

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ**

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

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

«__» лютого 2022 р.

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

«__» лютого 2022 р.

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ МАГІСТРА**

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код та назва спеціальності)
освітньо-професійної програми «Фармацевтична біотехнологія»
на тему: Бактеріоцини грамнегативних бактерій

Виконав: здобувач II курсу, групи 02

ШИРАЙ Вікторія Олександрівна

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Керівник СТАБНІКОВ Віктор Петрович

(прізвище, ім'я та по батькові повністю)

(підпис)

Консультанти

(ім'я та прізвище)

(підпис)

(ім'я та прізвище)

(підпис)

(ім'я та прізвище)

(підпис)

Рецензент

Віталій КЛИМЕНКО

(ім'я та прізвище)

(підпис)

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

Здобувач

(підпис)

Київ – 2022 р.

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

ЗАТВЕРДЖУЮ
Завідувач кафедри
біотехнології і мікробіології
Віктор СТАБНИКОВ
“ 03 ” листопада 2021 року

ЗАВДАННЯ

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

ШИРАЙ Вікторії Олександрівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Бактеріюцини грамнегативних бактерій
керівник роботи СТАБНИКОВ Віктор Петрович, д.б.н., доц.,
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)
затверджені наказом закладу вищої освіти від “02” листопада 2021 року № 863-кс

2. Строк подання здобувачем роботи 1 лютого 2022 року

3. Вихідні дані до роботи Об'єм ферментера – 100л, коефіцієнт заповнення – 0,6

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити)
Літературний огляд, техніко-економічне обґрунтування, обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента, обґрунтування стадій виділення і очищення субстанції для виробництва ЛЗ, обґрунтування стадій підготовки персоналу, води очищеної та вентиляційного повітря, обґрунтування вибору товарної форми та первинної упаковки, специфікація ділянки та опис технологічної схеми виробничого біосинтезу та процесу виробництва ЛЗ, контроль виробництва

5. Перелік графічного матеріалу Апаратурна та технологічна схема виробничого біосинтезу, апаратурна та технологічна схема виробництва ЛЗ на основі коліцину

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 03 листопада 2021 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ п/п	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	РОЗДІЛ 1. Загальна характеристика бактеріоцинів	03.11.2021 – 15.11.2021	
2	РОЗДІЛ 2. Властивості та механізм дії бактеріоцинів	15.11.2021- 29.11.2021	
3	РОЗДІЛ 3. Технологічні аспекти одержання грамнегативних бактерій.	29.11.2021- 05.12.201	
4	РОЗДІЛ 4. Техніко-економічне обґрунтування випуску субстанції для виготовлення ЛЗ	05.12.2021- 23.12.2021	
5	РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми біосинтезу субстанції та технологічної схеми виробництва ЛЗ	23.12.2021- 10.01.2022	
6	РОЗДІЛ 6. Опис технологічного процесу виробничого біосинтезу	10.01.2021- 18.01.2022	
7	РОЗДІЛ 7. Опис технологічного процесу виробництва ЛЗ	18.01.2022- 01.02.22	

Здобувач _____
(підпис)

Вікторія ШИРАЙ _____
(ім'я та прізвище)

Керівник роботи _____
(підпис)

Віктор СТАБНІКОВ _____
(ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна магістерська робота присвячена аналізу наукової літератури щодо особливостей бактеріоцинів грамнегативних бактерій та їх практичного використання у медицині, сільському господарстві та для біосинтезу інших цінних сполук, а також розробленню технологічної та апаратурної схем виробництва препарату на основі коліцину культивуванням штамму *Escherichia coli* UTI, що синтезує 0,52 г/л коліцину за 15 год, а також розробленню технології виробництва препарату на основі коліцину в капсулах. Розрахована потужність виробництва субстанції - 6,3 кг/рік. Коліцин використовується для виробництва лікарського препарату в капсулах для лікування хвороби Крона. Технологічний процес біосинтезу коліцину включає допоміжні роботи (приготування та стерилізацію допоміжних розчинів; приготування та стерилізацію поживних середовищ) та технологічний процес (вирощування посівного матеріалу в два етапи: в колбах на качалці, посівному апараті об'ємом 10 л, виробничий біосинтезу ферментері об'ємом 100 л, іонообмінна сорбція та концентрування фугату, отримання порошку коліцину).

Особливості процесу культивування: температура 37⁰С, рН-7, швидкість перемішування - 220 об/хв., тривалість – 15 год.

Технологічна схема виробництва коліцину в капсулах включає допоміжні роботи (санітарна підготовка виробництва (підготовка персоналу, технологічного одягу), підготовка вентиляційного повітря, підготовка води очищеної, підготовка сировини), технологічний процес (підготовка маси для наповнення капсул, наповнення капсул) та стадії пакування, маркування, відвантаження (фасування капсул у блістери, пакування блістерів у картонні пачки та пакування пачок у групову тару).

Кваліфікаційна робота викладена на 129 сторінках друкованого тексту, містить 10 таблиць, 5 рисунків і складається зі вступу, 7 розділів, списку використаної літератури (142 джерел) та графічної частини (5 креслень формату А1, 1 креслення формату А2).

ЗМІСТ

ВСТУП

РОЗДІЛ 1. Загальна характеристика бактеріоцинів.....	7
1.1. Бактеріоцини грамнегативних бактерій.....	9
1.2. Бактеріоцини грампозитивних бактерій	14
РОЗДІЛ 2. Властивості та механізм дії бактеріоцинів	19
2.1. Механізм дії бактеріоцинів	21
2.2. Механізм стійкості до бактеріоцинів	22
РОЗДІЛ 3. Технологічні аспекти одержання грамнегативних бактерій.....	23
РОЗДІЛ 4. Техніко-економічне обґрунтування випуску субстанції для виготовлення лікарського засобу та виробництва готової форми ЛЗ.....	34
4.1. Передумови виробництва ЛЗ.....	34
4.1.1. Аналіз фармакологічних властивостей цільового ЛЗ та галузей його використання.....	34
4.1.2. Обсяг ринку та очікувані темпи його розвитку	37
4.1.3. Вибір форми випуску лікарського засобу.....	38
4.1.4. Опис лікарського засобу згідно АНД (проект АНД).....	39
4.1.5. Розрахунок річної потужності виробництва та кількості серій на рік.....	44
4.1.6. Перелік виробництв кінцевого продукту і виробників (постачальників) субстанції	46
4.1.7. Розрахунок річної потужності виробництва субстанції, об'єму ферментера та кількості виробничих циклів	48
РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми біосинтезу субстанції та технологічної схеми та технологічної схеми виробництва ЛЗ.....	51
5.1. Обґрунтування вибору біологічного агенту, поживного середовища для його культивування.....	51
5.2. Обґрунтування вибору способу культивування і типу ферментера	53
5.3. Обґрунтування підготовки та стерилізації поживного середовища	56

5.4. Обґрунтування стадій виділення і очищення субстанції для виробництва ЛЗ	58
5.5. Обґрунтування класів чистоти виробничих приміщень (підготовка персоналу)	67
5.6. Обґрунтування вибору стадії підготовки повітря.....	72
5.7. Обґрунтування вибору стадії підготовки води очищеної	75
5.8. Обґрунтування вибору первинної упаковки ЛЗ.....	78
РОЗДІЛ 6. Опис технологічного процесу виробничого біосинтезу... ..	78
6.1. Специфікація обладнання ділянки виробничого біосинтезу	81
6.2. Опис технологічної схеми виробничого біосинтезу... ..	82
6.3. Контроль виробництва.....	91
РОЗДІЛ 7. Опис технологічного процесу виробництва ЛЗ	97
7.1. Специфікація обладнання процесу виробництва ЛЗ	97
7.2. Опис технологічної схеми процесу виробництва ЛЗ... ..	101
7.3. Контроль виробництва.....	112

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

ДОДАТКИ

ВСТУП

Бактеріоциногенність є однією з найбільш поширених систем захисту бактерій. Згідно з Klaenhammer, 99% усіх відомих мікроорганізмів здатні синтезувати, принаймні, хоча б один вид бактеріоцинів. Для деяких видів бактерій можна спостерігати утворення від 10 до 100 різних антибактеріальних пептидів. Сучасний рівень знань про бактеріоцини характеризується значною неоднорідністю – одні кілерні фактори вивчені досконало (коліцини, лактоцини), тоді як про інші відомо лише частково. Лізогенні системи в яких спостерігається одночасне виділення бактеріоцинів декількох типів є унікальними системами для дослідження бактеріоциногенності.

Бактеріоцини – речовини бактеріального походження, білкової природи, виділяються більшістю бактерій і характеризуються кілерною активністю відносно філогенетично споріднених мікроорганізмів.

В даний час основна увага приділяється дослідженню особливостей молекулярно-генетичної організації бактеріоцинів. Натомість, механізм індукції та виділення бактеріоцинів, основні способи їх впливу на чутливі клітини мікроорганізмів, а також значення даних кілерних факторів в екології бактерій залишаються малодослідженими. Тому зважаючи на значну перспективу застосування бактеріоцинів вивчення цих процесів є актуальним і потребує більш детального дослідження.

Значне розповсюдження мульти- та панрезистентних штамів мікроорганізмів значно обмежує застосування антибіотиків в медицині. Для подолання цього явища проводиться модифікація уже відомих антибіотиків і пошук принципово нових напрямків впливу на антибіотикорезистентні мікроорганізми. Одним із нових напрямків можна розглядати фармакоензимологію.

За допомогою даного напрямку досліджень було розроблено попередники лікарських препаратів («prodrugs») - кон'югати різних антибіотичних структур

					НУХТ БТЕК 02.02.10 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	7		
Розроб.		Ширай В.О.			Літ.	Арк.	Акрушів
Керівник		Стабніков В.П.				7	2
Консультант					Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Затверд.		Стабніков В.П.					

з'єднаних між собою ковалентним зв'язком. При потраплянні в організм людини цей зв'язок розщеплюється і кожний компонент взаємодіє з своєю мішенню. Проте вказані попередники не знайшли широкого використання в медичній практиці. Незважаючи на певні досягнуті успіхи, необхідно врахувати той факт, що лікувальний потенціал антибіотиків знижується і резистентність мікроорганізмів може зростати і далі. Це потребує пошуку нових, альтернативних антибактеріальних препаратів. Одними із таких альтернативних речовин можна розглядати бактеріоцини. Препарати на основі бактеріоцинів є перспективним напрямком дослідження оскільки ці речовини радикально відрізняються за властивостями та механізмами дії від антибіотиків. Відомо, що антибіотики не застосовуються в народному господарстві боротьби з збудниками різноманітних захворювань. На відміну від останніх, препарати на основі бактеріоцинів можуть знайти застосування, як в медицині, так і в різних сферах народного господарства.

Відомо також застосування бактеріоцинів в якості консервантів харчових продуктів, оскільки дані речовини не впливають на клітини еукаріотичних організмів. Яскравим представником бактеріоциноподібних речовин що активно застосовується в промисловості є «Нізін».

Таким чином бактеріоцини можна вважати перспективними сполуками, що можуть знайти широке застосування в багатьох сферах людського існування. [19]

Актуальність. Стійкість до антибіотиків у світі зростає з тривожними темпами, а саме відкриття нових антибіотиків є доволі довготривалим процесом. Можливості лікування інфекцій викликаних грамнегативними бактеріями обмежені, а результативність такого лікування знижується щодня. Тому актуальним є альтернатива антибіотикам мікробні білки – бактеріоцини.

Новизна. Нині на ринку України відсутній препарат на основі коліцину. Тому новизною є розробка лікарського засобу на основі коліцину, який буде альтернативою антибіотикам для лікування хвороби Крона.

РОЗДІЛ 1. ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРІОЦИНІВ

Бактеріоцини являють собою велику групу пептидів, що секретуються окремими бактеріями та володіють антимікробною активністю. На відміну від антибіотиків, що діють як антиметаболіти, бактеріоцини викликають пошкодження структур бактеріальної клітини і її подальшу загибель [2-7]. Такі пептиди продукуються більшістю видів бактерій, в той же час ця здатність носить штам-залежний характер [8]. Біоцидний ефект даних пептидів може проявлятися у відношенні не тільки штамів того самого виду, але і у представників інших видів та родів. Спектр антимікробної активності бактеріоцинів більше, ніж у антибіотиків, оскільки визначається наявністю рецепторів у бактерій-мішеней для їх адсорбції [9].

Класифікація бактеріоцинів заснована на сукупності характеристик: первинна структура молекули, молекулярна маса, наявність посттрансляційних модифікацій, фізико-хімічні властивості, спектр антимікробної активності, механізм антимікробної дії, рецептори клітин-мішеней і генетична характеристика [8, 9].

Виділяють три основні класи бактеріоцинів. Серед бактеріоцинів класу I найбільш вивченою групою є лантибіотики. Вони являють собою посттрансляційно-модифіковані антимікробні пептиди невеликого розміру (<5 кДа), що характеризуються незвичайними амінокислотами: лантионіном (Lan), α -метиллантионіном (MeLan), дегідроаланіном і дегідробутирином [10]. Під час утворення внутрішньомолекулярних зв'язків їх серинові і треонінові залишки дегідратують до дегідроаланіну та дегідробутирину відповідно [11]. Молекули I класу можуть бути згруповані по типу А або В відповідно за їх хімічною структурою та протимікробною дією [12]. Лантибіотики типу А зазвичай мають молярну масу 2-4 кДа і являють собою подовжені гвинтові пептиди з позитивним зарядом. Форма та заряд молекул типу А полегшують утворення пор в мембранах і деполіаризацію останніх у чутливих видів клітин бактерій,

					НУХТ БТЕК 02.02.10 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Ширай В.О.			РОЗДІЛ 1. Загальна характеристика бактеріоцинів	Літ.	Арк.	Арку шів
Керівник		Стабніков В.П.					9	12
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

що веде до їх лізису [13]. Лантибіотики типу В (2-3 кДа) - глобулярні пептиди з негативним або нейтральним зарядом. Ці пептиди проявляють антимікробну активність через лізис клітин і пригнічення основних бактеріальних ферментів [14]. Лантибіотики типу В підвищують проникність мембран і зменшують АТФ-залежне перенесення білка і АТФ-залежне поглинання кальцію в чутливих бактеріальних клітинах, що призводить до цитолізу [15].

Бактеріоцини класу II є невеликими (<10 кДа), термостійкими білками, що не містять лантионін. Вони можуть бути розділені на підгрупи - a, b, c, d, e - на основі амінокислотних послідовностей і функцій. Бактеріоцини підкласу IIa вбивають клітини-мішені шляхом збільшення проникності клітинної мембрани, що призводить до виходу цитоплазматичних компонентів через мембрану і до загибелі клітин. Бактеріоцини підкласу IIb діють як пороутворюючі пептиди [15]. Пептиди підкласу IIc володіють різними механізмами впливу на проникність мембрани і формування клітинної стінки у бактерій [15], а підкласу IId є лінійними, однопептидними молекулами з аналогічною антимікробною активністю.

Бактеріоцини класу III складаються з високомолекулярних (> 30 кДа) білків. Цей клас поділяється на підкласи IIIa і IIIb. Підклас IIIa - бактеріолізени - включає пептиди, які руйнують мембрани бактеріальних клітин, що призводить до лізису і подальшої загибелі клітин [16]. Підклас IIIb містить пептиди, які не порушують потенціал клітинної мембрани мішені. Загибель клітини мішені відбувається не шляхом цитолізу, а за рахунок відтоку АТФ [17].

Бактеріоцини можуть позначатися відповідно до видовою приналежністю бактерій-продуцентів: наприклад, *Escherichia coli* синтезує коліцини, *Enterococcus* spp. - ентероцини і т.д. У той же час багато молекул мають власні оригінальні назви: нізин, мерсацидін тощо.

1.1. Бактеріоцини грамнегативних бактерій

Бактеріоцини - це різновид синтезованих рибосомами антимікробних пептидів, що виробляються бактеріями, які можуть вбивати або інгібувати штами бактерій, але не завдають шкоди самим бактеріям-продуцентам. Бактеріоцини є одним із видів захисту у мікроорганізмів завдяки специфічним характеристикам, великому різноманіттю структури та функцій, природних ресурсів та стійкості до нагрівання. Багато бактеріоцинів вже ідентифікували та очистили, а також дозволили до застосування для збільшення тривалості зберігання їжі, лікування патогенних захворювань та терапії раку. Отже, бактеріоцини можуть стати потенційним кандидатом на заміну антибіотиків для знищення багатьох патогенних мікроорганізмів, стійких до антибіотиків [18].

Існує багато антибактеріальних речовин, що виробляються тваринами, рослинами, комахами та бактеріями, таких як перекис водню, жирні кислоти, органічні кислоти, етанол, антибіотики та бактеріоцини. Антимікробні пептиди, що виробляються бактеріями, класифікуються як бактеріоцини. Бактеріоцинів є велика кількість, вони мають велику різноманітність, і гени кодують синтезовані рибосоною антимікробні пептиди, які вбивають інші споріднені (вузький спектр) або неспоріднені (широкий спектр) мікроорганізми. Понад 99% бактерій можуть продукувати принаймні один бактеріоцин, більшість з яких не ідентифіковані [19].

Активність бактеріоцинів вважається успішною стратегією збереження популяції та зменшення кількості конкурентів для отримання більшої кількості поживних речовин. На відміну від більшості антибіотиків, які є вторинними метаболітами, бактеріоцини синтезуються рибосомами та є чутливі до протеаз, нешкідливі для людського організму та навколишнього середовища.

Велика кількість різноманітних за властивостями бактеріоцинів утворюється представниками сімейства ентеробактерій. Це численна група грамнегативних бактерій, факультативних анаеробів, які використовують для свого розвитку різноманітні органічні сполуки [20, 21].

Серед бактеріоцинів, утворених ентеробактеріями, найбільш повно вивчені коліцини з *E. coli*, клоаціни з *Enterobacter cloacae*. Поряд з коліцином виділені альвецини з *Hafnia alvei*, аероцини з *Aerobacter aerogenes*, марцесцини з *Serratia marcescens*.

В даний час серед бактеріоцинів, що продукуються ентеробактеріями, інтерес викликають лише клебоцини (рід *Klebsiella*), коліцини і бактеріоцини з *Serratia marcescens* (табл. 1.1) [22-25].

Таблиця 1.1

Бактеріоцини, утворені грамнегативними бактеріями

Назва	Продуцент
Галоцин Н-6	<i>Haloferax gibbonsii</i> 239 та група галобактерій
Клебоцини	рід <i>Klebsiella</i>
Коліцини, шигатоксин	<i>Escherichia coli</i>
Піоцини	рід <i>Pseudomonas</i>
Бактеріоцини 28b	<i>Serratia marcescens</i>
Бактеріоцини	<i>Rhizobium leguminosarum</i>
Пестицин	<i>Yersinia pestis</i>
Вібриоцин	<i>Vibrio cholerae</i>
Бактеріоцини	<i>Neisseria</i> sp.

Коліцини - це група речовин, що утворюються декількома родами сімейства ентеробактерій: *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*. Вони пригнічують розвиток штамів-продуцентів і інших ентеробактерій, руйнуються протеазами, термостійкий. Відомо 24 типи коліцинів, що розрізняються своїми фізико-хімічними властивостями, спектром дії [22].

Відомо, що *E. coli* продукує два типу бактеріоцинів, класифікованих за їх молекулярною масою - коліцини (25-80 кДа) і мікроцини (<10 кДа), а також механізмом дії. На відміну від мікроцинів синтез коліцинів регулюється за допомогою одного з механізмів репарації ДНК, таких як SOS-відповідь. Більшість біотипів *S. marcescens* (15 з 26 вивчених штамів) продукують бактеріоцин, активний проти *E. coli*. Доведено, що цей бактеріоцин аналогічний бактеріоцину 28b, виділеного раніше з *S. marcescens*. Обидва бактеріоцини мають однакову молекулярну масу, рівну 45 кДа [21].

Клебоцини - бактеріоцини з бактерій роду *Klebsiella* - мають широкий антибактеріальний спектр дії. Вони пригнічують розвиток представників ентеробактерій (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Shigella*, *Proteus*, *Escherichia*) [23], крім того, до них виявилися чутливими бактерії родів *Erwinia* і *Pseudomonas*. Однак культури *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* резистентні до цих бактеріоцинів. Встановлено, що бактеріоцини продукують штами серед *K. pneumoniae* - 10%, серед *K. ozaenae* - 7%. Клебоцини чутливі до протеолітичних ферментам, молекулярна маса яких дорівнює 30-50 кДа. Встановлено захисну дію клебоцинів на насіння кукурудзи та томатів при їх контамінації.

До бактеріоцинів, що виробляються бактеріями родини ентеробактерій, відносяться пестицини з *Yersinia pestis*. Для *Vibrio cholerae* описано утворення вібриоцина. Ще два роди грамнегативних бактерій - *Pseudomonas* та *Rhizobium* утворюють бактеріоцини. Представники першого роду утворюють піоцини. Відомо більше 35 груп біологічно активних сполук у видів роду *Pseudomonas*, серед них група піоцинів. Але тільки одна речовина, виділена з *P. pyocyaneum*, знайшла застосування в онкологічній практиці - неоцид, який за своїми властивостями є бактеріоциноподібною сполукою. Є коротка інформація про біологічну активність *in vitro* бактеріоцинів з бактерій роду *Neisseria*, що відноситься до грамнегативних аеробних хемогетеротрофам [22].

Описано утворення бактеріоцинів *Rhizobium leguminosarum*, бульбочкових бактерій гороху. Утворена речовина активна проти бактерій цього ж виду, але не діє на *Azotobacter* або *Azospirillum*. Речовина чутлива до протеаз, величина активності речовини залежить від складу середовища та температури культивування продуцента [26].

Бактеріоцин галоцин Н-6 продукується галофільною бактерією *Haloferax gibbonsii* 239, що відноситься до групи грамнегативних бактерій. Бактеріоцин утворюється при розвитку бактерій на різних за складом середовищах. На сьогодні даний бактеріоцин виділений і очищений, його молекулярна маса становить 32 кДа, він є термостійким та чутливим до ряду протеаз.

Відзначається, що з усіх виділених бактеріоцинів грамнегативних бактерій в медицині знайшли застосування близько 3-5%, що зумовлено високою токсичністю цих речовин. Для медичної практики були потрібні в якості продуцентів бактеріоцинів або бактеріоциноподібних субстанцій непатогенні та нетоксичні штами мікроорганізмів.

1.2. Бактеріоцини грампозитивних бактерій

Утворення бактеріоцинів виявлено у наступних родів грампозитивних бактерій: *Bacillus*, *Clostridium*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Sarcina*, а також у *Streptomyces*, які синтезують бактеріоциноподібні сполуки [27].

Широкий спектр бактеріоцинів утворюють молочнокислі бактерії: курвацин, діацетин, лактококцин, ацидоцин, лактоцин, плантацин, плантаріцин, тощо (табл. 1.2). Бактеріоцини з молочнокислих бактерій поділяють на дві групи.

Представники першої групи характеризуються вузьким спектром антибактеріальної дії - викликають загибель організмів, близьких до організму-продуцента. У цю групу входять лактоцин В і F-27, аміловорин, педіоцин N5P, термофілін А, курвацин А, аміловорин L471, ентерококцин.

Бактеріоцини, що відносяться до другої групи, пригнічують ріст багатьох видів грампозитивних мікроорганізмів, у тому числі *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium sporogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Pediococcus acidilactici*, *Bacillus* spp., *Enterococcus faecalis* [28]. Наведені бактерії викликають псування харчових продуктів, серед них є і патогенні види. До Бактеріоцинів другої групи відносяться: педіоцин А, ацидоцин В, діацетин В-1, курвацин FS47, лактіцин 3147, плантаріцин С, ентерококцини, саліварцин, низин, саркацин 674, мутацин. Показано, що велика частина цих бактеріоцинів не токсична і не є імуногенною.

Ряд властивостей бактеріоцинів (інактивація протеїназами і стійкість до нагрівання) підтверджують їх білкову або пептидну природу. Вивчення умов

утворення бактеріоцинів представниками деяких молочнокислих бактерій *Lactococcus lactis*, *Pediococcus acidilactici*, *Leuconostoc carnosum*, *Leuconostoc mesenteroides* показало, що умови, які сприяють накопиченню клітинної маси, забезпечують найбільшу продукцію цих сполук.

На біосинтез бактеріоцинів впливають умови культивування продуцента: склад поживного середовища, рН, температура, а також час інкубації продуцента [29-35].

Штам *Lactobacillus plantarum* продукує плантарицин, що володіє широким спектром дії, максимальний біосинтез якого відбувається на м'ясному бульйоні з 0,6% глюкози [26]. Бактеріоцин термостабільний, має молекулярну масу 3500 Да, встановлена його амінокислотна послідовність.

Казеїцин, виділений з *Lactobacillus caei*, утворюється при зростанні продуцента як в природних, так і в синтетичних середовищах [27].

