoglycan common for all Lactobacilli during respiratory infection in malnourished mice? PLoS ONE 2018; 13(3), e0194034. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194034>.
42. Langa S., Martín-Cabrejas I., Montiel R., Á. Peirotén, Arqués J.L., Medina M. Protective effect of reuterin-producing *Lactobacillus reuteri* against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in semi-hard cheese. Food Control, 2016, 84, 284-289. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.08.004>.
43. Lingren S. E., Dobrogos W.J. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. FEMS Microbiological Review, 1990, 87, 149–164. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1990.tb04885.x.
44. Mack D.R., Ahrne S., Hyde L., Wei S., Hollingsworth M.A. Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells in vitro. Gut, 2003; 52 (6), 827-33. doi: 10.1136/gut.52.6.827.
45. Neville B.A., Forde B.M., Claesson M.J., Darby T., Coghlan A., Nally K., Ross R.P., O'Toole P.W. Characterization of pro-inflammatory flagellin proteins produced by *Lactobacillus ruminis* and related motile *Lactobacilli*. PLoS One. 2012, 7(7), e40592. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040592>.

46. Орябінська Л., Дзюба О., Дуган О. *Lactobacillus* як продуценти позаклітинної таназі. *Biotechnologia Acta*, 2018, 11(5), 65-74. <https://doi.org/10.15407/biotech11.05.065>
47. Pandey K.R., Naik S.R., Vakil B.V. Probiotics, prebiotics and synbiotics- a review. *Journal of Food Science and Technology*, 2015; 52(12), 7577–7587. doi: 10.1007/s13197-015-1921-1.
48. Reid G. The scientific basis for probiotic strains of *Lactobacillus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999; 65(9), 3763–3766. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC99697/pdf/am003763.pdf>.
49. Polac-Berecka M., Wasko A., Kordowska-Wiater M., Podlesny M., Targonski Z., Kubik-Komar A. Optimization of medium composition for enhancing growth of *Lactobacillus rhamnosus* PEN using response surface methodology. *Polish Journal of Microbiology*, 2010; 59(2), 112—118. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20734756/>.
50. Roos S., Engstrand E., Jonsson H. *Lactobacillus gastricus*, *Lactobacillus antri*, *Lactobacillus kalixensis*, and *Lactobacillus ultunensis* isolated from human stomach mucosa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005; 55, 77-82. DOI: 10.1099/ijs.0.63083-0.
51. Segers M.E., Lebeer S. Towards a better understanding of *Lactobacillus rhamnosus* GG - host interactions. *Microbial Cell Factories*, 2014; 13 Suppl 1, S7. DOI: 10.1186/1475-2859-13-S1-S7.
52. Vitetta L., Briskey D., Alford H., Hall S., Coulson S. Probiotics, prebiotics and the gastrointestinal tract in health and disease. *Inflammopharmacology*, 2014; 22(3), 135-154. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24633989>.
53. Vrese de M, Schrezenmeir J. Probiotics, prebiotics, and synbiotics. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 2008; 111, 1-66. doi:10.1007/10_2008_097.
54. WGO World Gastroenterology Organisation 2008. Практические рекомендации. Пробиотики и пребиотики. 2008.

<https://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/probiotics-russian-2008.pdf>.

55. Xing J, Wang G, Zhang Q, Liu X, Gu Z, Zhang H, et al. Determining antioxidant activities of *Lactobacilli* cell-free supernatants by cellular antioxidant assay: A comparison with traditional methods. PLoS ONE 2015; 10(3): e0119058. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119058>

56. Zhao Y., Hong K., Zhao J., Zhang H., Zhai Q., Chen W. *Lactobacillus fermentum* and its potential immunomodulatory properties. Journal of Functional Foods, 2019; 56, 21-32. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.02.044>.

57. Zheng J, Wittouck S., Salvetti E., Franz C.M.A.P, Harris H.M.B. та інших. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology, 2020; 70(4), 2782-2858. DOI: 10.1099/ijsem.0.004107.