Ряд бактеріоцинів, що продукуються молочнокислими бактеріями, вивчений досить докладно. Так, з *Lactococcus lactis* виділено і очищено бактеріоцини діацетин В-1, встановлена його молекулярна маса, рівна 4300 Да, визначена первинна структура, що включає 37 амінокислотних залишків [27]. Бактеріоцини (в тому числі діацетин В-1), утворені 14 штамми *L. lactis*, виділеними з молока і молочних продуктів, володіли широким спектром дії, вони інгібували зростання як *Listeria innocua*, так і інших видів лістерій, а також *P. acidilactici*, *S. aureus*, *L. plantarum*. Мутацін з *Streptococcus mutans* термостабільний, чутливий до протеолітичних ферментів активний проти ряду грампозитивних бактерій, молекулярна маса становить 3500 Да [28].

Бактеріоцини аміловорин 471 утворюється *Lactobacillus amylovorus* DCE 471. Вивчено умови культивування продуцента. Отриманий препарат може бути використаний в якості біоконсерванту харчових продуктів і кормів [29].

Лістерії, що розвиваються в харчових продуктах і призводять їх до псування, придушуються наступними бактеріоцинами: курвацином FS47, діацетином В-1, педіоцином, сакацином, ентерококцином. Здатність до

пригнічення росту *Listeria* виявлена у ряду молочнокислих бактерій, що утворюють бактеріоцини: *Lactobacillus hetveticus*, *L. sake*, *Leuconostoc gelidum*. Інгібуючий ефект визначали в бульйоні, в стерильній їжі, в процесі приготування сосисок [30].

Було виділено бактеріоціноподібну речовину з ентерококу. Вона мала широкий спектр антимікробної дії і була нетоксична при введенні тваринам. Показано, що ентероцини (бактеріоцини з ентерококів) пригнічують розвиток інфекції при зараженні морських свинок *Clostridium septicum* [2].

Ентероцин А виділений з *Enterococcus faecium* містить 47 амінокислотних залишків, включаючи 4 залишки цистеїну, що утворює дисульфідні містки, молекулярна маса становить 4,289 кДа. За амінокислотою послідовністю ентероцин А має велику схожість з бактеріоцинами молочнокислих бактерій, наприклад, нізином [9].

Ентероцин 4 продукується *Enterococcus faecalis* INIA4, розроблена проста методика його виділення. Він активний проти грампозитивних бактерій [8].

Бактеріоцини утворюються і іншими видами ентерококів. *E. faecalis* S-48 утворює бактеріоцини з молекулярною масою 80 кДа. Речовина чутлива до протеаз, має вузький спектр дії - пригнічує тільки *E. faecalis* [9].

П'ять бактеріоцинів ентерококового походження придушували зростання штамів *Lactobacillus buchneri*, що виробляють гістамін при виробництві сиру. Це дозволило застосовувати штами *E. faecalis*, які продукують ці бактеріоцини, в заквасках при виробництві сиру, що запобігало розвитку *L. buchneri* і утворення гістаміну.

Бактеріоцини, утворені *E. faecalis* і *E. hirae*, інгібують багато видів лістерій і клостридій, що викликають псування продуктів харчування. Обговорюється можливість використання препаратів бактеріоцинів або їх продуцентів при виробництві молочних продуктів. Отримано позитивні результати застосування культур ентерококів при виробництві сиру [9].

Перспективним є використання ряду бактеріоцинів, що продукуються групою молочнокислих бактерій, в харчовій промисловості. Продуценти цих бактеріоцинів використовуються в якості заквасок культури при різних харчових виробництвах. Утворені бактеріоцини забезпечують домінування потрібної мікрофлори і придушення сторонньої мікрофлори, що забезпечує безпечно протікання мікробіологічних процесів. Наприклад, при виробництві сухої ковбаси як заквасок культури використовується *Lactobacillus curvatus*, який утворює курвацин, який пригнічує ріст близькоспоріднених лактобацил і умовно-патогенних бактерій і забезпечує цим безпечно протікання біохімічних процесів при дозріванні сухої ковбаси [20].

При виробництві ковбас сорти салямі (Італія) на різних стадіях дозрівання ковбас було виділено ряд молочнокислих бактерій, таких, як *Lactobacillus plantarum* і *L. curvatus*, *Leuconostoc* sp., що утворюють бактеріоциноподібні сполуки, які пригнічують ріст сторонньої мікрофлори [18].

Lactobacillus plantarum, продуцент бактеріоцинів, використовується в якості заквасок культури при ферментації зелених олив іспанського сорту [19].

У процесі отримання закваски для виготовлення йогурту з новими характеристиками використовується *Streptococcus salivarius*, який утворює бактеріоцини. Описано процес отримання закваски на основі зазначеної бактерії в поєднанні *Lactobacillus delbrueckii* [20].

Для запобігання утворенню гістаміну при виробництві сиру в закваску додавали *Lactococcus lactis* і *E. faecalis*, які утворювали бактеріоцини, що пригнічують ріст штамів, що виділяють гістамін. Останні виявилися чутливими до нізину і п'яти бактеріоцинів ентерококового походження [8].

Розроблено простий і економічний спосіб приготування йогурту, що містить бактеріоцин РА-1, утворений *Pediococcus acidilactici* в поживному середовищі на основі молока. В отриманій культуральної рідини, підданій тепловій обробці, вирощують йогуртову стартову культуру до отримання

йогурту. Останній потім висушується ліофілізацією або розпиленням (до порошку) і використовується в різних продуктах харчування [15].

Вважають, що молочнокислі бактерії з родів *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, що утворюють антибактеріальні речовини, зокрема бактеріоцини, можуть використовуватися для консервації їжі [25].

З молочнокислих бактерій виділено кілька бактеріоцинів, які є лантибіотиками. Лантибіотіки - це бактеріальні поліпептиди, до складу яких входять тіоефірні амінокислоти, як лантионін і метиллантионін. Ці речовини мають широкий антимікробний спектр дії. По механізму біосинтезу лантибіотіки можна розділити на дві групи: нізини і субтилін, що продукується *B. subtilis*, які синтезуються на рибосомах, і лантибіотики, біосинтез яких відбувається не на рибосомах. Механізм біологічної дії лантибіотиків, в тому числі нізина, пов'язаний з порушенням проникності бактеріальних цитоплазматичних мембран. Порушення мембранного потенціалу ініціюється утворенням пір, через які проходять молекули лантибіотиків [26].

До лантибіотиків, що синтезуються молочнокислими бактеріями, відносяться: лактицин 481, стрептококцин AFF22, салівариміцин А, варіацин, лактицин 3147, бактеріоцини з *Streptococcus salivarius* SBT1277, нізин [27]. Лактицин 481, стрептококцин AFF22, салівариміцин А, варіацин входять в одну структурну групу лантибіотиків. Вивчено структуру лактицина 481, він містить 27 залишків амінокислот, в т.ч. дегідробутирину, лантионіну і метиллантионіну [28].

Новий штам *S. salivarius* SBT1277, продукує бактеріоцини, які є чутливими до протеаз і відрізняються високою термостабільністю, володіє широким спектром антагоністичної дії, пригнічує ріст *E. coli*, *Bacillus* spp., *S. aureus*, ряд видів молочнокислих бактерій. Зазначений штам використовується в складі закваски для отримання йогурту [25].

Лактицин 3147 утворюється *L. lactis* 3147 та має широкий антимікробний спектр дії (подібний з нізину), термостабільний. Штам-продуцент виділений з

кефірних зерен і застосовується у виробництві сиру чеддер. Використання генетичних методів допомагає знайти потрібні рішення для виробництва. Так, плазмиду, несучу генетичні детермінанти лактицину 3147, ввели в виробничий заквасочний штам *L. lactis* subsp. *cremoris* 4268. Отриманий транскон'югант використовували в заквасці при виробленні сиру чеддер. Під час шестимісячного дозрівання сиру вміст бактеріоцинів в сирній масі знаходився на постійному рівні. Отже, такі закваски можуть служити для контролю розвитку мікрофлори в продуктах [25].

Нізін - один з найбільш вивчених бактеріоцинів, його називають також поліпептидним антибіотиком, він відноситься до групи лантибіотиків і утворюється певними штамми *L. lactis*. Це мембранотропний поліпептид, що пригнічує ріст бактерій шляхом порушення мембранного потенціалу. Вивчення механізму дії нізину призвело до висновку, що мішенню для його дії служить саме цитоплазматична мембрана.

З культуральної рідини *L. lactis* 10-1 виділили і очистили до гомогенного стану пептидний антибіотик (або бактеріоцин). Його ідентифікували як похідне нізину А - нізін Z. Він пригнічує ріст різних грампозитивних бактерій, але не штам продуцента нізина А. Молекулярна маса 3337,9 Да, його структура відрізняється від нізину А однією амінокислотою заміною (гістидин на аспарагін). Речовина є лантибіотиком [26].

Лантибіотики продукуються також іншими представниками грампозитивних бактерій, наприклад, представниками роду мікрококів.

З роду стафілококів виділено ряд бактеріоцинів: галідермін з *Staphylococcus gallinarum* і епідермін з *S. epidermidis*. Для продуцентів зазначених лантибіотиків проведена оптимізація процесу культивування, розроблений технологічний процес отримання і виділення зазначених речовин. Описано виділення стафілококцину, ідентичного епідерміну, описаного вище.

З *S. epidermidis* А-1262 виділено бактеріоцин стафілококцин А, з якого був створений терапевтичний препарат, активний відносно ряду мікроорганізмів - *S.*

aureus, *S. pyogenes* тощо. Це поліпептидно-полісахаридний комплекс з молекулярною масою 10000-30000 Да [19].

Узагальнену характеристику бактеріоцинів наведено в *табл 1.2*

Таблиця 1.2

Загальна характеристика бактеріоцинів грампозитивних та грамнегативних бактерій

Продуцент	Продукт	За Грамом	Молекулярна маса бактеріоцину	Джерело
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Плантаріцин	Грампозитивні	3500 Да	[26]
<i>Enterococcus faecium</i>	Ентероцин А	Грампозитивні	4,289 кДа	[9]
<i>Haloferax gibbonsii</i> 239	Галоцин Н-6	Грамнегативні	32 кДа	[24]
<i>S. mercescens</i>	Бактеріоцин, активний проти <i>E. Coli</i>	Грамнегативні	45 кДа	[21]
<i>Lactococcus lactis</i>	Діацетин В-1	Грамнегативні	4300 Да	[27]

РОЗДІЛ 2. ВЛАСТИВОСТІ ТА МЕХАНІЗМ ДІЇ БАКТЕРІОЦИНІВ

2.1. Механізми дії бактеріоцинів

З огляду на велику різноманітність хімічної будови бактеріоцинів, можна припустити, що вони впливають на життєво важливі функції чутливих клітин, але більшість діють, утворюючи в мембрані пори або канали, як порушення мембранного потенціалу чутливих клітин [31, 32].

Механізм біологічної дії ряду бактеріоцинів пов'язаний з порушенням проникності цитоплазматичних мембран. Бактеріоцини неоднорідні за механізмом дії. Ряд авторів вважає, що механізм дії бактеріоцинів з лактококков - це утворення пор в цитоплазматичній мембрані чутливих клітин. *Lactococcus lactis* утворює два класи бактеріоцинів: лантибіотіки (нізин тощо), пептиди, що містять незвичайні амінокислоти (лантионін тощо), I клас терmostійких коротких поліпептидів, що не містять лантионіна. Різниця в механізмі дії цих двох класів лактококових бактеріоцинів полягає в тому, що механізм дії нізину не припускав рецептора, нізин вбудовується у внутрішню мембрану, утворюючи іонні канали або пори. Нелантибіотичні бактеріоцини - діплококцин, лактострепцин і лактококцин - утворюють пори, які взаємодіють зі специфічним рецептором [33].

Механізм дії лактококцину G, виділеного з *L. lactis*, пов'язаний з тим, що цей бактеріоцини також порушують проникність бактеріальних цитоплазматичних мембран. Автори роботи відзначають, що ці пептиди є пороутворюючими токсинами, які створюють канали в мембрані цитоплазми [34].

Аніонні ліпіди цитоплазматичної мембрани є основними рецепторами бактеріоцинів молочнокислих бактерій для стимуляції пороутворення. Бактеріоцини I класу можуть викликати формування пір за типом ліноподібної

					НУХТ БТЕК 02.02.10 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Ширай В.О.				РОЗДІЛ 2. Властивості та механізм дії бактеріоцинів	Літ.	Арк.	Акрушів
Керівник	Стабніков В.П.						21	4
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							

моделі, в той час як бактеріоцини II класу здатні функціонувати, створюючи пори, за допомогою яких пептиди розташовуються паралельно мембранній поверхні і впливають на структуру мембран [35].

Найбільш добре вивчений механізм дії бактеріоцинів на прикладі нізину (Рис 2.1).

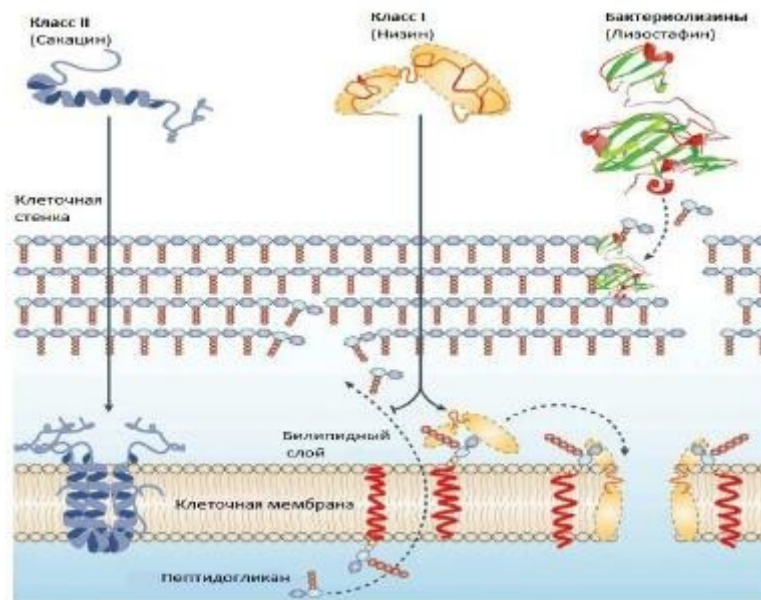


Рис. 2.1. Механізм дії нізину

При вивченні дії нізину стало зрозуміло, що частина С-кінця молекули деполаризує цитоплазматичну мембрану, що веде до миттєвої зупинки синтезу компонентів клітинної стінки і всіх біосинтетичних процесів в клітині. Основний характер дії нізину - це взаємодія з негативно зарядженими мембранами (біліпідний шар), переважно з мембранами, що містять аніонні ліпіди. Грампозитивні бактерії мають більш високі концентрації аніонного ліпиду в їх цитоплазматичній мембрані в порівнянні з грамнегативними. Бактеріоцин спочатку пов'язує його С-кінець з аніонними ліпідами, після чого N-кінець опускається в ліпід мембрани і пептид бере паралельне положення на мембранній поверхні. І в кінцевому рахунку, цілий пептид має можливість переміститися по всій довжині пори [36].

Нізін пригнічує синтез муреїну клітинної стінки. В результаті дії антибіотика відбувається накопичення проміжного ліпиду, з яким нізін утворює

міцний комплекс, що і призводить до зупинки подальшого синтезу пептидоглікану бактеріальної стінки. Нізин може викликати лізис клітин внаслідок незворотньої деструкції клітинної мембрани, яка регулює осмотичний тиск клітини. Він змінює поверхневий натяг мембрани цитоплазми, що призводить до порушення клітинної проникності і, як наслідок цього, до бактеріального лізису.

Узагальнено механізми дії бактеріоцинів грамнегативних та грампозитивних бактерій наведено на *рис 2.2*. Механізм дії бактеріоцинів грампозитивних бактерій (а): нізин і деякі інші бактеріоцини класу I інгібують синтез пептидоглікану, зв'язуючись з ліпідом II, та утворюють пори. Бактеріоцини класу II, такі як лактококцин А, зв'язуються з пороутворюючою рецепторною манозо-фосфотрансферазною системою (Man-PTS). Механізм дії бактеріоцинів грамнегативних бактерій (б): мікроцин В17 (MccB17) інгібує ДНК-гіразу, MccJ25 інгібує РНК-полімеразу, а MccC7-C51 інгібує аспартил-тРНК-синтетазу.

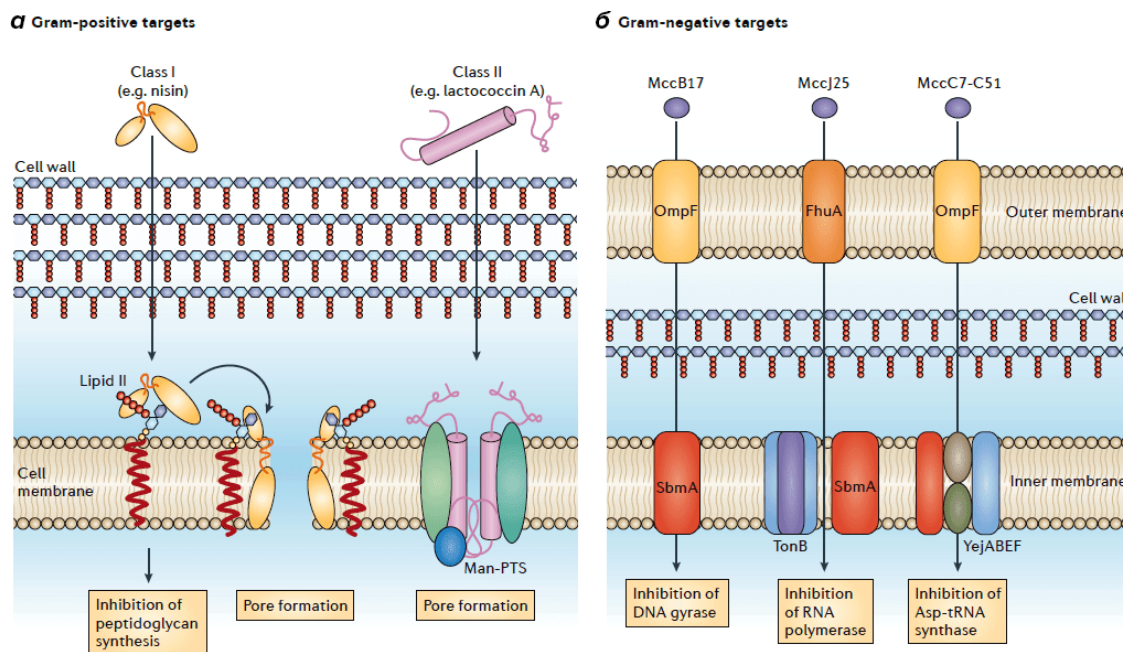


Рис. 2.2. Механізми дії бактеріоцинів грамнегативних та грампозитивних бактерій

2.2. Механізми стійкості до бактеріоцинів

При розгляді екологічної ролі бактеріоцинів відзначають, що бактеріоцини грають велику роль в природних бактеріальних спільнотах. Синтез цих речовин має значення для конкуренції всередині популяції і між ними. Обговорюються питання еволюції бактеріоцинів - різноманітність структур цих речовин, як еволюційна дивергенція, пов'язана з різноманітністю конкуруючих між собою видів [37].

У природних умовах бактеріоциногенія може бути одним з факторів, що впливає на формування мікробного ценозу. Тому великий інтерес представляє з'ясування значення цього явища для розвитку популяції. У бактеріоцино продукуючих популяцій сумарна захисна активність проявляється в придушенні розвитку інших бактерій, що володіють подібними харчовими потребами (споріднені види мікроорганізмів). Це придушення забезпечується бактеріоцинами, який продукують окремі клітини цієї популяції. Ці клітини гинуть, але інші клітини популяції не чутливі до бактеріоцину, який витісняє інші мікроорганізми, чутливі до даної речовини. Таким чином, бактеріоциногенні бактерії володіють важливою селективною перевагою в умовах мікробних асоціацій, природно створених в процесі еволюції.

Необхідно відзначити значення мікробного ценозу в інфекційній патології. Здатність ряду бактерій синтезувати бактеріоцини або інші антимікробні речовини дає цим штамам виборче право при розвитку. Володіючи такою перевагою, патогенні бактерії, наприклад, *Yersinia pestis* і *Vibrio cholerae* можуть пригнічувати нормальну мікрофлору і поширюватися в кишечнику людини і тварин. Можливо ці бактерії можуть виділяти токсичні бактеріоцини.[37]

Збільшення співвідношення штамів *E. coli* TGI (pColap) і *E. coli* S5 Sm на користь останнього відбувається до тих пір, поки в середовищі культивування не накопичується достатня кількість коліцинових молекул для бактерицидної дії коліцину E1 штаму *E. coli* TGI (pColap). Крім того, багате середовище сприяє накопиченню коліцинів [44].

Serratia є продуцентом продигіозину - пігменту рожевого, червоного або фуксинового кольору, проте утворення пігменту притаманне не всім представникам цього роду, воно може варіювати в залежності від умов культивування, зокрема від складу живильного середовища. Продигіозин розчинний в спирті, в хлороформі, в бензині і не розчинний у воді [43].

Біосинтез продигіозину бактеріями *Serratia marcescens* залежить від типу джерела вуглецю і енергії гліцерину, глюкози і ацетату в поживних середовищах [43]. Найбільший приріст біомаси спостерігається на гліцерин-пептонному середовищі: відносна щільність культури становила в середньому 2-2,5 опт. од., білок - 0,6 - 0,8 мг/мл, продигіозин - 0,3-0,4 мкг/мл. Пігментація культур також залежить від умови освітлення. Максимальний вміст продигіозину в культурі, що росте в темряві, досягається на 3-4 добу і зберігається на цьому рівні протягом усього періоду культивування (7-9 доби), культура при цьому має інтенсивно червоний колір.

На кафедрі біотехнології університету Любляни на основі добре відомого пробіотичного штаму *E. coli* Nissle 1917 [45] був створений генномодифікований штам *E. coli* ŽP (кілерний донор) шляхом введення colE7-гена на кон'югативній плазміді pOX38a - похідною F-плазміді. З метою захисту *E. coli* Nissle 1917 від летальної дії ДНКазі ColE7 в його хромосому вставлений immE7-ген. Було зроблено припущення, що плазміда pOX38a переносить colE7 в клітину реципієнта, де починається його транскрипція та синтез бактеріоцинів. В якості контролю кон'югативного перенесення використовували штам *E. coli* N4i без colE7 на pOX38a (контрольний донор). Таким чином, для доказу кон'югаційно-опосередкованого механізму дії бактеріоцинів була запропоновано

антимікробну бактеріальну систему «kill»-«anti-kill». Виробництво коліцину ColE7 сконструйованим штамом *E. coli* ŽP було доведено за допомогою чутливого штаму *E. coli* DH5α згідно. Вихідний штам *E. coli* Nissle 1917, який продукує два мікроцини - H47 і M, викликав лише слабкий лізис індикаторного штаму, тоді як навколо колонії штаму *E. coli* ŽP зона лізису *E. coli* DH5α була більш виражена за рахунок дії коліцинів. Культивування здійснювали на середовищі LB, температура культивування 37 °С, тривалість – 22 год. Концентрація клітин в кінці культивування становила 10⁸ КУО/мл. Запропонована система може забезпечити більшу конкурентоспроможність штаму в змішаній мікробній популяції, де присутні продуценти декількох бактеріоцинів, в різних екологічних нішах. Стабільність плазмиди в штамі *E. coli* ŽP контролювали протягом 6 місяців на агаризованому середовищі, що містить хлорамфенікол. Втрати або перебудова плазмідів, що впливають на експресію бактеріоцинів, не спостерігались. Коліцинпродукуючі штами також синтезують специфічний білок імунітету до свого бактеріоцину, який захищає клітину від летальних ефектів білка-токсину [45].

Також відомі дослідження, де рекомбінантні пробіотики були побудовані на основі штамів *E. coli*, які продукують коліцини F_Y, і було перевірено їх терапевтичний потенціал в відношенні *Y. enterocolitica* аналізували *in vitro* та *in vivo*. У природних умовах активність коліцину F_Y також була вивчена з використанням ізогенного і рекомбінантного коліцинів F_Y [46].

Штам Ec1145 часто виділяли у здорових людей. На додаток до Ec1127 і Ec1145, два *E. coli* із відомими пробіотичними властивостями (EcH22 та EcColinfant) були також використані у дослідженні. Всі чотири *E. coli* були трансформовані для стабільного підтримання рекомбінантної коліциногенної плазмиди, а потім перевірені на здатність колонізувати шлунково-кишковий тракт. Культивування продуцентів здійснювали на середовищі LB, температура культивування 37 °С, тривалість – 18 год. Щільність культури становила 10⁹ КУО/мл.

Показано, що *E. coli*, яка продукує коліцин F_Y, значно зменшувала кількість збудника *Y. enterocolitica* через 48 годин спільного культивування. За конкуренції, коліцини F_Y також змогли зменшити число патогенних *Y. enterocolitica* при спільному культивуванні. Однак виробництво коліцинів F_Y з підвищеною активністю інгібування тестованих штамів *E. coli* було повністю або майже повністю втрачено. У присутності коліцину F_Y, спостерігалась загибель збудника для штамів EcH22, Ec1127 і Ec1145, але не для EcColinfant, де титр *Y. enterocolitica* зберігався на виявлених раніше рівнях [47].

Також відоме культивування *E. coli* ING як продуценту коліцину, штами вирощували в LB бульйоні. В середині фази зростання мітоміцину C було додано індуктор для коліцин індуктора в концентраціях: 0,10 мкг/л, 0,15 мкг/мл, 0,20 мкг/мл, 0,25 мкг/мл, 0,30 мкг/мл, 0,40 мкг/мл і 0,50 мкг/мл для. Всі колби інкубували ще 3 годин в 37° С до досягнення 2x10⁵ КУО/мл, ці було перенесені в агарові тарілки LB і вирощували протягом 12 год при температурі 37° С [48].

Serratia marcescens може вирощуватись на синтетичному середовищі для синтезу пігменту. Після вивчення впливу амінокислот, солей, цукрів і вітамінів на продукцію пігменту було встановлено, що для продукції необхідний гліцин. Продукцію пігменту стимулювали глютамінат натрію, сульфат калію, хлористий калій і маніт. Рідке синтетичне середовище містило 0,5% гліцину, 0,2% глютамінату натрію, 0,1% дріжджового екстракту, 2% сульфату калію і 1% маніту [49].

Ще одним представником бактеріоцинів грамнегативних бактерій є клебоцин, продуцентом якого є *Klebsiella pneumoniae*. Культури вирощували на соєвому бульйоні: 3,3 мл соєвого бульйону триптикази і 1 мл мітоміцину C (0,5 мкг/мл) та інкубували при 37° С протягом 5 годин з періодичним струшуванням. Клітини вбивали додаванням 0,25 мл хлороформу. Суспензію центрифугували при 3000 об / хв протягом 10 хвилин у холодній центрифугі. Супернатант, що містить відповідні клебоцини, розподіляли у флакони з гвинтовою кришкою і зберігали при -20° С [50].

Відомо дослідження, в якому показано, що гарним середовищем є агаризоване середовище, доповнене 5% гліцерином. Таке середовище також використовувалось для виявлення ізолятів, що продукують клебоцин [51].

Злиття SOS-промотору оперону коліцину E9 (ColE9p) з безпромоторним зеленим флуоресцентним репортерним геном (gfpmut2). Ми спостерігали, що ColE9p-gfpmut2 індукується MMC, що підтвердило, що ColE9p-gfpmut2 чутливий до агентів, що викликають реакцію SOS. Дані свідчать про те, що репортерна система на основі ColE9p-gfpmut2 підходить для моніторингу синтезу ColE9, індукованого агентами, що викликають реакцію SOS, включаючи антибіотики. Використання експресії зеленого флуоресцентного білка з ColE9p-gfpmut2 як показника синтезу ColE9, вперше дослідили індукуючу дію антибіотика цефалексину на синтез ColE9. Дані продемонстрували, що цефалексин має потенціал індукувати синтез ColE9 з клітин-господарів E. coli JM83, хоча рівень цієї індукції є дуже низьким, отже для його виявлення потрібен високочутливий метод [52].

Етерологічне вироблення коліцину V було отримано в LAB за допомогою загального секреторного шляху білка після заміни пептиду лідера коліцину V сигнальним пептидом бактеріоцинів дивергіцину A. Однак ця стратегія корисна лише для штамів, що експресують двокомпонентний регулятор NisRK, оскільки химерні гени, що кодують лідер злиття лактококцину A-proColicin V, перебувають під контролем індукцйбельного промотору *nisA* (P_{nisA}), який, крім того, вимагає субінгібуючих рівнів нізину для експресії коліцину V у непродукуючих штамів [53].

Перспективною платформою є безклітинний синтез білка (CFPS) є для гнучкої експресії та скринінгу ферментів. CFPS був використаний для побудови бібліотек антимікробних пептидів, характеристики ентероцинів L50A та L50B та ідентифікації продукції коліцину E1 із плазмідної ДНК Col E1. CFPS також застосовували для отримання токсичних білків, таких як онкотерапевтична онконаза. У порівнянні із системами живих клітин, CFPS є більш гнучкою та

керованою експериментальною платформою, що забезпечує кілька важливих переваг для дослідників). По-перше, відкрите реакційне середовище забезпечує безпрецедентний рівень контролю та свободу конструкції для нещодавно синтезованого білка. По-друге, безклітинна система може усунути потребу у трудомістких етапах клонування, використовуючи лінійні шаблони ДНК, генеровані в результаті полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). По-третє, безклітинні системи можуть виробляти токсичні білки без обмежень життєздатності клітин. Бактеріальний екстракт дає більший вихід білка, ніж екстракт еукаріотичних клітин, але має обмеження у виробництві активних та розчинних препаратів для ссавців, таких як антитіла. Для усунення цих обмежень, використовуючи переваги бактеріальних вільних від клітин систем, були розроблені додаткові бактеріальні технології CFPS, які посилюють згортання білка та вводять посттрансляційні модифікації, тим самим дозволяючи синтезувати активні терапевтичні білки.

Екстракт клітин *кишкової палички* готували із штаму BL21 (DE3) Star із застосуванням високопродуктивного методу ультразвукової обробки. Культуру протягом ночі розбавляли 1000 разів 1,0 л середовища 2xYTPG (16 г / л триптон, 10 г / л екстракту дріжджів, 5 г / л NaCl, 7 г / л K_2HPO_4 , 3 г / л KH_2PO_4 і 18 г / л глюкози; рН доводиться до 7,2 за допомогою KOH) у 2,5 л колбі Tunair. Клітини вирощували до каламутності при 600 нм ($OD_{600\text{ нм}}$) від 0,5 до 1,0 л 2xYTPG середовищ при температурі 37 ° C 220 оборотів в хвилину, і виробництво полімерази T7 РНК індукували додаванням 1 мМ ізопропіл β -D-1-тіогалактопіранозиду. Загальна концентрація білка в екстрактах становила приблизно 50 мг/мл [54].

Штам *Pediococcus acidilactici* DSM 10313 є продуцентом бактеріоцину та застосовується для забезпечення мікробної безпеки, а також в якості додаткової культури ферментованих харчових продуктів. Культивування проводять в умовах, які є оптимальними для росту і біосинтезу. Утворені бактеріоцини

забезпечують зменшення концентрації патогенних організмів, таких як *Listeria* spp. [55].

Pediococcus pentosaceus LBM 18 показав потенціал як продуцент антибактеріальної та протигрибкової бактеріоциноподібної інгібуючої речовини (BLIS). BLIS пригнічував ріст бактерій, що належать до родів *Lactobacillus*, *Enterococcus* та *Listeria* з більш високою активністю, ніж Нісаплін. Її культивували в комерційному середовищі MPC при температурі 30° С протягом 10 годин в інкубаторі без перемішування. *Lactobacillus sakei* ATCC 15521, *Enterococcus faecium* 2052, *Listeria innocua* NCTC 11288 та *Listeria seeligeri* NCTC 11289 використовувались як індикаторні штами. *L. sakei* та *E. faecium* культивували протягом ночі при 37 ° С у середовищі MRS, тоді як штами *Listeria* у середовищі Brain Heart Infusion (BHI) за тих самих умов [56].

Pediococcus pentosaceus M35, виробляє бактеріоцин класу Іа. Він чутливий до пронази-Е, альфа-хімотрипсину та протеїнази К, але не до трипсину і витримує термічні обробки до 121 °С протягом 30 хв. Бактеріоцин екстрагували з супернатанту культури за допомогою катіонообмінної колонки SP-Sepharose, знесолювали і очищали на колонці C18 Sep-Pack і далі очищали рідинною хроматографією з зворотним фазовим рівнем високого тиску. Ця процедура дозволила відновити 10% бактеріоцину, присутнього в супернатанті культури з чистотою вище 99%. Виділений бактеріоцин мав молекулярну масу 4518,75 Да, як визначено за допомогою мас-спектрометрії, значення рН 8,3 і позитивний чистий заряд (+3). Встановлено, що амінокислотна послідовність дивергіцину M35 складається з 43 амінокислот з чотирма залишками цистеїну (Cys10, 15, 25, 43) і демонструє 80,5% гомологію з диверцином V41 (80,5%) та 80,0% з баварицином MN. Виявляє потужну антилістерильну активність, особливо проти *Listeria monocytogenes*, а також був активним проти корінебактерій, але не проти штамів *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bifidobacteria* та *Escherichia*. Синтез розпочинається в пізній експоненціальній фазі і досяє максимальної

активності 65000 АЕ/мл на ранній стаціонарній фазі. Початковий рН бульйону, Твін 80 та ацетат не впливали на ріст та вироблення дивергіцину [57].

Бактеріоцин пісцикоцин CS526 був інактивованим протеолітичними ферментами, був стабільним при 100 ° С протягом 30 хв, мав рН від 2 до 8 та був активним щодо ентерококів, лістерій, педіококів та лейконостоків. N-кінцевою послідовністю був YGNGL, а не мотив консенсусу YGNGV, поширений у бактеріоцинів класу IIa (альтернативні залишки підкреслені). Молекулярна маса пісцикоцину CS526, який мав бактерицидний спосіб дії, становила приблизно 4430 Да [58].

Виробництво галоцину (SH10) надзвичайно галофільним археоном *Natrinema* sp. BTSH10, виділений із соляного озера Каньякумарі, штат Тамілнад, Індія, та оптимізація середовища для посиленого виробництва галоцину. Було встановлено, що оптимальними умовами для максимального продукування галоцину були 42 ° С, рН 8,0 та 104 год інкубації при 200 об/хв з 2% (об/об) концентрацією посівного матеріалу в середовищі Зобелла, що містить 3 М NaCl, галактозу, екстракт яловичини, і хлорид кальцію як додаткові добавки. Результати вказали можливість для ферментаційного виробництва галоцину для можливих застосувань з використанням галофільного археону *Natrinema* sp. BTSH10 [59].

Бактеріоцини, вироблені *Rhizobium* spp. були охарактеризовані як фагоподібні та що мають антибіотичні властивості. Багато ризобіальних видів, включаючи *Rhizobium leguminosarum* і *Bradyrhizobium* spp. (Бактеріоциногенні штами) продукують бактеріоцини, позначені як ризобіоцини [60-63].

R. leguminosarum bv. Повідомлялося, що штам Z25, інокулянт, що використовується в польових умовах, був ефективним в експериментах з антагонізмом. Широка бактеріоциногенна активність було продемонстровано шляхом вимірювання накопичення сухих речовин у бульбочках та загальної АРА (ацетиленредуючий діяльність). Цей штам проявляв такі властивості як, чутливість до тепла та протеолітичних ферментів, що свідчить про білкову

природу. Ризобій GR4 у стерилізованому рідкому бульйоні та спостерігали, що стерилізований ґрунт продукує бактеріоцини проти стандартного штаму *Rhizobium* S24 Vigna [64].

Bradyrhizobium і *Rhizobium* (бактеріоциногенні ризобіальні штами), що утворюють зелений ґрам та їх антагоністична взаємодія з чутливими штамми (штами *Rhizobium* VRF76) в умовах спільного росту повідомляється Goel et al. [62]. Вплив виробництва бактеріоцину на конкурентоспроможність до нодуляції на Green Gram досліджували шляхом спільного посіву штаму-продуцента бактеріоцину (VRF10 та VRF76) в стерильних умовах. Штам-продуцент бактеріоцину VRF10 мав більше бульбочок, ніж чутливий штам VRF76, що свідчить про їх роль у конкуренції конкуренції.

Rhizobium leguminosarum bv. *viciae*, штам LC-31, продукував бактеріоцини середнього розміру, які інгібували деякі штами *R leguminosarum* bv. *viciae* та *Agrobacterium* spp.. Цей бактеріоцин-продуцент був серед штамів *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* та *Agrobacterium* - використовувались для вивчення антагонізму серед суміші бактеріальних штамів Rhizobiaceae, вивчені Hafeez та співавт. [65]. Бактеріоцин 50 кДа поліпептид частково очищали хлороформом та сульфатом амонію та аналізували за допомогою SDS-PAGE.

Як повідомляється, ризобій, виділений із ризосферного ґрунту Кінного Граму, є бактеріоциногенним. Тридцять два ізоляти продукували бактеріоцини проти решти ізолятів. Два ізоляти, названі HGR-4 та 9, виявляли найбільшу зону гальмування серед усіх ізолятів. Бактеріоцин отримання ризобієм із ґрунту ризосфери поблизу небобових рослин (*Lupinus albus*, *Triticum aestivum* та *Zea mays*) також відіграє важливу роль у міжспецифічних змаганнях [66, 67]. Два інгібуючі штами *Rhizobium* spp. STM 1081 та STM 1823 виробляли термолабільні бактеріоцини. Ці бактеріоцини були стійкими до кислого рН, але були чутливими до основного рН, органічних розчинників та протеолітичні ферменти. Антимікробна активність цих штамів щодо ґрунтових бактерій *Clostridium* spp., *Vibrio* spp. та *Enterobacter* spp.

Дослідження вперше виявило два кластери генів R-тайлоцину у *P. chlororaphis* 30-84, тайлоцин 1 і тайлоцин 2 S1. Більше того, первинний генетичний аналіз ідентифікував два гени волокна хвоста, що містяться в генетичному модулі тайлоцину 2 (тобто TF2-1 і TF2-2). Мутант з дефіцитом волокна хвоста був створений для тайлоцину 1 шляхом заміни хвостового волокна (TF1) та його шаперону на касету стійкості до антибіотиків. Для тайлоцину 2 був створений подвійний мутантний штам, в якому як гени TF2-1, так і TF2-2, а також пов'язані з ними гени шаперону були замінені касетою стійкості до антибіотиків (мутант Δ TF2-12). Крім того, у касеті Δ TF2-12 було створено потрійний мутант із заміною хвостового волокна тайлоцину 1 та шаперону на касету стійкості до антибіотиків (Δ TF1 Δ TF2-12) [68]. У всіх дослідженнях використовували ознаку стійкості до рифампініну у *P. chlororaphis* 30-84. Штами *P. chlororaphis* 30-84 та ризосфери пшениці вирощували при 28° С у середовищі Luria-Bertani (LB) або середовищі King's B. За необхідності використовували антибіотики у таких концентраціях: 50, 100, 50 та 50 мкг / мл для канаміцину (Km), рифампініну (Rif), гентаміцину (Gm) та тетрацикліну (Tc) відповідно. Ці культури вирощували при 28° С зі струшуванням (200 об/хв), і OD₆₂₀ контролювали щогодини. Після лізису клітин лізати збирали, центрифугували (7500×g) та стерилізували на фільтрі (0,2 мкм) для видалення клітинного дебрису.

Новий клас антибактеріальних білків зі структурною схожістю з рослинними лектинами був виявлений шляхом вивчення антагонізму серед асоційованих з рослинами штамів *Pseudomonas*. Геномна перспектива бактеріоциногенезу псевдомонади показує, що модульна архітектура S піоцинів *P. aeruginosa* зберігається у великій диверсифікованій групі бактеріоцинів, більшість з яких націлена на ДНК або РНК. Подібна модульність присутня в поки ще погано охарактеризованих Rhs (гаряча точка рекомбінації) білках та CDI (контактно-залежне інгібування) білків. Добре розмежовані домени для розпізнавання рецепторів або цитотоксичності дозволяють створити

химерні токсини з новими функціональними можливостями, які успішно застосовуються для S та R піоцинів [69].

Загальну характеристику щодо одержання бактеріоцинів грамнегативних бактерій наведено у *табл 3.1*

Таблиця 3.1

Технологічні аспекти одержання бактеріоцинів грамнегативних бактерій

Продуцент	Продукт	Середовище для культивування	Умови культивування	Вихід продукту	Джерело
<i>Pediococcus pentosaceus</i> LB M 18	Антибактеріальна та протигрибкова бактеріоциноподібна інгібуюча речовина (BLIS).	Середовище MPC	При температурі 30°C протягом 10 годин	-	[56]
<i>Natrinema</i> sp. BTSH10	Галоцин	3М-NaCl, галактоза, екстракт яловичини, хлорид кальцію	При температурі 42°C, протягом 104 годин	-	[59]
<i>Pediococcus pentosaceus</i> M35	Бактеріоцин класу Па	Бульйон Твін 80 Ацетат	При температурі 121°C протягом 30 годин	-	[57]
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Клебоцин	Соевий бульйон триптикази-3,3 мл, Мітоміцин С – 1 мл	При температурі 37°C протягом 5 годин	-	[50]
<i>E. coli</i> Nissle 1917	Мікроцини - H47 і М	LB	При температурі 37 °C, протягом 22 годин	10 ⁸ КУО/мл	[45]
<i>E. coli</i> Ec1145	Коліцин	LB	При температурі 37 °C, протягом 18 годин	10 ⁹ КУО/мл	[47]

РОЗДІЛ 4. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ ВИПУСКУ СУБСТАНЦІЇ ДЛЯ ВИГОТОВЛЕННЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ТА ВИРОБНИЦТВА ГОТОВОЇ ФОРМИ ЛЗ

4.1. Передумови виробництва ЛЗ.

4.1.1. Аналіз фармакологічних властивостей цільового ЛЗ, галузей використання

Стійкість до антибіотиків у світі зростає з тривожними темпами, а саме відкриття нових антибіотиків є доволі довготривалим процесом. З кожним роком такий пошук стає все складніше та довше. Особливе занепокоєння викликають інфекції, викликані грамнегативними бактеріями, які мають надзвичайно непроникну зовнішню мембрану, яка обмежує проникнення декількох класів антибіотиків, залишаючи обмежені терапевтичні можливості, які стають все менш ефективними у міру поширення резистентності. Передусім серед грамнегативних збудників є *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* та *Acinetobacter baumannii*, всі вони становлять серйозну загрозу для глобальної охорони здоров'я та безпеки пацієнтів [71].

Серед цих збудників *E. coli* та *K. pneumoniae* є відомими продуцентами β -лактамаз і карбапенемаз розширеного спектру дії, які роблять бактерії стійкими до β -лактамів, включаючи цефалоспорини та карбапенеми, які вважаються антибіотиками останньої інстанції. Крім того, хронічні інфекції, опосередковані біоплівкою, такі як легеневі інфекції *P. aeruginosa* у хворих на муковісцидоз та інфекції сечових шляхів кишкової палички, відносно погано лікуються існуючими антибіотиками. Отже, можливості лікування інфекцій, викликаних грамнегативними бактеріями, обмежені, а результативність такого лікування знижується щодня [71].

До альтернатив антибіотиків відносять мікробні білки – бактеріоцини. Фактично, гени, що кодують ці речовини, можна знайти в геномах більшості грамнегативних збудників, включаючи вищезазначених збудників бактеріальних інфекцій. Важливо, що вони є високоспецифічними антибактеріальними засобами,

					НУХТ БТЕК 02.02.10 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Ширай В.О.			РОЗДІЛ 4. ТЕО випуску субстанції для виготовлення ЛЗ та виробництва готової форми ЛЗ.	Літ.	Арк.	Акрушів
Керівник		Стабніков В.П.					36	16 36
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

які вбивають лише бактерії, тісно пов'язані з продуцентом, і використовуються під час боротьби за ресурси зі штамми -конкурентами. Ця специфіка робить їх привабливими як терапевтичні засоби, оскільки вони пропонують більш цілеспрямований підхід [71].

Коліцини - це білкові токсини, молекулярна маса яких становить 40–70 кДа. Дані бактеріоцини спеціально націлені на кишкову паличку. Враховуючи той факт, що ці молекули були першими відкритими і були найкраще вивчені на сьогоднішній день, подібні молекули, вироблені іншими грамнегативними бактеріями, прийнято називати CLB [71].

CLB націлені на штами, тісно пов'язані з продукуючим штамом, як правило, одного і того ж виду, і мають видові специфічні назви: коліцини з *E. coli*, клібіцини з *Klebsiella* та пестицини з *Yersinia pestis*. CLB є сприйнятливими до протеаз модульними білками з доменами, які беруть участь у зв'язуванні рецепторів, транслокації та цитотоксичності. Гени CLB також були охарактеризовані у *Burkholderia*, *Pectobacterium* та *Pseudomonas*, які тут називаються бурхоцинами, пектоцинами та псевдоцинами (або піоцинами S-типу, названими на честь *P. ruocyanea*) відповідно. Такі гени бактеріоцину також зустрічаються в інших родах, переважно в *Enterobacteriaceae* (наприклад, у *Enterobacter*, *Salmonella*, *Serratia*, *Citrobacter* та *Shigella*) [71,72].

Специфічність CLB опосередковується зв'язуванням рецептора у зовнішній мембрані клітини -мішені. Потім сусідній транслокатор опосередковує транспорт у периплазму. Енергія для цього транспорту забезпечується або системою Tol для CLB групи А, або системою Ton для CLB групи В. Пороутворюючі коліциноподібні бактеріоцини потім вставляються у внутрішню мембрану, щоб порушити рухову силу протонів (PMF), тоді як нуклеази переміщуються в цитоплазму [71,73].

Синтез коліцину в штаммах *E. coli* є важливою ознакою щодо виживання мікробів та конкуренції у складному кишковому середовищі. Коліцини є найбільш широко вивченими бактеріоцинами, що виробляються грамнегативними бактеріями, і на сьогоднішній день виробництво 25 різних типів коліцину було чітко

продемонстровано у штаммах *E. coli*^{3,4,7}, найновіший тип (тип R) був описаний у 2014 році. До цього часу всі добре охарактеризовані коліцини були плазмідно-кодованими білками, що містять домен, за винятком плазмідно-кодованого поліпептидного коліцину JS, де домени не були ідентифіковані. Відомі типи коліцину відрізняються за низкою характеристик, включаючи механізм їх вивільнення з клітини-продуцента, типи транслокаційних систем, що використовуються для перетину клітинної оболонки, механізм вбивчої дії, специфічність рецептора та ін. [74].

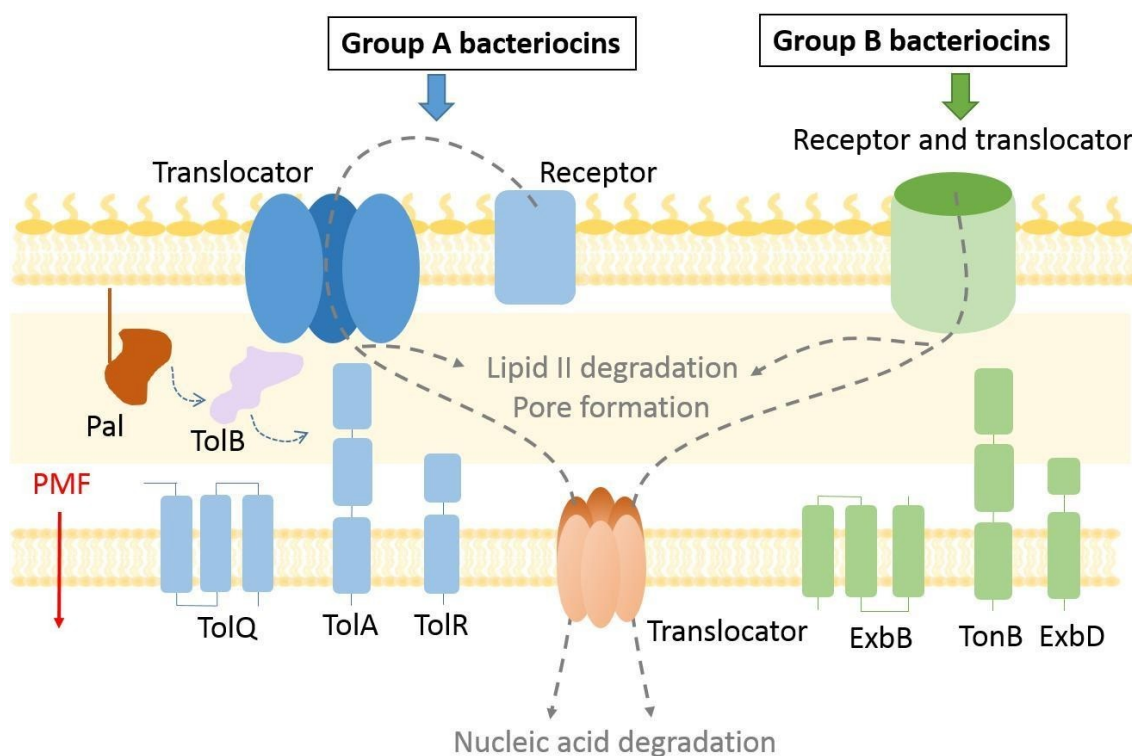


Рис.4.1. Загальна схема механізму дії коліцинів [73]

Коліцини кишкової палички викликають великий інтерес. Дані мікробні білки виявляють селективну цитотоксичність щодо ракових клітин, що робить бактеріоцини цікавими кандидатами для нової терапії раку. У 2003 році Чумчалова та Смарда виявили, що пухлинні клітини людини вибірково інгібуються коліцинами, особливо коліцинами, що утворюють пори, клітинно-специфічним та коліциноспецифічним шляхом [75,76].

Можливе застосування коліцинів при лікуванні хвороби Крона, наявність яких свідчить про впливовість кишкової палички в патогенез захворювання. Дисбіоз у

пацієнтів із даним захворюванням часто супроводжується зниженням різноманітності бактеріальної мікрофлори кишечника. Адгезивно-інвазивні штами *E. coli* (AIEC), які є одними із збудників цієї хвороби, мають здатність прилипати до епітеліальних клітин та проникати у них, а також виробляти великі біоплівки, які захищають бактерії від імунної системи господаря та антибіотикотерапії [77].

Коліцини відносяться до GRAS-групи та на сьогоднішній дозволені для застосування у харчовій промисловості, зокрема для м'ясо перероблювальної галузі. Сам продукт коліцин може бути складений так, щоб містити один або суміш двох або більше окремих білків коліцину, залежно від широти застосування, необхідної для різних харчових продуктів [78].

4.1.2. Обсяг ринку та очікувані темпи його розвитку.

Хвороба крона (ХК) - це важка хвороба, яка вражає практично всі відділи шлунково-кишкового тракту. Найчастіше страждає термінальний відрізок клубової кишки і товстий кишечник. Хвороба провокує сильний запальний процес, лімфаденіт, поява виразок і рубців на слизовій кишечника. Від цієї недуги однаково часто страждають і дорослі і діти. Вчені вважають, що поява хвороби Крона може бути обумовлено спадковими і інфекційними факторами, а так само збоєм в роботі імунної системи [79].

Це захворювання однаково вражає як чоловіків, так і жінок. При цьому найбільш схильними до нього люди в молодому активному віці 20-30 років. Як показує практика, піком виявлення запальних захворювань кишечника вважається 26-річний вік, а у 15% випадків – це люди молодші 20 років [80].

В Україні показники цієї захворюваності нижчі, ніж у європейських країнах, проте це не свідчить про низьку захворюваність. Швидше – про недостатність виявлення таких хворих, низький рівень звернень пацієнтів за медичною допомогою. Такі захворювання можуть виявлятися уже на пізніх стадіях, коли наявні незворотні та важкі ускладнення [80].

Як показує статистика, тенденція ХК лише зростає та стає доволі помітною серед інших захворювань ШКТ. В середньому, в період з 2014 по 2015 рік поширеність

даного захворювання на працездатне населення збільшилось на 16,2%. Такий показник робить дану хворобу соціально-значущою, адже напряду впливає на працездатність громадян нашої країни [81].

4.1.3. Вибір форми випуску лікарського засобу.

Проблема вибору готової форми лікарських засобів вимагає постійної уваги, тому що великі матеріальні витрати на упаковку, нераціональний її вибір призводить до зниження якості і значних втрат сировини, матеріалів, лікарських засобів. Тому тара й упаковка у фармацевції відіграють особливу роль, забезпечуючи не тільки можливість зручного застосування ліків, але і збереження їхніх властивостей у процесі зберігання.

Даний препарат на основі коліцину є пероральним і може випускатись як в таблетках, так і в капсулах. Основне місце дії лікарської речовини – це кишківник. Тому препарат повинен вивільнятись лише в кишківнику.

Зважаючи на те, що коліцин є білком ми повинні захистити його від руйнівного впливу кислоти шлунку. Тому пропонується як товарна форма препарат у капсулах.

Капсули мають ряд переваг:

- висока біодоступність;
- точність дозування;
- гарний зовнішній вигляд;
- легко проковтуються, швидко набухають;
- желатинові капсули легкокорозчинні, вони проникні для травних соків
- лікувальна дія лікарської речовини проявляється швидко (у середньому через 4–5 хв).
- шляхом введення до складу желатинових стінок допоміжних речовин або покриття спеціальними плівками вдається одержувати капсули з різною швидкістю вивільнення й локалізацією дії лікарської речовини;

- оболонка з желатину захищає лікарську форму від впливу повітря, світла, вологи, пилу, захищає від механічних зовнішніх впливів, коливань температури.
- уміщення в оболонку зручне для відпускання речовин, що мають неприємний смак, запах та колір, тому капсули дуже перспективні для застосування в педіатрії і геронтології;
- виготовлення капсул майже цілком механізоване й автоматизоване.

Отже, найкращою лікарською формою для виробництва коліцину є тверді желатинові капсули, так як вони є менш небезпечними для організму, мають більш швидку терапевтичну дію, порівняно з таблетками, мають тривалий термін зберігання та стабільність при зберіганні

4.1.4. Опис лікарського засобу згідно АНД (проект АНД).

Основні фізико-хімічні властивості: цільні правильні, круглі циліндри, верхня і нижня поверхня яких плоскі, краї поверхонь скошені, з ризикою для поділу білого або білого з жовтуватим або зеленуватим відтінком кольору.

Склад: 1 таблетка містить коліцину 500 мг.

допоміжні речовини: крохмаль картопляний, кальцію стеарат, кремнію діоксид колоїдний безводний, гідроксипропілметилцелюлоза, повідон.

Форма випуску: таблетки.

Фармакологічна група: Антибактеріальні засоби для системного застосування.

Фармакологічні властивості: Має широкий спектр дії. Граничні концентрації препарату в сироватці крові, які дають можливість віддиференціювати чутливі штами (S) від штамів з помірною чутливістю, а штами з помірною чутливістю – від резистентних штамів (R), це такі: $S \leq 4$ мг/л і $R > 4$ мг/л.

Поширеність набутої резистентності у певних видів мікроорганізмів може відрізнятися залежно від географічного положення та часу. У зв'язку з цим корисно мати інформацію про місцеву поширеність резистентності, особливо при лікуванні тяжких інфекцій. Ці дані є лише загальними орієнтирами, що

вказують на імовірність чутливості певного бактеріального штаму до цього антибіотика.

Фармакокінетика: При пероральному прийомі коліцин швидко і майже повністю всмоктується (мінімум 80 % за годину). Максимальна концентрація в сироватці крові, яка досягається після перорального прийому препарату, подібна до тієї, що досягається після внутрішньовенного введення еквівалентних доз. Біодоступність при пероральному прийомі становить 100 % і не знижується значно при одночасному прийомі їжі. Приблизно через 1 годину після прийому одноразової дози 500 мг середня максимальна концентрація у плазмі крові становить 10 мкг/мл. Через 3 години середня концентрація у плазмі крові становить 13,5 мкг/мл. Період напіввиведення – 8-10 годин, зв'язування з білками крові незначне – не більше 20 %. Виведення препарату здійснюється на 35-65 % нирками.

Показання до застосування: Інфекції, спричинені чутливими до препарату мікроорганізмами: амебіаз; уrogenітальний трихомоніаз; неспецифічні вагініти; лямбліоз; хірургічні інфекції, спричинені чутливими до метронідазолу анаеробними мікроорганізмами.

Спосіб застосування та дози: При амебії приймати безперервно протягом 7 днів. Дорослим: 1,5 г на добу, тобто по 500 мг (2 таблетки) 3 рази на добу.

Дітям віком від 6 років: 30-40 мг/кг маси тіла на добу за 3 прийоми.

Лямбліоз лікувати протягом 5 днів. Дорослим призначати 750 мг-1 г на добу.

Дітям віком 6-10 років – 375 мг/добу, 10-15 років – 500 мг на добу.

Для лікування анаеробних інфекцій (терапія першої лінії або замісне лікування) дорослим призначати 1-1,5 г (4-6 таблеток) на добу, дітям віком від 6 років – 20-30 мг/кг маси тіла на добу за 2 прийоми.

Побічна дія: Незначні шлунково-кишкові розлади, порушення смакових відчуттів, зміна кольору або зміна зовнішнього вигляду язика. Свербіж шкіри, шкірне висипання, що в окремих випадках супроводжується підвищенням температури тіла, анафілактичний шок. Головний біль, запаморочення, судоми,

Протипоказання: Дитячий вік до 6 років (що зумовлено лікарською формою) (див. розділ «Особливості застосування»).

Взаємодія з іншими лікарськими засобами:

Дисульфірам. Ризик розвитку гострих психотичних епізодів або сплутаності свідомості, які є оборотними після відміни препарату.

Бусульфан. При застосуванні бусульфану у високих дозах: збільшення удвічі концентрацій бусульфану у пацієнтів, які отримують метронідазол.

Особливі проблеми стосовно МНС (міжнародне нормалізоване співвідношення).

У пацієнтів, які отримували антибактеріальну терапію, реєструвалися чисельні випадки посилення активності пероральних антикоагулянтів. Факторами ризику при цьому є тяжкість інфекції або запалення, вік пацієнта та загальний стан здоров'я. У цих обставинах складно визначити, у якій мірі на порушення рівноваги МНС впливає сама інфекція або її лікування. Проте деякі групи антибіотиків більшою мірою причетні до цього ефекту, особливо фторхінолони, макроліди, цикліни, ко-тримоксазол і деякі цефалоспорини.

Особливості застосування: Одночасне застосування препарату та алкоголю не рекомендоване. Також не бажано застосовувати одночасно з бусульфаном та дисульфіром.

Умови та термін зберігання: Зберігати в оригінальній упаковці при температурі не вище 25 °С протягом 3 років.

Умови випуску: за рецептом

Упаковка: по 10 таблеток у блістері. [88]

СПЕЦИФІКАЦІЯ

Найменування показника	Допустимі межі	Методи контролю
Опис	Кристалічний порошок білого або жовтого кольору	За п.1, візуально
Розчинність	Малорозчинний у воді, ацетоні, спирті, метиленхлориді	За п.2, візуально
Ідентифікація	Ультрафіолетовий спектр поглинання одержаного розчину в області від 230 нм до 350 нм повинен мати максимум за довжини хвилі 650 нм і мінімум за довжини хвилі 240 нм. Питомий показник поглинання від 365 до 395.	За п.2.2.14, 2.2.25, 2.3.1 ДФУ
Прозорість розчину	Одержаний розчин за ступенем каламутності не має перевищувати еталон ІІ.	За 2.2.1 ДФУ
Кольоровість розчину	Забарвлення розчину має бути не інтенсивнішим за еталон GY ₆	За п.2.2.2 ДФУ
Супровідні домішки	Визначають за допомогою рідинної хроматографії	За п. 2.2.29 ДФУ
Важкі метали	Не більше 0,002%	За п. 2.4.8 ДФУ
Втрата в масі при висушуванні	Не більше 0,5%	За п.8 АНД
Кількісне визначення	1 мл 0,1 М розчину кислоти хлорної відповідає 17.12 мг C ₆ H ₉ N ₃ O ₃ .	За п.9 АНД
Умови зберігання	В захищеному від світла місці.	За п.10 АНД

МЕТОДИ КОНТРОЛЮ**Опис**

Кристалічний порошок білого або жовтого кольору.

Розчинність

Малорозчинний у воді, ацетоні, 96% спирті і метиленхлориді.

Ідентифікація

Перша ідентифікація: С, друга ідентифікація: А,В,Д

A: Температура плавлення (2.2.14) . Від 159 градусів до 163.

B: 40.0 мг субстанції розчиняють в 0,1 М розчині кислоти хлористоводневої та доводять об'єм розчину тією самою кислотою до 100,0 мл. 5.0 мл одержаного розчину доводять 0.1 М розчином кислоти хлористоводневої до об'єму 100.0 мл. Ультрафіолетовий спектр поглинання (2.2.25) одержаного розчину в області від 230 нм до 350 нм повинен мати максимум за довжині хвилі 277 нм і мінімум за довжини хвилі 240 нм. Питомий показник поглинання в максимумі має бути від 365 до 395.

C: Абсорбційна спектрофотометрія і інфрачервоній області (2.2.24). Підготування зразка: субстанцію досліджують у дисках. Відповідність: спектру ФС 3 метронідазолу

D: До близько 10 мг субстанції додають близько 10 мг цинку порошку Р, 1 мл води Р, 0.25 мл кислоти хлористоводневої розведеної Р, нагрівають на водяній бані протягом 5 хвилин і охолоджують. Одержаний розчин дає реакцію на первинні ароматичні аміни (2.3.1)

Прозорість розчину

1.0 г субстанції розчиняють в 1 М розчині кислоти хлористоводневої і доводять об'єм розчину тією самою кислотою до 20 мл. Одержаний розчин за ступенем каламутності не має перевищувати еталон II. (2.2.1)

Кольоровість розчину

Забарвлення розчину, приготованого для випробування «Прозорість розчину» має бути не інтенсивнішим за еталон GY₆. (2.2.2 метод II)

Супровідні домішки

Рідинна хроматографія (2.2.29). Розчини готують у захищеному від світла місці.

Випробуваний розчин. 0.05 г субстанції розчиняють у рухомій фазі та доводять об'єм розчину рухомою фазою до 100.0 мл

Розчин порівняння (а) 1.0 мл випробуваного розчину доводять рухомою фазою до об'єму 100.0 мл. 1.0 мл одержаного розчину доводять рухомою фазою до об'єму 10.0 мл

Розчин порівняння (б) 5.0 мг *ФС 3* домішки А метронідазолу розчиняють у рухомій фазі, додають 10.0 мл випробуваного розчину та доводять об'єм розчину рухомою фазою до 100.0 мл. 1.0 мл одержаного розчину доводять рухомою фазою до 100.0 мл

Колонка: розмір – 0,25м * 4,6 мм, нерухома фаза – силікагельоктадецилсилільний для хроматографії Р (5 мкм), рухома фаза – метанол Р – розчин 1.36 г/л калію дигідрофосфату Р (30:70)

Об'єм проби, що вводиться: 10 мкл, час хроматографування: у 3 рази більше часу утримування метронідазолу.

Важкі метали

Не більше 0.002%. 1.0 г субстанції має витримувати випробування на важкі метали. Етанол готують із використанням 2 мл еталонного розчину свинцю Р (2.4.8)

Втрата в масі при висушуванні

Не більше 0.5%. 1.000 г субстанції сушать при температурі 105 градусів протягом 3 годин.

Кількісне визначення

0.150 г субстанції розчиняють у 50 мл кислоти оцтової безводної Р і титрують 0.1М розчином кислоти хлорної потенціометрично. 1 мл 0,1 М розчину кислоти хлорної відповідає 17.12 мг $C_6H_9N_3O_3$.

Зберігання

В захищеному від світла місці. [86]

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

Для прорахунку необхідної кількості коліцину за основу будемо використовувати антибіотик метронідазол та пропис до лікування ЖК цим препаратом.

Дорослим метронідазол призначають в дозі 500 мг перорально 2 рази на день протягом 4-8 тижнів. Дітям дозу визначають за пропорцією 15 мг/кг [85,86].

Кількість діючої речовини в 1 таблетці – 500 мг [86].

Необхідно розрахувати кількість коліцину, яка буде застосовуватись для виробництва таблеток. Пропонується перерахувати цей показник за мінімальною інгібуючою концентрацією метронідазолу до АІЕС. Цей показник становить 64 мг/л [87]. Отже, необхідна кількість коліцину в 1 таблетці становить:

$$64 \text{ мг/л} - 500 \text{ мг}$$

$$80 \text{ мг/л} - x$$

$$x = \frac{80 \times 500}{64} \approx 625 \text{ мг}$$

Оскільки препарат лише розроблюється, пропонується застосовувати його для дорослого працездатного населення, оминаючи дітей. Станом на 01.06.2021, в Київській області проживає 1,8 млн населення. З них, близько 600 тис. – діти. Тож, необхідно розрахувати ймовірну кількість хворих на ЖК серед 1,2 млн населення [87].

Щороку лікарі реєструють 1-2 випадків на 10 тис. чоловік . Тож, кількість хворих на ЖК становить:

$$120 \times 1 = 120 \text{ людей}$$

Припустимо, що лікування триватиме 4 неділі. Щодня необхідно приймати по 3 таблетки. Тож, необхідна кількість таблеток на хворе населення:

$$120 \times (4 \times 7 \times 2) = 10\,080 \text{ таблеток}$$

Необхідна кількість коліцину для виготовлення таблеток становить:

$$10\,080 \times 625 = 6\,300\,000 \text{ мг} = 6,3 \text{ кг}$$

Узагальнені дані представлено в *табл. 4.2*.

Таблиця 4.2

Узагальнені дані

Діюча речовина	Кількість коліцину в 1 таблетці, мг	Кількість хворих на ХК, особи	Особливості прийому	Необхідна кількість коліцину, кг
Коліцин	625	120	Людам старше 18 років, 2 таблетки протягом 4 неділь	6,3

Зважаючи на все вище перераховане, необхідна кількість таблеток для хворого населення на ХК становитиме 10 080 штук на рік. Відповідно до цього ми будемо використовувати пілотний таблетпрес «Fast Tab» фірми «Farmalabor (Італія)» враховуючи малотонажність виробництва.

Продуктивність даної машини становить до 3400 таблеток на годину (встановлюємо програму на 3360 штук на годину). Примемо її час роботи – 3 години. Таким чином за один цикл таблетується: $3360 \times 3 = 10\,080$ штук таблеток.

Один блістер містить 14 таблеток, таким чином кількість блістерів становить : $10\,080/14=720$ штук. В свою чергу вторинна упаковка (картонна коробочка) вміщує 2 блістери. В результаті отримаємо кількість картонних упаковок: $720/2=360$ штук, котрі вкладаються в групову тару – картонний

ящик по 60 пачок, в результаті чого ми отримуємо $360/60=6$ наповнених гофрованих ящиків на серію.

В результаті кількість серій на рік складає $10\ 080/10\ 080=1$ серія.

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

Для лікування ХК пропонується замінити антибіотики на бактеріоцини кишкової палички. Оскільки мікробні білки ще не доступні на широкому ринку, пропонується проаналізувати ринок антибіотиків, які використовуються для лікування зазначеної хвороби. До таких антибіотиків відносяться метронідазол та ципрофлоксацин [82].

Метронідазол. Один з найбільш часто вживаних антибіотиків для лікування хвороби Крона. Метронідазол може іноді викликати серйозні побічні ефекти, в тому числі оніміння і поколювання в руках і ногах, а іноді і біль в м'язах або слабкість. Якщо у Вас виникають ці симптоми потрібно призупинити лікування і негайно звернутися до лікаря. Інші побічні ефекти включають: нудоту, металевий присмак у роті, головний біль і втрату апетиту [83].

Ципрофлоксацин. Цей препарат, який зменшує симптоми у деяких пацієнтів з хворобою Крона, в даний час вважається кращим, ніж метронідазол. Ципрофлоксацин може викликати нудоту, блювоту, головний біль і, рідше, болі в сухожиллях [83].

Для лікування ХК застосовують антибіотики в таблетках, тому доречно розглянути які антимікробні препарати пропонує вітчизняний ринок саме в такій лікарській формі. Аналіз представлено в *табл. 4.3*.

Аналіз ринку антибіотиків проти ХК

Виробник	Назва	Ціна, грн	Джерело
Метронідазол			
ПАТ «Лубнифарм», Полтавська обл., м. Лубни	Метронідазол таблетки по 250 мг №20 (10x2)	25,55-55,00	1
ТОВ «ФАРМ КОМПАНИЯ ЗДОРОВ'Я», м. Харків	Метронідазол-Здоров'я таблетки по 250 мг №20 (10x2)	34,00-65,00	2
Ципрофлоксацин			
ПАТ «Лекхім», м. Харків	Ципрофлоксацин таблетки, п/о по 500 мг №10	36,16-75,00	3
«Unique», Індія	Ципрофлоксацин євро таблетки, п/пен. обол. по 500 мг №10 (10x1)	32,32-63,92	4
ТОВ «АСТРАФАРМ», Київська обл., м. Вишневе	Ципрофлоксацин- Астрафарм таблетки, п/пен. обол. по 500 мг №10 (10x1)	42,20-71,40	5
ООО «Опытный завод «ГНЦЛС», м. Харків	Ципрофлоксацин таблетки, п/о по 250 мг №10	16,06-35,00	6

Примітка (ціни наведено станом на 01.08.2021): 1-6 - <https://tabletki.ua> ,

Як видно з *табл.4.3* вітчизняний ринок пропонує великий асортимент таблеток проти ХК на різний діапазон в ціні. Але, зважаючи на те, що ХК є невиліковним захворюванням, а до антибіотиків стрімким темпом розвивається резистентність, а також беремо до уваги побічні реакції від їх прийому, пропонуємо зайняти нішу виробництва безпечних ЛЗ проти ХК на основі бактеріоцину кишкової палочки – коліцину [84].

4.1.7 Розрахунок річної потужності виробництва субстанції, об'єму ферментера та кількості виробничих циклів

Річна потреба в коліцині була зазначена раніше і становить 6,3 кг. За даними статті утворюється близько 0,52 г/л бактеріоцину.

Кількість культуральної рідини необхідної для отримання 6,3 кг коліцину становить:

$$\frac{6,3}{0,52} = 12 \text{ м}^3$$

Враховуючи сумарні втрати цільового продукту при виділенні (до 30 %), необхідно отримати таку кількість культуральної рідини:

$$V_{\text{кр}} = \frac{12}{1 - 0,7} \approx 17 \text{ м}^3$$

Приймаємо, що для отримання 17 м³ культуральної рідини необхідно 300 робочих трудоднів (T_{рд}). Відповідно кількість культуральної рідини на добу (V_д) становитиме:

$$V_{\text{д}} = V_{\text{кр}}/T_{\text{рд}} = 17/300 \approx 56 \text{ л}$$

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

$$V_{\text{крц}} = K_1 \cdot V_{\text{д}} \cdot T_{\text{цф}} / 24 = 1,1 \cdot 56 \cdot 22 / 24 \approx 56,5 \text{ л},$$

де T_{цф} - цикл роботи ферментера, який включає: мийку та огляд – 1,5 год, перевірку на герметичність – 0,5 год, підігрів та стерилізацію апарату – 1,5 год, охолодження ферментеру – 1 год, завантаження поживного середовища – 1,5 год, засів культурою – 0,5 год, ферментацію – 15 год, та вивантаження – 0,5 год, і становить 22 години. K₁ – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій (K₁ = 1,1).

Геометричний об'єм ферментера для отримання 56,5 л культуральної рідини, з коефіцієнтом заповнення 0,6 має становити:

$$V_{\text{г}} = V_{\text{цк}}/K_{\text{зап}} = 56,5/0,6 \approx 94,2 \text{ л},$$

де K_{зап} – коефіцієнт заповнення ферментера.

Отже, вибираємо стандартний ферментер об'ємом V_ф = 100 л

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зф}} = V_{\text{цк}}/V_{\text{ф}} = 56,5/100 = 0,57$$

За виробничий цикл отримують V_{кр} = 56,5 л культуральної рідини.

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

$$V_{\text{роб.1}} = V_{\text{кр}} / (1 - E_{\text{ф}}) = 56,5 / (1 - 0,1) = 62,8 \text{ л,}$$

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

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері з робочим об'ємом $V_{\text{роб.1}} = 62,8$ л.

При вибраному коефіцієнті заповнення $K_{\text{зап}} = 0,6$ можливий геометричний об'єм ферментера $V_{\text{ф.1}} = 62,8 / 0,6 = 104,7$ л. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{сф}} = 100$ та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап.1}} = V_{\text{роб.1}} / V_{\text{сф}} = 62,8 / 100 \approx 0,63$$

Уточнений коефіцієнт дозволяється для ферментерів з аерацією.

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

$$V_{\text{пс1}} = V_{\text{роб.1}} / (1 + X_{\text{ф}}) = 62,8 / (1 + 0,1) \approx 57,1 \text{ м}^3$$

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

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить:

$$V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб.1}} - V_{\text{пс1}} = 62,8 - 57,1 = 5,7 \text{ л}$$

Для одержання 5,7 л інокуляту в інокуляторі враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря (10%). Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу в інокуляторі становить:

$$V_{\text{роб.2}} = V_{\text{пм1}} / (1 - E_{\text{ф}}) = 5,7 / (1 - 0,1) \approx 6,3 \text{ л}$$

Можливий геометричний об'єм інокулятора $V_{\text{ін}} = 6,3 / 0,6 \approx 10,5$ л. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний посівний апарат $V_{\text{сін}} = 10$ л та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап.2}} = V_{\text{роб.2}} / V_{\text{сін}} = 6,3 / 10 = 0,63$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у дозволених межах.

Кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{пс2}} = V_{\text{роб.2}} / (1 + X_{\text{ін}}) = 6,3 / (1 + 0,1) \approx 5,7 \text{ л}$$

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пс2}} = 6,3 - 5,7 = 0,6 \text{ л}$$

0,6 л посівного матеріалу ми можемо отримати використовуючи колби об'ємом 750 мл та коефіцієнтом заповнення $K_{\text{зк}} = 0,2$. Кількість колб становитиме:

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

Таким чином, для одержання посівного матеріалу необхідно 4 колби.

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого культивування у ферментері об'ємом 100 з коефіцієнтом заповнення 0,6 буде проходити у 2 етапи.

РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ СУБСТАНЦІЇ ТА ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА ЛЗ.

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

Таблиця 5.1

Порівняльна характеристика продуцентів колицину

Біологічний агент	Поживне середовище, г/л	Умови культивування	Концентрація колицину, г/л	Література
<i>E. coli</i> BL21(E2)	Пептон – 10 Дріжджовий екстракт – 5 NaCl – 5 ПТГГ – 0,24 Канаміцин – 0,05	17 год 220 об/хв рН=7,2 37 °С	0,26	Jin X., Kightlinger W., Kwon Y. C., Hong S. H. Rapid production and characterization of antimicrobial colicins using Escherichia coli-based cell-free protein synthesis. Synthetic Biology. 2018, 3(1): ysy004. doi: 10.1093/synbio/ysy004
<i>E. coli</i> BL21(E3)	Пептон – 10 Дріжджовий екстракт – 5 NaCl – 5 ПТГГ – 0,24 Канаміцин – 0,05	17 год 220 об/хв рН=7,2 37 °С	0,55	Jin X., Kightlinger W., Hong S. H. Optimizing cell-free protein synthesis for increased yield and activity of colicins. Methods and Protocols. 2019, 2(2), 28. doi:10.3390/mps2020028
<i>E. coli</i> UTI	Гліцерин - 50 М'ясний екстракт – 1 Дріжджовий екстракт – 2 Пептон – 5 NaCl – 5 Мітоміцин С – 0,002	15 год 220 об/хв рН=7 37 °С	0,52	Al-mawlawi Z. S., Obaid, H. H. Antibacterial Activity of Synergistic Effect of Colicin and Gold Nanoparticles Against Pseudomonas Aeruginosa. Iraqi Journal of Science. 2017, 58(2C): 1020-1027. doi: 10.24996.ijs.2017.58.2C.4

					НУХТ БТЕК 02.02.10 КР ПЗ					
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата						
					РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми біосинтезу субстанції та технологічної схеми виробництва ЛЗ					
Розроб.	Ширай В.О..							Літ.	Арк.	Акрушів
Керівник	Стабніков В.П.								54	27 ⁵⁴
Консультант								Кафедра БТМ		
Н. Контр.										
Затверд.	Стабніков В.П.									

**Вартість компонентів поживного середовища для культивування
продуцентів коліцину**

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Пептон – 10	850	8,5	1
	Дріжджовий екстракт – 5	1100	5,5	2
	NaCl – 5	37	0,2	3
	ПТГ – 0,24	26830	6,5	4
	Канаміцин – 0,05	51822	2,6	5
	Вартість 1 л поживного середовища – 23,3 грн			
<i>E. coli</i> UTI	Гліцерин – 50	32	1,6	6
	М'ясний екстракт – 1	24	0,03	7
	Дріжджовий екстракт – 2	1100	2,2	2
	Пептон – 5	850	4,25	1
	NaCl – 5	37	0,2	3
	Мітоміцин С – 0,002	27	0,00006	8
	Вартість 1 л поживного середовища – 8,1 грн			

1. <https://prom.ua> , 2. <https://prom.ua> 3. <https://prom.ua> ,
4. <https://www.helicon.ru> , 5 - <https://us.vwr.com> , 6 - <https://prom.ua> ,
7. <https://russian.alibaba.com> , 8. <https://ru.made-in-china.com>

Примітка 1. Ціни на компоненти поживних середовищ взяті з українських промислових інтернет-магазинів станом на 2020 рік

У таблиці 5.2 наведено вартість компонентів поживних середовищ на 1 л середовища. Для *E. coli* BL21(DE3) ціна за 1 л середовища становить -23,3 грн. А середовище для *E. coli* UTI набагато дешевше, його вартість складає лише 8,1 грн.

**Умовна вартість 1л цільового продукту при культивуванні продуцентів
коліцину**

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища, грн	Концентрація коліцину, г/л	Умовна вартість 1 г коліцину, грн/г	Тривалість культивування, год	Кількість утвореного коліцину за годину, г/год
<i>E. coli</i> BL21(E2)	23,3	0,26	89,62	17	0,015
<i>E. coli</i> BL21(E3)	23,3	0,55	42,36	17	0,032
<i>E. coli</i> UTI	8,1	0,52	15,58	15	0,035

Штам *E. coli* UTI має не дуже високу вартість по цільовому продукту, порівняно зі штамми *E. coli* BL21(E2), *E. coli* BL21(E3). На підставі вищезазначеного можемо зробити висновок, що штам *E. coli* UTI має ряд переваг: невисоку ціну поживного середовища за 1л, менший час культивування та більшу концентрацію продукту.

5.2. Обґрунтування вибору способу культивування і типу ферментера.

Об'єктом дослідження є штам бактерії *E. coli* UTI - продуцент коліцину. Ешерихії представляють собою поліморфні прямі або злегка зігнуті палички з закругленими кінцями середніх розмірів (довжина 2-6 мкм і ширина 0,4-0,6 мкм). Палички розташовуються поодинокі, рідше - попарно. Спор не утворюють, є аеробами або факультативними анаеробами [89].

Обґрунтування вибору ферментера:

Метод глибинного культивування.

Метод полягає у біосинтезі мікроорганізмів у рідкому поживному середовищі. Ця методика більш досконала, оскільки легко піддається автоматизації. Усі клітини культури знаходяться в однакових, легко відтворюваних умовах. Як наслідок, вони рівномірно забезпечуються поживними речовинами і киснем. Також глибинне культивування дає можливість чітко дозувати вміст компонентів у поживному середовищі. Шляхом зміни складу

поживного середовища і умов культивування можна суттєво посилити синтез необхідного продукту.

Поверхневий метод культивування.

При поверхневому методі культура росте на поверхні твердого поживного середовища. Клітини живляться за рахунок поживних середовища і використовують для дихання кисень повітря, тому для оптимального забезпечення киснем потрібно проводити рихлення по всій поверхні середовища з невеликою висотою шару. Це призводить до необхідності мати велику поверхню контакту поживного середовища з повітрям, тобто значних виробничих площ, а за відсутності механізації вимагає і великих витрат ручної праці.

Тому для біосинтезу коліцину, ми обираємо глибинний метод культивування, за рядом переваг, що наведено вище. Також краще використовувати даний метод, через кращого засвоєння розчиненого у воді кисню, легшого дотримання асептики та негативний вплив механічних пошкоджень при поверхневому культивуванні. Досягти це можна лише при глибинному методі культивування, тому вибираємо його.

Безперервний режим культивування.

Для безперервного режиму характерна постійна подача свіжих поживних компонентів із швидкістю, що дорівнює швидкості видалення культуральної рідини. Якщо мікробна культура добре перемішується, то проби, що відбираються з будь-якої частини апарату, будуть рівні за біомасою і концентрацією субстрату.

Періодичне культивування це культивування мікроорганізмів у закритому об'ємі без поновлення поживного середовища. За цих умов популяція мікроорганізмів проходить певний цикл розвитку, для якого притаманна певна зміна фаз або періодів [90].

Біосинтез проводять в періодичному режимі, використовується з метою оптимізації процесу біосинтезу.

Аерація – один з головних факторів умов культивування, що визначає характер розвитку мікроорганізмів та їх синтезуючу здатність. Інтенсивність процесу

залежить від складу поживного середовища під час культивування. Якщо концентрація поживних елементів для росту біомаси та продукту збільшується, то ступінь аерації необхідно також підвищувати.

Тому етап аерації буде включено до головного процесу біосинтезу. Мікроорганізму потрібен постійний доступ кисню, бо від кількості повітря залежить вихідна концентрація біомаси.

Мішалка – це рухомий робочий елемент перемішуючого пристрою в апараті. Робочий орган-лопаті в лопатевих мішалках мають різну конфігурацію. Для перемішування суспензій, що містять тверді частинки, швидкість осадження яких невелика, застосовують лопатеві мішалки з похилими лопатями (при їх роботі посилюються вертикальні струми рідини, що сприяє піднесенню твердих частинок з дна апарату). При перемішуванні лопатевими мішалками густих рідин основна маса рідини обертається в місці з лопатями, при цьому ефективність перемішування дуже низька. Для усунення цього явища в корпусі апарату встановлюють різучі нерухомі перегородки. Для рівномірної інтенсивності перемішування застосовують рамні мішалки-комбінація вертикальних, горизонтальних і похилих лопатей [91].

Вибір типу мішалки.

Для біосинтезу бактерицину ми будемо використовувати рамні мішалки з горизонтальними лопатями.

Отже, проаналізувавши інформацію можна зробити висновок про особливості культивування *Escherichia coli* – культивування відбувається тільки в періодичному режимі, біосинтез потребує аерації та постійного контролю рН та температури. За цими даними, для біосинтезу цільового продукту був обраний ферментера типу Biostat' A (рис. 5.1).



Рис 5.1 Зовнішній вигляд ферментеру

Блок управління BIOSTAT® А поєднує в собі всі властивості і функції для вимірювання і контролю: насоси швидкого завантаження, модуль аерації і зручно розташовані підключення для комунікацій і датчиків. BIOSTAT® А характеризується малими габаритами, що дозволяє заощадити цінний простір в лабораторії.

Система аерації забезпечує постійний автоматичний контроль потоку у всьому діапазоні всіх використовуваних газів. Для роботи нового біореактора BIOSTAT® А не потрібно ручного регулювання ротаметрів, при цьому проблема пульсації подається газової суміші відсутня. Установка біореактора ніколи не була такою простою - підключіть шланги, налаштуйте профіль аерації і встановіть бажане значення концентрації кисню. Версія для роботи з культурами клітин дозволяє підключати чотири газу (повітря, O₂, CO₂ і N₂). Регулювання їх потоків дозволяє управляти концентрацією кисню і рН. Для управління концентрацією кисню в середовищі в конфігурації для культивування мікроорганізмів використовується подача повітря і O₂.

Охолоджувач дозволяє проводити ферментацію в будь-якій лабораторії і мінімізує використання води.

Більше не потрібно турбуватися про пошук відповідного для біореактора джерела охолодження води. Кожен BIOSTAT® А для мікробіологічної ферментації оснащений охолоджувачем, ефективно видаляє тепло з культури. Для функціонування BIOSTAT® А потрібні лише підключення електрики і подачі газу.

Біореактор BIOSTAT® А забезпечений цифровими датчиками рН і DO. Їх використання дозволяє визначати несправність датчика прямо після підключення. Крім того, з'єднувальні контакти забезпечені водозахисними ковпачками, які дозволяють захистити контакти при автоклавуванні.

Завдяки інтуїтивно зрозумілому інтерфейсу, BIOSTAT® А ідеальний для тих, хто ще тільки вчиться, оскільки, дозволяє знизити число помилок оператора і прискорити навчання. У розширеній версії системи є можливість дистанційного керування - тепер можна контролювати процес ферментації не лише з лабораторії, а з офісу або навіть з дому за допомогою планшета або смартфона. Дані про протікання процесу зберігаються безпосередньо в біореакторі BIOSTAT® А; потім ці дані можна передати на ПК або ноутбук для подальшого аналізу [91]

5.3. Обґрунтування підготовки та стерилізації поживного середовища

Виробництво бактеріоцину *E.coli* UT1 здійснюється на такому середовищі (г/л):

Гліцерин - 50

М'ясний екстракт – 1

Дріжджовий екстракт – 2

Пептон – 5

NaCl – 5

Мітоміцин С – 0,002

Згідно з розрахунків, наведених у розділі 1, виробничий біосинтез бактеріоцину здійснюємо у ферментері об'ємом 100 л, що містить 54 поживного середовища. Для одержання інокуляту необхідно провести 2 стадії підготовки:

- у 3 колбах на качалці;
- у інокулятор об'ємом 10 л.

Для вирощування культури *E. coli* необхідно строго контролювати значення рН, для цього під час культивування ми стабілізуємо поживне середовище 6%-им розчином NaOH та соляною кислотою.

Проаналізувавши склад поживного середовища для вирощування посівного матеріалу, ми умовно ділимо його на такі композиції (в залежності від режиму стерилізації):

Композиція А : гліцерин (не стерилізуємо)

Композиція Б: м'ясний екстракт, дріжджовий екстракт, пептон (режим стерилізації: 112оС, протягом 30 хв, 0,05 МПа)

Композиція В: NaCl (режим стерилізації: 131оС, протягом 40 хв, 0,15 МПа)

Композиція Г: мітоміцин С

Технологічна схема, окрім стадій підготовки посівного матеріалу, матиме ще додаткові стадії:

- підготовка аераційного повітря та очистка відпрацьованого;
- приготування та стерилізація 6%-ого розчину NaOH для стабілізації середовища;

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

Процес виділення і очищення бактеріоцинів являє собою складний технологічний процес. Попередня обробка культуральної рідини та відділення біомаси є першою стадією перед виділенням і очищенням. Власне, вже на цій стадії починається часткове очищення культуральної рідини від домішок. Залежно від властивостей бактеріоцина і методів його виділення і очищення вибирається даний спосіб.

В ході біосинтезу *E. coli* коліцин на 55% переходить в культуральну рідину. Для отримання більш стійких форм бактеріоцина потрібно попередньо стабілізувати культуральну рідину. Для цього культуральну рідину підкисляють концентрованою соляною кислотою до рН 4,0. Далі з культуральної рідини потрібно відділити біомасу, оскільки даний бактеріоцин буде використовуватись

у якості лікарського засобу застосування. Після відділення біомаси процес полягає у очищенні бактеріоцина від домішок. Далі екстракт упарюють та сушать, отримуючи порошок коліцину [92].

Щоб виділити і очистити цільовий продукт культуральна рідина повинна пройти наступні технологічні стадії:

1. Відділення біомаси;
2. Підкислення супернатанту;
3. Екстракція коліцину;
4. Концентрування;
5. Сушіння.

5.4.1. Вибір способу відокремлення біомаси та обладнання

Для відділення біомаси на сьогоднішній день застосовуються різні методи, в залежності від типу кінцевого продукту та мікроорганізму-продуценту.

Розрізняють такі методи:

- фільтрування;
- сепарування;
- флотація;
- центрифугування.

Фільтрування – відділення твердої фази від рідкої шляхом проходження через фільтруючий матеріал або через полімерну сітку з відповідним діаметром отворів [93]. Недоліки процесу фільтрування заключаються в великих втратах біомаси за рахунок проходження частини клітин через пори фільтруючого матеріалу, що засмічується і потребує заміни чи регенерації.

Сепарація – процес відділення твердої фази від рідкої, оснований на відділенні часточок з різними характеристиками. Рушійною силою процесу являється відцентрова сила. Ефективність сепарування пропорційна частоті обертів барабану, діаметру барабану, розміру часток, різниці густин твердої та рідкої фаз. Недоліками є підвищена енергоємність процесу.

Флотація – виділення з рідких твердих часток або часток іншої рідини за допомогою продування крізь неї газу. Флотація заснована на прилипанні часток, які треба виділити до пухирців газу. Недоліком флотації являються великі втрати біомаси [94].

Центрифугування – процес зневоднення і розділення суспензій на рідку і тверду фази під дією відцентрових сил. Машини для здійснення таких операцій називаються центрифугами, які підрозділяються на фільтруючі, осаджувальні і комбіновані (осаджувально-фільтруючі).

При розділенні суспензії у фільтруючих центрифугах в роторі під дією відцентрових сил відбувається фільтрування рідини через фільтрувальну тканину або через металеву сітку з одночасним затриманням твердої фази; рідка фаза проходить через сито і потім через отвори в роторі викидається в кожух центрифуги, а осад відвантажується або під час обертання ротору, або після його зупинки [95].

Переваги:

1. менші втрати біомаси порівняно з фільтруванням та флотацією;
2. можливість автоматизувати процес;
3. високій фактор розділення;
4. розвинена поверхнею осадження;
5. високий ступінь розділення високодисперсних систем.

У центрифугах відбуваються процеси відстоювання і фільтрації в полі відцентрових сил. Тому центрифуги – це більш ефективні машини для розділення неоднорідних рідких систем порівняно з відстійниками і фільтрами [96].

5.4.2. Підкислення фугату

Після центрифугування фугат перекачують до збірної ємності.

Щоб досягнути ефективного перебігу процесу екстракції коліцину проводять підкислення середовища до значення рН 8,0–8,5. Підкислення розчину краще проводити 2 N соляною кислотою (HCl). Соляна кислота має

широкий спектр застосування та виробляється у великих об'ємах в світі, що робить її однією з найдешевших неорганічних кислот.

5.4.3. Вибір способу виділення цільового продукту з фугату

Метою хімічного очищення є видалення бактеріоцина з нативного розчину, концентрування і звільнення від супутніх домішок завдяки цьому отримують високо очищений препарат. Очищення бактеріоцинів це важливий етап. Насамперед це пов'язано з використанням їх в медичних цілях, що вимагає великого ступеня очищення, а кількість домішок в культуральній рідині іноді може досягати 99%. Щодо Європейської фармакопеї коліцин повинен мати чистоту не менше 93%, а кількість домішок не більше 4% [97].

Наступна стадія це виділення та очищення бактеріоцину з нативного розчину, яке відбувається зазвичай трьома методами:

- 1) екстракція;
- 2) іонний обмін;
- 3) осадження.

Метод *осадження* заснований на тому, що бактеріоцин пов'язують з органічними або неорганічними речовинами з метою отримання з'єднання, що випадає в осад. Отриманий осад за допомогою фільтрів або центрифугування відокремлюють від нативного розчину, промивають і в ряді випадків висушують, після чого утворене з'єднання розкладають і бактеріоцин екстрагують або знову осаджують (кристалізують).

Метод екстракції. Спосіб виділення бактеріоцину, цей процес не потребує значних витрат енергії та не заснований на підвищенні температури і широко застосовується у біотехнологічних процесах.

Процес екстракції буває двох видів одно- та багатоступеневий. Одноступнева екстракція проводиться з використанням ефективних розчинників, які б дозволили за один раз виділити максимально велику кількість цільового продукту з водного розчину. Багатоступенева екстракція проводиться з метою кращого відділення цільового продукту з розчину до розчинника. З

економічної точки зору доцільніше використовувати одноступеневу екстракцію, яка в свою чергу поділяється на періодичну та безперервну. Безперервний спосіб забезпечує більшу швидкість процесу та можливість використання невеликих за розміром апаратів, але на практиці даний спосіб є складним завданням, через неможливість ефективного протікання процесу відстоювання і розшарування систем, а от періодичний спосіб є більш простим та ефективним, тому процес екстракції будемо проводити одноступеневим періодичним способом.

Процес будемо проводити в відцентрових екстракторах. Основною перевагою яких є короткий час контакту обох рідин, що в деяких випадках відіграє істотну роль і визначає перевагу цих апаратів перед екстракторами інших типів. За рахунок чого створюються великі швидкості взаємодії оброблюваних рідин, що забезпечує високу ефективність масообміну та чітку сепарацію вихідних потоків. У зв'язку з цим такі апарати компактні, в них невеликі обсяги беруть участь в масообмінні рідини, мінімальна пожежо- та вибухонебезпечність установок. Оскільки час контакту в цих апаратах невеликий, вони незамінні при обробці нестійких продуктів, а також легко емульгуючих рідин і сумішей компонентів з майже однаковою густиною.

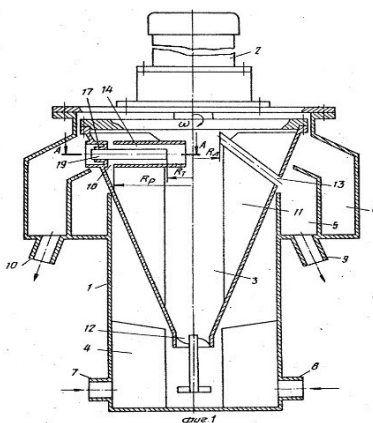


Рис 5.1.Схема відцентрового екстрактора

При екстрагуванні будемо використовувати органічні розчинники, до яких висуваються такі вимоги [98]:

1. вибірковість стосовно цільового компонента;
2. висока екстракційна ємність за цільовим компонентом;
3. легко здійснювана реєстракція;
4. добре розшарування фаз;
5. безпека при роботі;
6. низька собівартість вартість.

Основною вимогою, яка висувається до розчинника є його селективна здатність та нерозчинність у суміші, яку ми екстрагуємо. Із літературних джерел відомо, що екстракцію коліцину можна здійснити етилацетатом та водою. Тому, у якості екстрагента використовують етилацетат, тому що він має низьку переваг:

- Відносно низька вартість;
- Безпечність;
- Нетоксичність;
- Висока екстракційна ємність;
- Легкість випарювання.

Іонообмінна сорбція. Метод полягає в тому, що при пропущенні водних розчинів бактеріоцинів, які є за хімічною природою кислотами, основами або амфотерними сполуками, через колонки з відповідними іонообмінними смолами вони сорбуються на них, а розчин з частиною домішок, що мають протилежний бактеріоцину заряд, проходить через колонку. Смоли в залежності від позитивного або негативного заряду іона, їх називають катіонами або аніонами.

Бактеріоцин у вигляді негативно зарядженого іона буде сорбуватися на катіонідній смолі, позитивно заряджений – на аніоніті. Далі його десорбують і отримують значно очищений і сконцентрований препарат. Потім розчин препарату можна знову пропустити через іонообмінну смолу, що має протилежний заряд. При цьому домішки осядуть на смолі, а розчин більш очищеного бактеріоцину пройде через колонку.

Процес іонообмінної сорбції має багато переваг у використанні:

- висока ступінь очищення продукту;
- високий ступінь поділу, яка дозволяє отримувати особливо чисті речовини;
- відносно швидкий у часі;
- простота апаратного оформлення;
- можливість повної автоматизації;
- економічна вигідність (дана технологія проста і не вимагає дорогого устаткування і сировини);
- безпека для навколишнього середовища.[99]

5.4.4. Вибір способу концентрування цільового продукту та обладнання

Наступним завданням є концентрація цільового продукту. Існують два способи концентрування речовин — це фільтрація (до якої відносять ультрафільтрацію, зворотній осмос, тощо) та упарювання розчинів. Фільтрація в даному випадку не є доцільною, через високу вартість процесу, низьку швидкість протікання процесу та відносно низьку ефективність. А от, процес випарювання є доцільним через свою простоту, швидкість, ефективність та легкість випарювання органічного розчинника [100]. Випарювання буває трьох видів:

- Під надлишковим тиском;
- При атмосферному тиску;
- Під вакуумом.

При використанні вакуумного способу знижується температура кипіння розчину, що дозволяє ефективно проводити видалення вологи з розчинів термолабільної природи. Також цей спосіб є більш економічним та доцільним в даному випадку.

Найбільшого поширення в промисловості отримали випарні апарати, які нагріваються водяною парою. Водяна пара володіє високою питомою теплотою конденсації й високим коефіцієнтом тепловіддачі.

Вакуум-випарні установки класифікують за способом дії – установки неперервної і періодичної дії, за кількістю корпусів розрізняють однокорпусні і багатокорпусні, за конструктивним виконанням нагрівальних поверхонь – установки з трубчастими і пластинчастими калоризаторами; в залежності від нагрівального агента – установки з паровим, аміачним і фреоновим обігрівом; від умов кипіння продукту – циркуляційні і плівкові [100].

Використання багатокорпусних випарних апаратів має деякі переваги над однокорпусними, проте, дана технологія дозволяє використовувати більш прості випарні установки без суттєвих відмінностей результатів, дешевше і доцільніше використовувати однокорпусний випарний апарат [100].

На промислових підприємствах використовують два типи вакуум-випарних апаратів: вертикальні та горизонтальні. Найтипівішим представником є вертикальний апарат з підвісною випарною камерою (рис. 1.2). Він є відносно не дорогим та існують апарати з різними об'ємами. від десятків літрів до десятків кубічних метрів. Підвісна випарна камера дозволяє більш ефективно вилучати тверді частинки з пари.

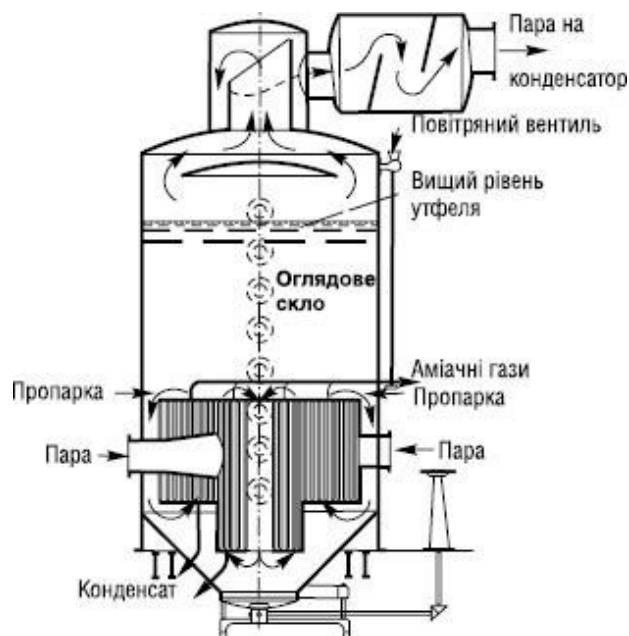


Рис. 5.2. Вакуум-випарний апарат з підвісною випарною камерою.

Основним критерієм потужності випарних апаратів є їхня випарна спроможність – кількість випареного розчинника за годину [101]. Потужність випарювачів залежить від об'єму випарної камери в ньому.

5.4.5. Вибір способу сушіння та сушарки

Після випарювання ми одержуємо концентрат коліцину. Наступною метою є одержання сухого порошку з дуже низьким вмістом води (до 2%). Основним раціональним способом досягнення даної мети є використання методу сушіння. Існує цілий ряд методів сушіння речовин:

- ❖ Конвективне сушіння;
- ❖ Терморадіаційне;
- ❖ Сушіння при нагріванні струмами високих частот;
- ❖ Сублімаційне сушіння.

Дані методи мають свої переваги та недоліки, орієнтовані на специфічні речовини та технологічні процеси, однак, при виборі способу сушіння слід керуватися, насамперед, властивостями цільового продукту та можливістю використання того чи іншого типу сушіння [102]. Найбільш ефективною є сушарка, яка дозволяє проведення процесу сушіння речовин, розпилюючи сушарка (рис. 5.3). Температура сушіння в них становить 50-60 °С, сушильний агент має значно вищу температуру – до 120 °С і вище. За рахунок великої питомої поверхні утворених дрібних крапель швидкість процесу сушіння досить висока. Сушарка обладнана фільтром, що дозволяє затримувати часточки цільового продукту які знаходяться у парі.

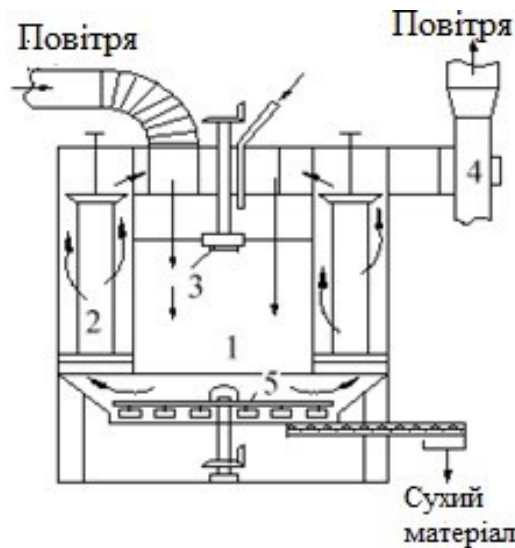


Рис. 5.3. Схема розпилювальної сушарки

1 – камера, 2 – рукавні фільтри, 3 – розпилюючий диск, 4 – вентилятор,
5 – шкребки.

Механізм даного апарату це розпилюючий диск (розпилюючи форсунки). Продуктивність розпилюючих форсунок в сушарці коливається від 5 до 500 кг/год продукту, в залежності від об'єму апарату. Для одержання необхідної кількості сировини.

Розпилювальний спосіб є більш надійний, бо має незначний рівень безпеки забруднення, низьку чутливість системи до абразивного впливу, можливість змінювати швидкість подачі продукту та частоту обертання диску

5.5. Обґрунтування вибору класів чистоти

Однією з найважливіших вимог виробництва якісної продукції є забезпечення якості препаратів за рахунок виконання правил GMP.

Для виробництва капсул необхідне створення приміщень класу чистоти D, що є необхідною умовою для забезпечення стабільності препарату та його тривалого терміну придатності.103]

Приміщення для виробництва і контролю якості лікарських засобів:

- повинні використовуватися тільки за призначенням;
- повинні бути досить просторими і обладнані таким чином, щоб звести до мінімуму ризик змішування різних лікарських засобів і їх компонентів,

перехресне забруднення, пропуск однієї стадії в процесі виготовлення лікарських засобів і контролю їх якості;

- повинні мати гладкі внутрішні поверхні з мінімальною кількістю виступаючих частин і ніш, повинні бути непроникні для рідин та легко доступними для миття та обробки дезінфікуючими засобами. Матеріали, що застосовуються при обробці виробничих приміщень, повинні легко митися;

- повинні міститися в бездоганній чистоті, піддаючись обов'язковому щоденному, а також генеральному прибиранню і періодичному ремонту згідно з відповідними письмовими інструкціями. У цих приміщеннях повинен регулярно проводитися контроль за санітарно-гігієнічним станом під час роботи і в стані спокою, щоб гарантувати відповідність контрольованих параметрів нормам, встановленим у відповідних інструкціях підприємства;

- можуть піддаватися УФ-опроміненню для знезараження повітря за допомогою стаціонарних або переносних опромінювачів (в присутності і у відсутності людей);

- повинні містити мінімально необхідну для ведення виробничого процесу кількість обладнання і меблів;

- повинні мати освітлення, температурний режим, вологість повітря і вентиляцію, що не роблять прямого або непрямого негативного впливу на якість готових продуктів під час їх виробництва, а також на функціонування обладнання та здоров'я персоналу;

Приміщення для пакування лікарських засобів повинні:

- бути просторими, щоб можна було правильно організувати технологічні операції;

- мати обладнання, розташоване таким чином, щоб усунути небезпеку змішування продуктів, особливо на різних етапах упаковки лікарських засобів,

- мати освітлення, температурний режим, вологість повітря і вентиляцію, які не мають шкідливого впливу на якість продукту під час упаковки, а також на функціонування обладнання.

Приміщення для зберігання повинні:

- бути достатньо просторими для проведення розтарування і забезпечення упорядкованого і роздільного зберігання вихідної сировини, допоміжних, пакувальних і маркувальних матеріалів, напівпродуктів, готових лікарських засобів, що знаходяться на карантині,
- забезпечувати надійний захист від розкрадань і випадкового або зловмисного забруднення або зараження;
- відповідати чинним правилам зберігання та поводження з легкозаймистими та вибуховими продуктами виробництва, токсичними і наркотичними речовинами;
- бути чистими та сухими і мати необхідні освітлення, вентиляцію, температуру і вологість повітря. [104]

Підготовка персоналу та одягу

На підприємстві має бути необхідна кількість персоналу, що має відповідну освіту і здатна виконувати виробничі операції або операції з контролю якості, що є однією з умов створення і підтримування на належному рівні системи забезпечення якості. Весь персонал повинен бути зацікавлений в отриманні готового продукту високої якості.

У посадових інструкціях підприємства повинні бути відображені виробничі завдання всіх співробітників, в тому числі керівного персоналу, і області їх відповідальності.

Кожен співробітник повинен бути ознайомлений з основними положеннями GMP, що безпосередньо відносяться до його виробничої діяльності. На початку і протягом подальшої роботи кожен співробітник повинен пройти курс навчання основам GMP, що включає в себе також необхідні знання з гігієни.

Навчання на фармацевтичному підприємстві повинно проводитися згідно з письмовою програмою навчання всіх співробітників, що працюють безпосередньо на виробництві або в контрольних лабораторіях, включаючи осіб,

що займаються технічними питаннями, обслуговуванням устаткування, прибиранням приміщень.

При прийнятті на роботу весь персонал повинен пройти підготовку за фахом, включаючи ознайомлення з правилами GMP. Час від часу персонал повинен проходити перепідготовку. На підприємстві повинна зберігатися документація, яка містить відомості про проходження навчання кожним співробітником протягом усього часу його роботи на підприємстві.. [104]

Людей, які ще не пройшли спеціальну підготовку, не слід допускати до виробничих приміщень. Але в деяких випадках, якщо це необхідно, вони повинні бути проінструктовані заздалегідь про правила поведінки на виробництві.

Особлива увага приділяється підготовці персоналу, що працює в "чистих" приміщеннях. Персонал повинен володіти знаннями і досвідом, які необхідні для виробництва стерильних лікарських засобів, в тому числі знаннями з гігієни та основ мікробіології.

На кожному фармацевтичному виробництві повинна бути складена докладна програма з гігієни, що включає правила дотримання персоналом особистої гігієни, правила гігієни праці та правила використання та носіння технологічного одягу. Ці правила повинні бути зрозумілі кожному співробітнику і точно дотримуватися.

При прийнятті на роботу персонал повинен пройти медичне обстеження. Весь персонал, зайнятий безпосередньо на виробництві, включаючи тимчасово працюючих, повинен проходити регулярні медичні огляди. Персонал, який здійснює візуальний контроль, повинен проходити регулярні огляди лікарями-окулістами.

До роботи, пов'язаної з виготовленням, контролем або зберіганням лікарських засобів, не повинні допускатися носії патогенної мікрофлори і люди, які страждають на алергічні та шкірні захворювання. Тимчасово, до нормалізації стану здоров'я, до роботи не повинні допускатися хворі на інфекційні захворювання або співробітники, які мають ушкодження шкіри різного ступеня.

Персонал, зайнятий в процесі виробництва лікарських засобів, повинен дотримуватися інструкції, які регламентують стан здоров'я і вимоги особистої гігієни.

Персонал повинен доводити до відома свого керівника про будь-які захворювання, здатні негативно впливають на якість лікарських засобів.

Персонал не повинен торкатися руками до вихідної сировини, допоміжних матеріалів, матеріалів первинної упаковки. Також не можна приймати їжу, пити, палити в виробничих приміщеннях і на складах.

Всі люди, що входять у виробничі приміщення, незалежно від того, тимчасово або постійно вони працюють, а також відвідувачі і інспектори повинні суворо дотримуватися правил особистої гігієни, включаючи носіння захисного одягу.

Кожна людина, що входить в виробничі приміщення, повинен бути одягнений в спеціальний одяг. У приміщеннях класу чистоти D потрібно використовувати комбінезон, куртку і штани або халат; шапочку з бавовняних або лляних тканин; відповідне взуття або бахіли, що одягаються зверху на взуття.

Робота повинна проводитися в стерильних рукавицях з гуми або еластичних полімерів, а також в простерилізованій або продезінфікованій взуття. Зверху на взуття повинні бути надіті бахіли, що повністю закривають ступні. Нижня частина штанів повинна бути заправлена в бахіли, а рукави комбінезона - в рукавиці.

Жодна частина тіла або нижньої білизни не повинна бути відкрита. Одяг повинен бути зручним для роботи і приганяє по фігурі.[104]

5.6 Обґрунтування вибору підготовки вентиляційного повітря

Потенційним джерелом забруднення лікарських засобів є повітря виробничих приміщень, тому підготовка вентиляційного повітря є важливою стадією.

Атмосферне повітря містить в собі різні частинки органічного і неорганічного походження, вологу та мікроорганізми.

Очищення повітря, що подається у виробничі приміщення класу чистоти D, проводять по 3-х східчастій системі: попередньої, тонкої і надтонкої.

Виробничі приміщення повинні мати ефективну систему припливної та витяжної вентиляції з контролюючим повітряний потік обладнанням і приладами для вимірювання температури, вологості, ефективності фільтрації і перепаду тиску на фільтрах.

Продуктивність припливних систем вентиляції та кондиціонування повітря треба визначати, виходячи з умов забезпечення необхідних параметрів повітря в робочій зоні з урахуванням прийнятої схеми організації повітрообміну і класу чистоти приміщення.

Повітрозбірники припливної вентиляції треба розташовувати в місцях з максимальною чистотою повітря з урахуванням напрямків панівних вітрів.

Системи підготовки вентиляційного повітря повинні забезпечувати його чистоту в "чистих" приміщеннях відповідно до таблиці і підтримувати позитивний перепад тиску по відношенню до оточуючих приміщень більш низького класу чистоти. Сусідні приміщення різних класів чистоти повинні мати перепад тиску - 10-15 Па. [105]

Внутрішні і зовнішні поверхні фільтрокамер і повітропроводів вентиляційних установок "чистих" приміщень повинні мати покриття, що допускає їх обробку дезінфікуючим розчином.

Очищення витяжного повітря повинне здійснюватися через фільтри тонкої очистки для захисту навколишнього середовища від можливих шкідливих викидів з виробничих приміщень.

При необхідності виробничі приміщення повинні бути обладнані системою кондиціонування повітря приточування, яка повинна:

- забезпечувати відповідний ступінь очищення повітря від механічних частинок і мікроорганізмів;

- автоматично регулювати кліматичні параметри (температуру і відносну вологість повітря) для створення найбільш сприятливих умов для технологічного процесу та обслуговуючого персоналу;

- виключити виникнення статичної електрики і пов'язаного з ним накопичення пилу;

- характеризуватися низьким рівнем шуму під час роботи;

- конструювати з використанням матеріалів і антикорозійного покриття, стійких до дезінфікуючих засобів, і непилящих. [106]

Обов'язковим елементом схеми підготовки повітря є наявність центрального кондиціонера, який є загальним елементом, як для схем індивідуальної підготовки повітря для приміщень одного класу, так і для схем сумісної підготовки повітря для приміщень різного класу чистоти. В кондиціонер поступає повітря після попередньої очистки на фільтрі грубої очистки.

Необхідною є наявність системи рециркуляції повітря, яка дозволяє суттєво знизити витрати на багатоступеневу очистку атмосферного повітря.

Кожне чисте приміщення має свою автономну систему термінальної очистки вентиляційного повітря.

Схема очистки повітря наступна. Атмосферне повітря проходить очистку на фільтрах першої ступені, в якості фільтра можливе використання мішечних або коміркових фільтрів типу ФЯПБ, ФЯУБ, ФАРБ, ФЯВБ, які відрізняються природою наповнювача (пінополіуретан, металеві сітки, волокна). Основна функція фільтрів першої ступеню – видалення великих часток пилу для попередження абразивного пошкодження вентилятора. Ефективність очистки повинна складати 70% по часткам. Для регенерації сухих фільтрів використовують продування або чистку пилососом. Коміркові фільтри миють, а потім сушать. В якості робіт по попередній підготовці проводиться дезінфекція систем повітроводів розчином формаліну.

Повітря надходить у фільтр грубого очищення, потім в центральний кондиціонер, де послідовно піддається нагріванню, охолодженню і знову нагріванню, потім надходить в парозволожувач і через вентилятор в фільтр тонкого очищення, потім – в високоефективний фільтр.[106]

5.7 Обґрунтування вибору підготовки води очищеної

Для миття матеріалів первинної упаковки і обладнання повинна використовуватися вода очищена.

Для приготування нестерильних лікарських засобів, останнього ополіскування матеріалів первинної упаковки, обладнання та поверхонь, що контактують з нестерильними лікарськими засобами та напівпродуктами, повинна використовуватися - вода очищена.

Устаткування, що застосовується для отримання води очищеної має монтуватися і експлуатуватися таким чином, щоб забезпечити отримання води необхідної якості. Умови отримання, зберігання і розподілу води повинні перешкоджати зростанню м/о.

На стадіях основного виробництва та для проведення деяких допоміжних робіт використовується вода очищена. Джерелом одержання води очищеної є вода питна.

Підготовка очищеної води здійснюється при застосуванні установки для пом'якшення води і установки зворотного осмосу.

На першій стадії вода проходить через пісочний фільтр, де відбувається очищення від механічних домішок, після цього вона потрапляє через вугільний фільтр, що дозволяє знизити концентрацію органічних речовин і хлору, потім вода направляється до установки пом'якшення води.

Пом'якшення – це процес видалення катіонів кальцію й магнію, що спричиняють жорсткість води. Залежно від складу вихідної води й вимог, пропонованих до технологічної води, пом'якшення роблять декількома способами: термічним, хімічним (реагентним), зворотньоосмотичним (мембранним) . [107]

Термічний метод пом'якшення води заснований на зниженні розчинності діоксиду вуглецю при підвищенні температури, що приводить до зрушення вуглекислотної рівноваги й утворенню карбонату кальцію, що випадає в осад. Внаслідок високої енергоємності даний спосіб не одержав широкого поширення на території СНД.

Серед реагентних способів пом'якшення води найбільш відомий вапняно-содовий. Пом'якшення води цим способом засновано на переведенні розчинних у ній кальцієвих солей карбонатної (тимчасовий) жорсткості $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ в присутності розрахункової кількості гашеного вапна (гідроксиду кальцію – $\text{Ca}(\text{OH})_2$) у нерозчинну сіль CaCO_3 . Незважаючи на високу результативність знесолення, спосіб не позбавлений недоліків: тривалість процесу формування й осадження осаду, велика витрата реагентів, більші габарити технологічного устаткування.

При використанні іонообмінного способу зниження жорсткості води відбувається за рахунок здатності деяких природних або синтетичних з'єднань, практично нерозчинних у воді, обмінювати іони, що перебувають у їхньому складі, Na^+ або H^+ на іони Mg^{2+} і Ca^{2+} , що спричиняють жорсткість води. Спосіб простий, компактний технічно, дешевий, у зв'язку із чим найпоширеніший.

Для остаточної очистки води використовується кілька методів – зворотній осмос, іонний обмін та електродеіонізація.

Іонний обмін є одним з ефективних методів видалення з води аніонів та катіонів. Це одна з найважливіших стадій очищення, яка використовується як етап попереднього очищення, так і для отримання води очищеної. Іонний обмін заснований на використанні іонітів - сітчастих полімерів різного ступеня зшивання, гелевою мікро- або макропористою структури, ковалентно пов'язаних з іоногенними групами.

Перевагами іонного обміну є малі капітальні витрати, простота, відсутність принципів обмежень для досягнення більшої продуктивності.

Зворотний осмос забезпечує найтонший рівень фільтрації. Зворотньоосмотична мембрана діє, як бар'єр для розчинних солей, неорганічних і органічних молекул, а також для мікроорганізмів і пірогенних речовин. В середньому вміст розчинених речовин після стадії зворотного осмосу знижується до 1-9%, органічних речовин - до 5%, колоїдні частинки, мікроорганізми, пірогени відсутні. Вода, що отримується зворотним осмосом, містить мінімальну кількість загального органічного вуглецю.

Перевагами зворотного осмосу є:

- простота і незалежність від вмісту солі вихідної води,
- низькі енергетичні витрати і невисокі втрати на сервіс і технічний догляд,
- система досить легко піддається мийці, дезінфекції та очищенню, не вимагає використання сильних хімічних реагентів і необхідності їх нейтралізації.
- висока економічна ефективність – заміна першого ступеня іонообмінної демінералізації на зворотньоосмотичну дозволяє на 90-95% знизити потребу в кислоті і каустику, що по вартості в багато разів перекриває збільшення затрат, зв'язаних з ростом енергоспоживання; [108]

Для остаточної очистки води краще вибрати зворотній осмос, оскільки він дозволяє максимально очистити воду, він є досить простим та надійним методом, а також економічно вигідним.

Воду очищену зберігають в закритих ємкостях, виготовлених з матеріалів, які відповідають нормативним документам і захищають її від чужорідних частинок і мікробіологічних забруднень. Ємкість для зберігання води повинна бути оснащена мішалкою, сорочкою для подачі пару і холодної води, системою зрошування для забезпечення безперервного змочування всієї внутрішньої поверхні ємкості, системою термостатування, гідрофобним повітряним фільтром, підливною мембраною, манометром, системою регулювання рівня.

5.8 Обґрунтування вибору первинної упаковки ЛЗ

Найчастіше капсули упаковують у блістера або пластмасові флакони. Порівняння даних типів первинної упаковки наведено у таблиці

Порівняння типів первинної упаковки для капсул

Характеристика	Блістер	Флакони пластиковий
Розміщення капсул у упаковці	Кожна капсула знаходиться у окремій комірочці і відокремлена від інших капсул	Всі капсули знаходяться разом у одному флаконі, і не відокремлені від інших капсул
Компактність	У блістері можна помістити невелику кількість капсул (10-20)	У флаконі можна помістити велику кількість капсул (близько 100)
Зручність використання	Блістер легкий, його буде зручніше носити з собою	Скляні флакони незручно брати з собою, тому що він може розбитися
Зберігання і транспортування	Може пошкодитися під час зберігання і транспортування.	Найнадійніший варіант фасування, не боїться транспортування і зберігання в практично будь-яких умовах.

Отже, зробивши висновок з даного порівняння типів первинної упаковки доцільніше буде використовувати блістер, так як кожна капсула знаходиться окремо, в своїй комірці, та блістер буде зручніше носити з собою.

РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ

6.1. Специфікація обладнання ділянки виробничого біосинтезу

Специфікація обладнання зображеного на апаратурній схемі, наведена в *табл.*

6.1

Таблиця 6.1

Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу

ПЗ-1	Повітрязабірник	1	Обладнений металевою сіткою для видалення механічних забруднень
Ф-2	Фільтр грубої очистки	1	Фільтр ФПО FA-3 «Уралкомпрессормаш» (Росія), 138x385x424 мм, площа фільтрації 3 м ² , корпус нержавіюча сталь, матеріал – волокнистий, швидкість фільтрування 0,1 м/с, E = 80 % [109]
К-3	Компресор	1	Компресор GX7 фірми AtlasCopco (Швеція), потужність 14 л/с, робочий тиск 1 МПа, 620x700x1260 мм, високоякісна нержавіюча сталь [110]
Т-4	Теплообмінник охолоджувач	1	Осушувач OV 42 «АСО» (Росія), пропускна здатність 700 л/хв, робочий тиск 16 бар, 440x570x440 мм, високоякісна нержавіюча сталь, потужність 0,2 кВт [111]
Р-5	Ресивер	1	Ресивер вертикальний РВ 110/10 «АСО» (Росія), об'єм 110 л, робочий тиск 10 бар, 600x600x1000 мм, високоякісна нержавіюча сталь [112]
Т-6	Теплообмінник нагрівач	1	Теплообмінник HF75 «Pahlen» (Швеція), пропускна здатність 600 л/хв, робочий тиск 10 бар, 702x139 мм, високоякісна нержавіюча сталь, потужність 75 кВт [113]

НУХТ БТЕК 02.02.10 КР ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.		Ширай В.О..		
Керівник		Стабніков В.П.		
Консультант				
Н. Контр.				
Затверд.		Стабніков В.П.		
Розділ 6. Опис технологічного процесу виробничого біосинтезу				
		Літ.	Арк.	Акрушів
			81	29 81
Кафедра БТМ				

Ф-7	Фільтр головний	1	Фільтри ФТОП Н12 СКБ Технофільтр (Україна), 305x305x78 мм, площа фільтрації 2,7 м ² , пропускна здатність 270 м ³ , корпус нержавіюча сталь, матеріал мікроскловолокно, E = 95% [114]
Ф-8 Ф-11 Ф-12 Ф-15	Індивідуальний фільтр	4	Фільтри НЕРА Н14 СКБ Технофільтр (Україна), 305x305x78 мм, площа фільтрації 2,7 м ² , пропускна здатність 270 м ³ , корпус нержавіюча сталь, матеріал мікроскловолокно, E = 99,999 % [116]
Р-9	Реактор змішувач	1	Реактор об'ємом 6 л, з сорочкою із нержавіючої сталі, з перемішувачем пристроєм, потужність 0,75 кВт, оснащений гвинтовою мішалкою, швидкість перемішування 100 об/хв [115]
Р-10	Реактор змішувач	1	Реактор об'ємом 6 л, з сорочкою із нержавіючої сталі, з перемішувачем пристроєм, потужність 0,75 кВт, оснащений гвинтовою мішалкою, швидкість перемішування 100 об/хв [115]
ІН-13	Ферментер (інокулятор)	1	Ферментер об'ємом 10 л із нержавіючої сталі, швидкість перемішування 220-250 об/хв «BIORUS» [117]
ФР-16	Ферментер	1	Ферментер об'ємом 100 л із нержавіючої сталі, швидкість перемішування 220-250 об/хв «BIORUS» [118]
Н-17	Насос відцентровий	1	Відцентровий насос фірми РСМ серії Delasco (Франція), продуктивністю до 15 л/хв для об'єму 60 л, високоякісна нержавіюча сталь [119]

6.2 Опис технологічної схеми виробничого біосинтезу

Технологічна схема біосинтезу коліцину включає допоміжні роботи, це санітарна підготовка виробництва, підготовка аераційного повітря, приготування та стерилізація допоміжних речовин та поживного середовища, і технологічні процеси - підготовка посівного матеріалу та виробничий біосинтез бактеріоцину.

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

ДР 1.1. Підготовка виробничого обладнання

ДР 2. Підготовка аераційного повітря

ДР 3 Приготування та стерилізація титрувальних розчинів

ДР 3.1. Приготування та стерилізація 6% розчину NaOH для ферментера об'ємом 100 л

На технічних вагах зважуємо 7,2 г сухого NaOH, наважку переносимо у колбу об'ємом 150 мл та додаємо піпеткою 112,8 мл дистильованої води, скляною паличкою перемішуємо. Розчин гідроксиду натрію стерилізуємо в автоклаві при температурі 131°C протягом 40 хвилин, тиск $P = 0,15$ МПа. Після стерилізації, титрувальний розчин подаємо для контролю рН до ферментера до етапу ТП 6.1.

ДР 3.2. Приготування 6% розчину HCl для ферментера об'ємом 100 л

В мірному циліндрі відміряємо 20,4 мл 36%-го розчину HCl, об'єм дистильованої води відміряємо в окремому мірному циліндрі 99,6 мл та переносимо у колбу об'ємом 150 мл. Відважений розчин кислоти додаємо у колбу з дистильованою водою, перемішуємо скляною паличкою. 6% розчин соляної кислоти не стерилізуємо. Для контролю рН титрувальний агент подаємо до ТП 6.1.

ДР 4. Приготування та стерилізація поживного середовища

ДР 4.1. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалці

Для вирощування інокуляту в колбах на качалці необхідно приготувати 545 мл поживного середовища. Як джерело вуглецю в середовище вноситься гліцерин, як джерело азоту – м'ясний екстракт та дріжджовий екстракт. Вміст компонентів для приготування 545 мл поживного середовища наведено в *таблиці 6.1*.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 545 мл поживного середовища

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Вміст компонента у 545 мл середовища, г (мл)	Композиція	Об'єм композиції, мл
Гліцерин	50,0	27	А	27
М'ясний екстракт	1,0	0,5	Б	269
Питна вода		58		
Дріжджовий екстракт	2,0	1,0		
Питна вода		66		
Пептон	5,0	2,5		
Питна вода		141	В	143,5
NaCl	5,0	2,5		
Питна вода		141		
Мітоміцин С	0,002	1 мг	Г	106
Питна вода		106		
				Всього: 545 мл

ДР 4.1.1 Приготування і стерилізація композиції А

На аналітичних терезах у відтаровану ємність зважують 27 мл гліцерину. Поміщаємо у колбу об'ємом 50 мл та закриваємо колбу ватно-марлевою пробкою. Стерилізацію не потрібно проводити. Приготований розчин відправляють до етапу *ТП 5.4.*

ДР 4.1.2 Приготування і стерилізація композиції Б

На аналітичних вагах у відтаровану ємність зважують 0,5 г м'ясного екстракту, 1 г дріжджового екстракту та 2,5 г пептону. Наважку переносимо у колбу об'ємом 300 мл, та вносимо 265 мл дистильованої води, перемішуємо скляною паличкою. Закриваємо колбу ватно-марлевою пробкою та отриманий розчин стерилізуємо в

автоклаві при 112°C впродовж 30 хвилин (тиск 0,05 МПа). Композиція Б переходить до етапу культивування в колбах на качалці до *ТП 5.4*.

ДР 4.1.3 Приготування і стерилізація композиції В

На аналітичних вагах у відтаровану ємність зважуємо 2,5 г NaCl, розчиняємо 141 мл дистильованої води у колбі об'ємом 200 мл. Колбу закриваємо ватно-марлевою пробкою та стерилізуємо у автоклаві при температурі 131°C протягом 40 хв (тиск 0,15 МПа). Композиція В переходить до етапу культивування в колбах на качалці до *ТП 5.4*.

ДР 4.1.4 Приготування і стерилізація композиції Г

На аналітичних вагах у відтаровану ємність зважуємо 1 мг мітоміцину С, розчиняємо 106 мл дистильованої води у колбі об'ємом 150 мл. Колбу закриваємо ватно-марлевою пробкою та стерилізуємо у автоклаві. Розчини композицій А, Б, В та Г зливають в одну колбу і культивують (*ТП 5.4*).

ДР 4.2 Приготування і стерилізація поживного середовища в посівному апараті об'ємом 10 л.

Для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 10 л необхідно приготувати 5,8 л поживного середовища. Як джерело вуглецю в середовище вноситься гліцерин, як джерело азоту – м'ясний екстракт та дріжджовий екстракт. Вміст компонентів для приготування 5,8 л поживного середовища наведено в *таблиці 6.2*.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 5,8 л поживного середовища

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Вміст компонента у 5,8 л середовища, г (мл)	Композиція	Об'єм композиції, мл
Гліцерин	50,0	290	А	290
М'ясний екстракт	1,0	5,8	Б	2 847
Питна вода		350		
Дріжджовий екстракт	2,0	12		
Питна вода		700		
Пептон	5,0	29		
Питна вода		1 750		
NaCl	5,0	29	В	2 029
Питна вода		2 000		
Мітоміцин С	0,002	0,01		
Питна вода		54	Г	54
Конденсат				580
				Всього: 5 800 мл

ДР 4.2.1 Приготування і стерилізація композиції А

На аналітичних терезах у відтаровану ємність зважують 290 мл гліцерину. Розчин поміщаємо у колбу об'ємом 350 мл та закриваємо колбу ватно-марлевою пробкою. Стерилізацію не потрібно проводити. Приготований розчин через засівний пристрій подіємо самопливом у посівний апарат об'ємом 10 л до етапу *ТІІ 5.5*.

ДР 4.2.2 Приготування і стерилізація композиції Б

На аналітичних вагах у відтаровану ємність зважують 5,8 г м'ясного екстракту, 12 г дріжджового екстракту та 29 г пептону. Наважку переносимо у колбу об'ємом 3,5 л, та вносимо 2,8 л дистильованої води, перемішуємо скляною паличкою для

кращого розчинення. Закриваємо колбу ватно-марлевою пробкою та отриманий розчин стерилізуємо в автоклаві при 112°C впродовж 30 хвилин (тиск 0,05 МПа). Композицію Б через засівний пристрій подаємо самопливом у посівний апарат об'ємом 10 л до етапу *ТП 5.5*.

ДР 4.2.3 Приготування і стерилізація композиції В

На аналітичних вагах у відтаровану ємність зважуємо 29 г NaCl, розчиняємо у 2 л дистильованої води у колбі об'ємом 2,5 л. Переносимо розчин у засівну колбу та подаємо самопливом у посівний апарат об'ємом 10 л. Стерилізуємо у посівному апараті подачею гострої пари у сорочку апарата – температура 131°C протягом 40 хвилин (тиск 0,15 МПа). Простерилізований розчин охолоджуємо холодною водою, що подаємо у сорочку інокулятора. Композиція В переходить до етапу культивування в посівному апараті об'ємом 10 л до *ТП 5.5*. Під час стерилізації спостерігається виділення конденсата що вивільняється через окремий патрубок.

ДР 4.2.4 Приготування і стерилізація композиції Г

На аналітичних вагах у відтаровану ємність зважуємо 0,01 г мітоміцину С та розчиняємо у 54 мл дистильованої води у колбі об'ємом 100 мл. Колбу закриваємо ватно-марлевою пробкою та стерилізуємо у автоклаві. Розчини композицій А, Б та Г зливають в одну засівну колбу і подаємо самопливом у посівний апарат об'ємом 10 л до етапу культивування *ТП 5.5*.

ДР 4.3 Приготування і стерилізація поживного середовища у ферментер об'ємом 100 л.

Для вирощування інокуляту в ферментері об'ємом 100 л необхідно приготувати 57 л поживного середовища. Як джерело вуглецю в середовище вноситься гліцерин, як джерело азоту – м'ясний екстракт та дріжджовий екстракт. Вміст компонентів для приготування 57 л поживного середовища наведено в *таблиці 6.3*

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 57 л поживного середовища

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Вміст компонента у 57 л середовища, г (мл)	Композиція	Об'єм композиції, мл
Гліцерин	50,0	2 900	А	2 900
М'ясний екстракт	1,0	57	Б	28 055
Питна вода		3 500		
Дріжджовий екстракт	2,0	114		
Питна вода		6 799		
Пептон	5,0	285		
Питна вода		17 300		
NaCl	5,0	285	В	20 285
Питна вода		20 000		
Мітоміцин С	0,002	0,1	Г	60
Питна вода		60		
Конденсат				5 700
				Всього: 57 000 мл

ДР 4.3.1 Приготування і стерилізація композиції А

На технічних терезах у відтаровану ємність зважують 2,9 л гліцерину. Розчин поміщаємо у колбу об'ємом 3 л та закриваємо колбу ватно-марлевою пробкою. Стерилізацію не потрібно проводити. Приготований розчин через засівний пристрій подіємо самопливом у ферментер об'ємом 100 л до етапу *ТП 6.1*.

ДР 4.3.2 Приготування і стерилізація композиції Б

На об'ємно-ваговому дозаторі зважуємо 57 г м'ясного екстракту, 114 г дріжджового екстракту та 285 г пептону. Переносимо через патрубок у реактор-змішувач об'ємом 35 л та додаємо 28,1 л питної води, вмикаємо мішалку та ретельно

перемішуємо. Отриманий розчин стерилізуємо подачею гострої пари при 112°C впродовж 30 хвилин (тиск 0,05 МПа). Утворений конденсат відводимо через окремий патрубок. Композицію Б подаємо самопливом у ферментер об'ємом 100 л до етапу культивування *ТП 6.1*.

ДР 4.3.3 Приготування і стерилізація композиції В

На об'ємно-ваговому дозаторі зважуємо 285 г NaCl, додаємо у реактор-змішувач 20 л питної води, вмикаємо мішалку та ретельно перемішуємо. Переносимо через патрубок самопливом у ферментер об'ємом 100 л. Стерилізуємо подачею гострої пари у сорочку посівного апарата – температура 131°C протягом 40 хвилин (тиск 0,15 МПа). Простерилізований розчин охолоджуємо холодною водою, що подаємо у сорочку ферментера. Композиція В переходить до етапу культивування до *ТП 6.1*. Під час стерилізації спостерігається виділення конденсата що вивільняється через окремий патрубок.

ДР 4.3.4 Приготування і стерилізація композиції Г

На аналітичних вагах у відтаровану ємність зважуємо 0,1 г мітоміцину С та розчиняємо у 60 мл дистильованої води у колбі об'ємом 100 мл. Колбу закриваємо ватно-марлевою пробкою та стерилізуємо у автоклаві. Розчин композиції Г подаємо самопливом у ферментер об'ємом 100 л до етапу культивування *ТП 6.1*.

ТП 5. Підготовка посівного матеріалу

ТП 5.1. Підтримання колекційної культури

Колекційну культуру *E. coli* UTI зберігають при температурі – 4 °C у пробірках зі скошеним м'ясо-пептонним агаром. Пересіви здійснюють кожні 3–4 місяці. Всі роботи з колекційною культурою проводяться строго в асептичних умовах.

ТП 5.2. Одержання робочої культури на агаризованих середовищах

Колекційну культуру, що зберігається в пробірках з м'ясо-пептонним агаром, розсівають петлею до ізольованих колоній на чашки Петрі із МПА.

ТП 5.3. Вирощування культури на агаризованих середовищах

Отримані ізольовані колонії (*від ТП 5.2*) пересівають петлею в пробірки зі скошеним м'ясо-пептонним агаром. Зазначимо, що одна ізольована колонія

використовується для засіву тільки однієї пробірки. А тривалість вирощування – 40 год, при температурі 37°C.

ТП 5.4 Вирощування культури в колбах на качалках

Для вирощування *E. coli* UTI, у колбу об'ємом 1 л, в асептичних умовах вносять 27 мл розчину композиції А (від ДР 4.1.1), 269 мл розчину композиції Б (від ДР 4.1.2), 143,5 мл розчину композиції В (від ДР 4.1.3) та 106 мл композиції Г від ДР 4.1.4. Перемішуємо і розливаємо по 100 мл в стерильні качалочні колби, об'єм яких становить 750 мл кожна.

У пробірку з робочою культурою, вирощену на м'ясо-пептонному агарі, вносимо по 5 мл фізіологічного розчину, суспендуємо клітини, піпеткою відбираємо одержану бактеріальну суспензію (від ТП 5.3) і вносимо у колби (750 мл) з розлитим поживним середовищем. Культивування триває 15 годин при 37°C та швидкість перемішування становить 220 об/хв.

ТП 5.5 Вирощування культури в посівному апараті об'ємом 10 л.

Після вирощування культури *E. coli* UTI в колбах на качалці від ТП 5.4, посівний матеріал вносимо через окремий патрубок в асептичних умовах у посівний апарат об'ємом 10 л. Подаємо 290 мл композиції А зі збірника Р11 (від ДР 4.2.1), 2,8 л композиції Б та 54 мл композиції Г (від ДР 4.2.2 та ДР 4.2.4.), що також вносять під факелом з посівних колб в інокулятор об'ємом 10 л. Вмикаємо мішалку - швидкість перемішування дорівнює 220 обертів за хвилину. В сорочку інокуляторі подається глуха пара для підтримки необхідної температури - 37°C. Вмикаємо датчики температури, манометр, рН-метр та ін. рН контролюємо за допомогою 6%-го розчину NaOH та 6%-го розчину HCl. Аерація відбувається з підготовленим повітрям. Тривалість культивування становить 15 години. Після закінчення культивування, посівний матеріал перекачуємо за допомогою труби перетискування до ферментера об'ємом 100 л (до ТП 6.1).

ТП 6. Біосинтез

ТП 6.1 Виробниче культивування

Виробничий біосинтез здійснюється у ферментері з робочим об'ємом 60 л. У простерилізований ферментер вносимо самопливом 2,9 л композиції А (від ДР 4.3.1), 28 л композиції Б (від ДР 4.3.2), 60 мл композиції Г (від ДР 4.3.4) та посівний матеріал (від ТП 5.5). Включаємо мішалку зі швидкістю перемішування 220 обертів та хвилину. Потім вмикаємо датчики температури, манометр, рН-метр та ін. Наступним є підтримка температурного режиму, для цього у сорочку ферментера подаємо глуху пару, що потім конденсується та відводиться через окремий патрубок. Тривалість культивування бактерій для досягнення максимального виходу коліцину становить 15 год, $t = 37^{\circ}\text{C}$, рН – 7,0 (контроль проходить за присутності титрувального агента, а саме перекачування самопливом 6% розчину NaOH від ДР 3.1. та 6% розчину HCl від ДР 3.2). Аерація відбувається з підготовленим повітрям. Вихід коліцину 0,52 г/л. Культуральна рідина, що йде на інші етапи виділення перекачується насосом.

ТП 7. Відділення біомаси

ТП 7.1. Підготування культуральної рідини для центрифугування

Культуральну рідину перекачують до Р-33, вмикають перемішуючий пристрій (100 об/хв). Додають соляну кислоту до рН=4,0 через дозатор Д-34, відповідно. Тривалість перемішування становить 10 хв. Отриманий розчин подають у центрифугу Ц-36 (до ТП 7.2).

ТП 7.2. Центрифугування обробленої культуральної рідини

Культуральну рідину розділяють на біомасу і нативний розчин за допомогою фільтрувальної центрифуги Ц-36. Під час центрифугування контролюють $n=8000$ об/хв. Фугат, що виділяється під час центрифугування збирається у збірнику ЗБ-38 до закінчення стадії. Далі розчин подають на стадію очищення до екстрактора Е-40 (до ТП 8.1), осад подають до ЗВ 10.2.

ТП 8. Іонообмінна сорбція та концентрування фугату

ТП 8.1. Іонообмінна сорбція фугату

Отриманий фугат подають (від ТП 7.2) на іонообмінну колонку, яка містить негативнозаряджену іонообмінну смолу. Розчин, що містить коліцин,

пропускають через колонку, де він абсорбується на смолі. Після пропускання розчину колонка промивається очищеною водою. Коліцин вимивається з колонки пропусканням розчину аміаку. Очищений розчин коліцину збирається у збірнику (ЗБ-42) і по закінченню процесу подається на вакуум-випарювання (до ТП 8.2).

ТП 8.2. Вакуум-випарювання екстракту

Екстракт після екстрагування (від ТП 7.1) подають до вакуум-випарного апарату ВВА-44, де за допомогою насиченої пари фільтрат позбавляється зайвої вологи. Фільтрат упарюється в 2 рази вмісту коліцину при температурі 40 - 50°C. Далі готовий концентрат коліцину до закінчення процесу зберігається у збірнику (ЗБ-46) і по закінченню процесу подають на сушіння (до ТП 9.1).

ТП 9. Отримання порошку коліцину

ТП 9.1. Висушування концентрату коліцину

Отриману концентрат (від ТП 8.2), піддають сушінню на розпилювальній сушарці (С-50) за температури теплоносія (гарячого повітря) 140°C на вході та 75 – 85 °C на виході. Отриманий висушений продукт передають на стадію пакування та маркування.

ПМВ 10. Пакування, маркування. Відвантаження

ПМВ 10.1. Фасування у мішки

Коліцин фасують у 1 кг мішки із поліетиленової плівки. Поліетиленові мішки термоспаюють та упаковують в крафт-мішки. Паперові мішки склеюють.

ПМВ 10.2. Маркування

На кожен мішок наноситься назва та марка препарату, підприємства-виробника, маса нето, номер партії, термін та умови зберігання, попереджувальні написи: «Зберігати із обережністю, у сухих місцях без прямого сонячного світла».

6.3 Контроль ділянки біосинтезу

Мікробіологічний контроль передбачає: забезпечення і підтримання умов, необхідних для нормальної життєдіяльності мікроорганізмів-продуцентів; контроль виробничого процесу та готової продукції; своєчасне виявлення контамінації та встановлення джерела її появи .

Упродовж культивування періодично відбирають проби культуральної рідини для мікробіологічного контролю, визначення концентрації біомаси і цільового продукту.

Мікробіологічний контроль здійснюється розсівом на чашки Петрі з агаризованим середовищем і подальшим мікроскопіюванням.

Культуральну рідину розсівають петлею до ізольованих колоній на чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром (МПА) – для виявлення бактерій та сушло-агаром для виявлення грибів та дріжджів.

6.3.1 Мікробіологічний контроль

Мікробіологічний контроль здійснюють для перевірки стерильності поживного середовища (композицій) перед засівом посівної культури та якості отриманого посівного матеріалу в процесі його вирощування.

Він проводиться двома методами: прямим мікроскопіюванням відібраних проб - метод «роздавленої краплі» (композицій поживного середовища та посівного матеріалу на всіх етапах культивування) та методом розсіву проб на Чашки Петрі з агаризованим середовищем.



Рис 6.1. *E.coli* на Чашці Петрі

Препарат готують на знежиреному предметному склі. На знежирене предметне скельце наносять маленьку краплю проби простерилізованого поживного середовища, після чого накривають покривним скельцем і мікроскопіюють з об'єктивом 40×, або з імерсійною системою на 90. Результатом мікробіологічного аналізу при прямому мікроскопіюванні проб компонентів поживного середовища має бути *відсутність* у полі зору мікроскопа *любої мікробіоти*.

Результатом мікробіологічного контролю композицій поживного середовища методом розсіву проб на Чашки Петрі з агаризованим середовищем має бути *відсутність росту будь якої мікробіоти на чашках Петрі*.

Для перевірки якості посівного матеріалу теж використовують метод прямого мікроскопіювання, через те, що метод висіву на щільні поживні середовища є затратним.

Принцип визначення. Готується препарат фіксованих забарвлених клітин метиленовим синім з подальшим мікроскопіювання з імерсією. За допомогою бактеріологічної петлі чи стерильної піпетки здійснюють нанесення на знежирене предметне скельце краплю досліджуваної суспензії мікроорганізму, та рівномірно розподіляють по скельцю, обов'язково тонким шаром на площі 1-2 см². Потім готовий мазок фіксують і підсушують. Після чого на мазок наноситься барвник метиленовий синій 2-3 краплі і тримають його 2-3 хв, потім препарат висушують на повітрі і протирають фільтрувальним папером. Проводять мікроскопіювання з імерсією [119].

В полі зору мікроскопа має бути лише культура продуцента і *відсутня стороння мікробіота*, яку відрізняють від культури продуцента за його морфологічними ознаками .

6.3.2. Показники росту і синтезу

Концентрація біомаси. Концентрацію біомаси визначають за оптичною густиною клітинної суспензії на фотоелектроколориметрі, тобто непрямим

методом з наступним пререрахунком отриманих даних на суху біомасу клітин за допомогою калібрувального графіка [120].

Кількість живих клітин.

Датчик AberFutura. За допомогою датчика AberFutura проводять визначення кількості живих клітин. Монітор біомаси Aber широко визнаний стандартом в режимі онлайн приладів для вимірювання життєздатної біомаси і був розроблений для задоволення вимог GAMP4. Це дозволяє в режимі реального часу точно вимірювати біомасу в біореакторах як в лабораторних, так і в промислових масштабах. Унікальний зонд, придатний для GMP, застосовує радіочастотне поле до біомаси в біореакторі. Вихід - це точне вимірювання концентрації життєздатних клітин [121].

Принцип роботи якого полягає в тому, що кожна жива клітина, з цілісною плазматичною мембраною, створює певний заряд. Електричний струм породжується датчиком Aber, який поляризує живі клітини з неушкодженою мембраною, яка не проникна для заряду (діелектрик), тим самим обмежуючи вільну частину іонів. Діелектрична природа плазматичної мембрани дозволяє заряду накопичуватися. Згідно використання цього датчика, отримуються надзвичайно точні результати через те, що заряд прямо пропорційний об'єму клітин, що містять непошкоджену мембрану і є залежним від типу клітини. На відміну від інших методів вимірювання біомаси, цей метод не вимірює мертві клітини, бульбашки газу, сміття або мікроносії. [121]

6.3.3 Визначення концентрації амінного азоту

Дріжджовий екстракт є джерелом амінного азоту у середовищі. Вміст амінного азоту можна визначити мідним способом.

Культуральну рідину центрифугують при 13200 об/хв. протягом 10 хв. У мірну колбу місткістю 50 мл вносять 5 мл супернатанту. Додають 2-3 краплі тимолфталейну і 2-3 краплі 1 М розчину NaOH до появи блідо-блакитного забарвлення. У кілька прийомів, при перемішуванні, додають 15 мл суспензії фосфату міді (що складається з хлориду міді, тризаміщеного фосфату натрію і

боратного буферного розчину у співвідношенні 1:2:2), потім вміст колби доводять до мітки дистильованою водою. Суміш перемішують і фільтрують через паперовий фільтр, повертаючи на фільтр перші порції фільтрату.

10 мл прозорого фільтрату поміщають в конічну колбу місткістю 150 мл і додають 0,5 мл 80% оцтової кислоти, 1 г або 10 мл 10% розчину KI. Вміст колби перемішують і вільний йод, який виділився, відтитровують 0,01 М розчином тіосульфату натрію, додаючи в кінці титрування 1-2 краплі 1% розчину крохмалю. Кінець титрування визначають по зникненню синього забарвлення розчину.

Вміст амінного азоту в 100 мл культуральної рідини визначають за формулою:

$$x = \frac{a \cdot 0,28 \cdot 20}{100}$$

де а – об'єм 0,01 М розчину тіосульфату натрію, який пішов на титрування, мл;
0,28 – кількість мг амінного азоту, еквівалентний 1 мл розчиненому тіосульфату натрію концентрацією 0,01 М;

20 – переведення в 100 мл культуральної рідини [122].

РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ ВИРОБНИЦТВА ЛЗ

7.1 Специфікація обладнання ділянки виробництва на виготовлення ЛЗ

Специфікація обладнання зображеного на апаратурній схемі. Характеристика обладнання доферментаційних та післяферментаційних процесів наведено в таблиці 7.1.

Таблиця 7.1

Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт та створення готового лікарського засобу

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
ПМ1	Пральна машина	1	Промислова пральна машина LN-18 TP2 E. Виробник: Fagor (Іспанія). Витрата води за цикл – 59,3 л. Завантаження одягу – 18 – 20 кг; віджимання 714 об/хв; споживання води 118,7 л. ДХШХВ – 788x840x1307 мм. Напруга 220-380 в. Вага 281 кг. Потужність - 12.75 кВт; об'єм барабана 180 л [123]
СШ2	Сушильна шафа	1	Сушильна шафа СП – 100С. Виробник: UOSlab. Габаритні розміри (ШxВxГ), з урахуванням ніжок і ручки 700x800x685 мм; розміри камери, *повний розмір по стінках 501x501x443 мм; розміри робочої камери, *з урахуванням фальш-панелі 500x500x410 мм. Повний об'єм камери – 112 л. Корисний об'єм камери – 104 л. Кількість полиць у робочій камері (стандартна/максимальна) - 2/5 шт. Відстань між полицями 70-90-90-70 мм; розмір полиці - 488x356x22 мм. Матеріал полиць - AISI 304, матеріал камери - AISI 304. Кількість вентиляторів – 1; захист від перегріву – електронний; тип контролера – цифровий.; вага нетто 47 кг, вага брутто, кг 53. Діапазон робочої температури ÷ 300°C; дискретність задавання температури, 1°C. Ступінь захисту оболонки IP 20; живлення 220±10% В, 50 Гц; номінальна потужність 1600 Вт [124].

					НУХТ БТЕК 02.02.10 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Ширай В.О.			Літ.	Арк.	Акрушів
Керівник		Стабніков В.П.				97	975
Консультант					Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Затверд.		Стабніков В.П.					
Розділ 7. Опис технологічного процесу виробництва							

С4	Стерилізатор	1	<p>Стерилізатор повітряний ГПО-150. Виробник: UOSlab. Час відновлення режиму після відкриття дверей - не нормується; максимальна температура 200°C; дискретність завдання температури 1°C. Варіація температури -1/+5°C.</p> <p>Кількість полиць (стандарт/максимум), 7 шт. Відстань між полицями 87 мм.</p> <p>Допустиме навантаження на полицю 14 кг.</p> <p>Матеріал полиць AISI 304, повний об'єм камери 165 л, внутрішній корисний об'єм камери 155 л. Вага шафи (без завантаження) 65 кг, розміри камери (ШхВхГ) 501х601х544 мм. Матеріал камери - AISI 304. Кількість вентиляторів 2 шт; захист від перегріву (капілярний термостат/електронна); тип контролера – цифровий; контролер (програмований / непрограмований) – програмований; кількість програм контролера – 9.</p> <p>Габаритні розміри шафи (ШхВхГ) 700×929×768 мм. Напруга живлення 220 В, 50 Гц; номінальна потужність 3100 Вт, підключення фаз 1~; таймер кількість хвилин/годин - 999/999.</p> <p>Максимальна швидкість нагріву, °С, хв. (завантажений): до 185°C < 55 хв.</p> <p>Максимальна швидкість нагріву, °С, хв. (незавантажений): до 185°C < 25 хв [125].</p>
310 317	Збірник	2	<p>Збірник нержавіючий. Виробник: ТД Красный Октябрь. Призначені для зберігання та передачі рідин. Шкідливість 1-4 класу небезпеки. Виготовляються з універсальним покриттям вищого або першого класу об'ємом 0,25 м.</p> <p>Робочий тиск МПа (кгс/см): у корпусі - 0,6 (6,0) або залишковий не нижче 0,04 (300 мм. рт. ст); в сорочці - 0,6 (6,0).</p> <p>Габаритні розміри – довжина 930 мм, висота – 1643 мм; ширина – 1040. Маса – 460 кг [126].</p>
Ф12	Патронний фільтр	1	<p>Фільтр круглий патронний Scutti Srl. серія FGS/09. Фільтр круглий патронний Scutti Srl. серія FGS, для силосів, з автоматичною системою очищення повітря. Доступні моделі від 9 до 39 кубів.</p> <p>Фільтр виготовлений повністю з нержавіючої сталі та має конструкцію з бункером для збору пилу. Також встановлений електричний вентилятор.</p> <p>Габаритні розміри – довжина 630 мм, висота – 1740 мм; ширина – 1180 [127].</p>

Ф13	Пісочний фільтр	1	<p>Фільтр пісочний Т600В призначений для механічного очищення води. Цілісний дутий корпус виготовлений з високоміцного поліетилену HDPE. Витримує несприятливі умови оточення, тиск до 4 бар та вплив обладнання для дезінфекції. Оптимально поєднується із хлораторами (солоня вода), UV-стерилізаторами, озонаторами. Має широку круглу підставку. Комплектується багаторежимним клапаном з датчиком тиску та муфтами для з'єднання.</p> <p>Корпус фільтра – Поліетилен, стійкість до корозії та ультрафіолету. Максимальний об'єм басейну - 58400 л. Діаметр фільтра – 610 мм. Максимальна пропускна здатність – 14.6 м3/год. Максимальний робочий тиск - 4 Бар. Завантаження піску - 165 кг, фракція піску – 0.5-0.8 мм, тип підключення – верхнє, з'єднання – 63 мм. Площа фільтра – 0.3 м2.</p> <p>Комплектація: фільтр Т600В, клапан перемикач режимів, манометр, інструкція. Розмір – 114.2 x 61 см. Бренд – Emaux (Китай) [128].</p>
ВФ14	Вугільний фільтр	1	<p>Вугільний фільтр CLACK ICE 16*65 CORB. Технічні характеристики:</p> <p>Тип системи: магістральна; застосування: освітлення, видалення хлору;</p> <p>робочий тиск 2,8 – 6 атм. Електроживлення 220в/50Гц. Продуктивність 1,8 м3/год;</p> <p>Перепад тиску в робочому режимі 0,6 атм</p> <p>Габарити (ш/в/г) 410x1900x410 мм, Висота підключень 1750 мм. Термін служби фільтруючого матеріалу до 24 місяців.</p> <p>Об'єм фільтруючого матеріалу 135 л. Тривалість регенерації 15-25 хв, засипка, що фільтрує: активоване вугілля С207</p> <p>Робоча температура 4-30°C [129]</p>
Ф15	Фільтр з зворотною промивкою	1	<p>Фільтр знезалізнєння та пом'якшення води ECOSOFT FK 4872CE2.</p> <p>Продуктивність робоча/максимальна, м3/год - 24,0...25,0; Об'єм фільтруючого матеріалу, л - 1100;</p> <p>Ресурс, м3 (при твердості 5 мг-екв/л) - 154; Витрата солі на регенерацію, кг - 110...176. Витрата води на регенерацію (об'єм стічних вод), м3 - 11,0.</p> <p>Тривалість регенерації, хв - 90...120. Перепад тиску в робочому режимі, бар - 1,0...1,5. Робочий тиск, бар - 2...6. Електроживлення - 230 В, 50 Гц, споживана потужність, Вт - 30. Діаметр підключення трубопроводів - 2". Вага нетто, кг 1170. Габаритні розміри фільтра (В x Ш x Г), см - 280 x 225 x 125 [130].</p>

УЗО16	Установка зворотного осмосу	1	Система зворотнього осмосу Stanko Watertech RO-500Steel з нержавіючої сталі. Вся рама виготовлена з профілю нержавіючої сталі, лицьової панелі та корпусу мембрани так само. Характеристики: якісний насос Ebara (Італія-Японія); продуктивність осмосу 360-560 літрів/годину; три ротаметри (концентрати, пермеати, рецикли); два манометри (вхідний тиск і після насоса); датчик сухого ходу; контролер управління з датчиком температури та солемісту; механічний фільтр Біг-Блю 10 дюймів; два корпуси мембрани із нержавіючої сталі AISI 304; соленоїдний клапан із латуні (можна замінити з нержавіючої сталі); поплавець для накопичувальної ємності. Країна виробник – Україна. Підключення до водопровідної труби - 0.5 дюйм. З'єднання запитує 0,5 дюйм. З'єднання вихідне 0,5 дюйм. З'єднання дренажне 0,5 дюйм. Тип мембранного елемента 4040. Кількість мембранних елементів – 2 шт. Напруга – 230 В, частота – 50 GHz. Вага 60 кг, довжина 600 мм., ширина 400 мм., висота 1400 мм [131].
ПЗ5	Повітрязабірник	1	Даховий повітрязабірник круглий ZL-500 ZS. Країна виробник – Україна. Тип розподільника повітря за формою - круглий. Матеріал корпусу – оцинкована сталь ZS. Діаметр Ød, мм: 500; Діаметр ØD, мм: 630; Розмір Н, мм: 410; Вільний переріз, м ² : 0,441. Маса, кг: 15,2. Макс. швидкість назовні. повітря, м ³ /год: 3900 [132].
Ф6	Фільтр грубої очистки	1	Панельний повітряний фільтр для грубого очищення. Виробник – Alter Air, країна-виробник – Україна. Клас фільтрації – G1, G2, G3, G4. Панельні фільтри для вентиляції та кондиціонування можуть бути виконані з наступних матеріалів: целюлоза, голкопробивні неткані волокна, скло та мікроскловолокно. Габаріти (мм), Ш - 287, В - 287, Г - 25 48 92 96 [133].
В7	Вентилятор	1	Витяжний каналний вентилятор SOLER&PALAU Jetline-100. Класифікація -промисловий. Потужність – 19 Вт. Номінальна напруга – 230/50 В/Гц. Габарити (ВхШхГ) 19.0 x 18.1 x 27.6 см. Принцип роботи – осьовий. Діаметр труби, мм – 100; рівень шуму, дБ – 22; частота обертання - 2690 об/хв; продуктивність, м ³ /ч – 300. Монтажна глибина 27.6 см [134]

К8	Компресор	1	Компресор повітряний Dnipro-M AC-100 VG. Об'єм ресивера 100 л, продуктивність на вході - 400 л/хв, продуктивність на виході - 290 л/хв. Потужність 2200 Вт. Робочий тиск 8 Бар. Тип компресора - масляний, тип приводу - ремінний. Кількість поршнів - 2 поршня. Кількість обертів - 2850 об/хв. Сумісність з фільтром AFC-105VG, сумісність з приводним ременем - АСВ-1295, АСВ-1118. Захист від перегріву, захист від перекачування. Напруга мережі - 230 В, частота мережі - 50 Гц. Габарити - 117x45x80 см. Вага 64 кг. Час закачування, 0-8 Бар - 156 сек. Рівень звукового тиску, дБ - 93, рівень звукової потужності, дБ - 99. Ємність картера, л - 0,5. Тип мастила - ДАА 68. Клас захисту IP 20 [135].
Ф9 Ф10	Фільтр тонкої очистки	1	Фільтр тонкого очищення повітря (ФТОВ, НЕРА, ХЕПА). Клас очищення: EN 779: Н10-Н14. Фільтроматеріал: мікроскловолокно. Рамка: МДФ, алюмінієвий, оцинкований, нержавіючий профіль. Клас фільтрації від Н10 до U16. У матеріалі, що фільтрують, використовуються скляні волокна діаметром 0,25... 1,0 мкм. Розміри, мм – 610x610x78, площа фільтроматеріалу, м.кв. - 7,6, продуктивність, м3/година - 1000, стартовий опір, Па – 250 [136].
Д19 Д22	Дозатор ваговий	2	Мультиголовковий ваговий дозатор ВД-10К. Є комбінованим ваговим дозатором (мультиголовка) і відрізняється високою точністю. Також має високу продуктивність - 65 доз/хв. Об'єм бункера, л – 1,6, продуктивність – 65; похибка дозування, г – 0,5, приводна система – кроковий двигун, габарити, мм – 1620x1100x1110. Матеріал - сталь 304. Панель управління - 7" сенсорна панель. Споживання електроенергії, кВт/год - 1. Вага, кг - 380. Електроживлення, В/Гц - 220/50, переміщення продукту - віброживильник. Діапазон дозування, г - 10 – 1000 [137].
320 325	Збірник	2	Збірник нержавіючий. Виробник: ТД Красный Октябрь. Призначені для зберігання та передачі рідин. Шкідливість 1-4 класу небезпеки. Виготовляються з універсальним покриттям вищого або першого класу об'ємом 0,1 м. Робочий тиск МПа (кгс/см): у корпусі - 0,6 (6,0) або залишковий не нижче 0,04 (300 мм. рт. ст); в сорочці - 0,6 (6,0). Габаритні розміри – довжина 830 мм, висота – 1416 мм; ширина – 890. Маса – 282 кг [138].

П21	Вібросито	1	Вібросито XZS з вібруючим обертовим екраном. Діаметр машини - 400 мм-2000 мм. Потужність двигуна 0.25-3 кВт. Сітчасті поверхня - 2-500 сіток (більше 200 сіток, можна використовувати ультразвукову систему). Матеріал машини - нержавіюча сталь 304/316L, вуглецева сталь, частина контактного матеріалу з 304/316L. 1-6 шарів (1-4 шари мають кращу ефективність скринінгу). Ультразвукова система/універсальне колесо/Видошукач/перемикач. Напруга - однофазна або трьохфазна 110-660В [139]
ЗМ22	Змішувач	1	Порошковий змішувач VL-300. Тип: з лопатями всередині. Коефіцієнт завантаження порошку: 40-60%. Об'єм: 300 літрів. Ефективний об'єм завантаження: 120 літрів. Максимальне навантаження: 80 кг. Потужність обертання потужності: 12 об/хв. Обертання вала з пелюстками: 1500 об/хв. Час перемішування: 15-25 хв. Потужність двигуна: 2 шт. по 1,5 кВт і 1,1 кВт. Харчування: 220В або 380В на вибір замовника Габаритні розміри (мм): 2300x1050x1900. Розміри з упаковкою (мм): 2500x1250x2100. Вага: 550 кг [140].
НОП24	Капсулятор	1	Автоматичний капсулятор NJP-1200B/1500B. Країна виробник Китай. Максимальна продуктивність 200 – 500 капсул/хвилину. Кількість осередків заповнення 9 шт. Потужність - 6 кВт. Параметри мережі: Напруга 380 В, частота - 50 GHz. Загальні параметри: вага 1000 кг, довжина 1180 мм, ширина 1340 мм, висота 1980 мм [141].
Ф26	Блістерна лінія	1	Автоматична Блістерна Лінія DPP-120. Виробник: Китай. Продуктивність - 20 -30 блістерів/хвилину, розмір матриці - 120x90x26 мм, потужність 3кВт, вакуум – 10 м3 на годину. ПВХ вимоги: товщина 0,25-0,35 мм. Фольга вимоги – 0.02мм. Розмір машини – 2070*650*1060 мм. Вага нетто 560кг [142].

7.2. Опис технологічного процесу виробництва ЛЗ

Технологічна схема отримання коліцину в капсулах включає допоміжні роботи (санітарна підготовка виробництва (підготовка персоналу, технологічного одягу, приміщень, обладнання), підготовка вентиляційного повітря, підготовка води

очищеної, підготовка сировини), технологічний процес (підготовка маси для наповнення капсул, наповнення капсул) та стадії пакування, маркування, відвантаження (фасування капсул у блістери, пакування блістерів у картонні пачки та пакування пачок у групову тару).

ДР 1. Підготовка персоналу до роботи

ДР 1.1. Навчання персоналу

При прийнятті на роботу персонал повинен пройти підготовку за фахом, включаючи ознайомлення з "Правилами організації виробництва і контролю якості лікарських засобів (GMP)" і інструкцій з дотримання правил гігієни. Періодично персонал проходить технологічний інструктаж. Також навчання персоналу включає вивчення посадових інструкцій, правил внутрішнього розпорядку підприємства, вивчення вимог санітарії, правил особистої гігієни, заходів пожежної безпеки, правил охорони праці і техніки безпеки.

ДР 1.2. Перевірка знань персоналу

Після закінчення навчання робітники повинні пройти перевірку отриманих знань: по правилах GMP - у формі тестування; по знанню СОП - у формі співбесіди (теорія) і демонстрації практичних навичок на робочому місці (практика); по охороні праці і екології - у формі співбесіди.

ДР 1.3. Підготовка до роботи у чистих приміщеннях

У гардеробній верхнього одягу персонал знімає верхній одяг, головні убори, вуличне взуття і надягає перехідний одяг (халат, шапочку або косинку, тапочки), що використовують для переміщення персоналу поза виробничими зонами. Потім персонал направляється в умивальну, де миє руки.

Далі персонал іде в гардероб технологічного одягу, де знімає перехідний одяг (халат, шапочку або косинку) і одягає технологічний одяг (халат або блузон і штани і шапочку або косинку) і в перехідних тапочках направляється до роздільного коврику. Працівники в технологічному одязі і перехідному взутті стають на половину роздільного коврика, ретельно витирають підошву тапочок об нього, знімають перехідне взуття і одягають технологічне взуття, стаючи нею

на іншу половину роздільного коврика. Потім персонал направляється до умивальника, де миє і обробляє дезінфікуючими засобами руки. Руки теплою водою до ліктів. Сушать руки за допомогою повітряної сушарки.

В якості дезінфікуючого засобу використовують «Віпасепт». Витрата дезінфікуючого засобу виходячи з розрахунку 9-10 мл на людину в день. Антисептичну обробку рук проводять відповідно до вимог інструкції. Наливають на долоню з дозатора близько 5 мл антисептика, ретельно розподіляють його по внутрішній і зовнішній поверхні кисті, між пальцевими проміжками і навколо нігтевим простором рук і дають висохнути. Рукавички використовує персонал безпосередньо контактуючий з сировиною і не розфасованим продуктом. Дезобробку рук проводять через кожні 2-3 години, але не менш 3 разів в зміну.

Після того, як надітий весь комплект захисного спеціального одягу (від ДР 2.6), персонал обробляє руки антисептиком, надягає рукавички і входить у виробничі приміщення на ділянку виробництва капсул. При необхідності вийти з виробничого приміщення, персонал робить операції перевдягання у зворотному порядку, зводячи до мінімуму забруднення одягу. При повторному вході у виробниче приміщення, персонал проходить всі стадії обробки спочатку, з обов'язковою антисептичною обробкою рук.

Визначення мікробної контамінації рук персоналу проводить мікробіолог один раз в тиждень під час виробничого процесу, в кожному виробничому приміщенні, вибірково в декількох працівників і один раз в два тижні безпосередньо після обробки рук антисептиками. Контроль мікробної мікрофлори рук персоналу здійснюється за допомогою змивів тампонами. Після обробки рук антисептиками в змивах з рук не повинні міститися життєздатні мікроорганізми.

Під час виробничого процесу в змивах з рук (рукавичок) допускається наявність не більше 10 мікроорганізмів (бактерій і грибів сумарно) на 100 см²

площі поверхні одягу чи площі однієї рукавички та не допускається наявність бактерій родини *Enterobacteriaceae*, *S.aureus* та *P.aeruginosa*.

ДР 2. Підготовка технологічного одягу

ДР 2.1. Прання технологічного одягу

Прання технологічного одягу здійснюється в спеціально призначених для цього приміщеннях D класу чистоти. Прання проводять в пральній машині (ПМ-1) протягом 20-30 хвилин з моменту включення машини. На кожний кілограм одягу, що завантажується, повинно припадати не менш 10 л розчину миючого засобу. Для прання слід використовувати синтетичні миючі засоби, що володіють низькими піноутворюючими властивостями. Концентрація розчину – 2 г/л, рекомендована температура прання 90°C.

ДР 2.2. Ополіскування технологічного одягу

Після закінчення прання одяг кілька разів ополіскують протягом 20-30 хвилин водою очищеною (від ДР 6.4) спочатку теплою, потім холодною.

ДР 2.3. Сушіння технологічного одягу

Після прання одяг струшують та по комплектах розвішують на плічки і поміщають в спеціальну шафу (СШ-2), в яку через фільтр тонкого очищення поступає тепле повітря при температурі 100°C протягом 120 хвилин.

ДР 2.4. Пакування технологічного одягу

Після закінчення сушки кожен комплект технологічного одягу загортають в два шари рослинного пергаменту на пакувальному столі. Після цього згортки поміщають в бікси або інші контейнери, що закриваються кришками, і передають на стерилізацію.

ДР 2.5. Стерилізація технологічного одягу

Стерилізацію технологічного одягу проводять в стерилізаторах (СТ-4) при надлишковому тиску 0,11 МПа і температурі 132 °C протягом 45 хвилин. Після закінчення процесу стерилізації необхідно спустити пару, підсушити одяг і охолодити його стерильним повітрям.

ДР 2.6. Зберігання технологічного одягу

Пакети з одягом зберігають на стелажах в окремому спеціально обладнаному чистому приміщенні із забезпеченням збереження упаковки у місці, що по класу чистоти перевищує приміщення, в якому одяг експлуатуватиметься при відносній вологості приміщення не більше 60%.

Мікробіологічний контроль одягу здійснюється вибірково у декількох робітників нерідше одного разу на тиждень.

ДР 3. Підготовка води очищеної

ДР 3.1. Подача води

Водопровідна вода через патронний фільтр за допомогою насосу поступає в накопичувальний збірник. Оптимальна температура води, що подається на установку очищення води складає 25⁰С, для цього в збірник додають гарячу воду.

ДР 3.2. Отримання води знесоленої

ДР 3.2.1. Очистка через пісочний фільтр

Питна вода (від ДР 3.1) із збірника за допомогою насоса подається на патронний фільтр, а далі на пісочний фільтр, при цьому підтримується постійне значення тиску в лінії подачі води 3-4 бар. Пісочний фільтр затримує домішки розміром до 10 мкм.

ДР 3.2.2. Очистка через вугільний фільтр

Після пісочного фільтра вода (від ДР 3.2.1) поступає на вугільний фільтр. Фільтрація через вугільний патронний фільтр дозволяє знизити концентрацію органічних речовин і хлору.

ДР 3.2.3 Пом'якшення води

Вода (від ДР 3.2.2) подається на установку пом'якшення води. Вода після установки пом'якшення повинна мати жорсткість не більшу 0,3 мг-екв/дм³, інакше установку відключають на регенерацію.

ДР 3.2.4. Остаточна очистка води від механічних домішок

Пом'якшена вода (від ДР 3.2.3) поступає на патронний фільтр, який служить для остаточної очистки від механічних домішок перед насосом початкового

тиску. Насос початкового тиску підвищує початковий тиск води перед високонапірним насосом до значення 3,5-4,0 бар.

ДР 3.3. Отримання води очищеної

ДР 3.3.1. Зворотньоосмотичне фільтрування

Високонапірний плунжерний насос підвищує тиск води (від ДР 3.2.4) до 30-65 бар, в результаті чого приблизно 30 % поданої води проштовхуються на сторону чистої води через мембрани модуля установки зворотного осмосу. Іони солей та інші забруднення не можуть проникнути через мембрану і разом із залишком поданої води витісняються наступною порцією води, що надходить до модуля.

Концентрат через клапан при нормальній роботі установки направляється в каналізаційний колектор (до ЗВ 8.1). Для здійснення контролю очищеної води відбирають пробу через вентиль відбору проби. Значення електропровідності очищеної води повинно бути не більше за 8,5 мкС/см.

Якщо електропровідність очищеної води менша за 10 мкС/см, то очищена вода направляється в збірник очищеної води.

ДР 3.4. Розподіл води очищеної

Вода очищена (від ДР 3.3.1) із збірника за допомогою насоса подається через патронний фільтр з розміром пор 0,2 мкм та бактерицидний опромінювач в замкнутий циркуляційний контур, з якого надходить на виробництво.

ДР 4. Підготовка вентиляційного повітря

Очищення повітря, що подається у виробничі приміщення класу чистоти D, проводять по 3-х східчастій системі: попередньої, тонкої і надтонкої очистки.

ДР 4.1. Забір повітря

Повітря через повітрозбірник потрапляє на фільтри грубої очистки.

ДР 4.2. Грубе очищення повітря

Попереднє очищення вхідного повітря від пилу здійснюються в фільтрах грубої очистки (клас G3) через пінополіуретан з ефективністю очищення 65-90% частинок розміром 5 мкм.

ДР 4.3. Транспортування технологічного повітря

Після фільтрів попереднього очищення повітря надходить у систему вентиляції за рахунок вентилятора.

ДР 4.4. Регуляція термодинамічних показників повітря

Повітря надходить у кондиціонер, де воно охолоджується, з повітря конденсується волога, після чого додатково підігрівається до температури 30-35°C, вологість повітря має становити 60%.

ДР 4.5. Тонке очищення повітря

Далі повітря поступає на фільтри тонкого очищення, в якості яких використовують фільтри з скловолокном в якості фільтруючого матеріалу. Ефективність очищення становить 70% частинок розміром 1 мкм. В процесі експлуатації фільтри тонкого очищення повітря не піддаються обробці і згодом підлягають заміні на нові.

ДР 4.6. Надтонке очищення повітря

На останньому етапі повітря надходить на НЕРА-фільтри з скло папером у якості фільтруючого матеріалу для видалення частинок розміром 0,3 мкм. Ефективність очищення 99,95%. Після даної стадії очистки повітря подається у приміщення класу D.

Проводиться мікробіологічний контроль очищеного повітря не рідше 1 разу на тиждень. Повинно бути не більше 200 КУО життєздатних мікроорганізмів на 1 м³ повітря.

ТП 5. Підготовка маси для наповнення капсул

ТП 5.1. Контроль вхідної сировини

Всі види сировини і матеріалів, що надходять на склад заводу контролюються на відповідність їх якості.

При отриманні сировини необхідно звертати увагу на цілісність упаковки, зовнішній вигляд, однорідність сировини, відсутність вкраплень. У разі

невідповідності сировини встановленим вимогам, воно не може бути використано у виробництві.

Щоб уникнути мікробної забрудненості сировину звільняють від тари та упаковки в окремому приміщенні.

ТП 5.2. Зважування сировини

На вагах КП-26 у збірнику зважують коліцин, крохмаль картопляний, кальцію стеарат, кремнію діоксид.

ТП 5.3. Просівання сировини

Перед початком роботи, за 5-10 хвилин, вмикають припливно-витяжну вентиляцію; органи дихання захищають респіратором.

На вимірювальному приладі зважують у збірник сировину, яку просівають через вібросито. Після закінчення роботи, поворотом рукоятки вліво, зменшують число обертів до 0, відключають вібросито і знімають сито. Контроль якості просіву здійснює майстер візуально. Втрати на стадії становлять 0,16% .

ТП 5.4. Змішування

Змішування маси для наповнення капсул проводять у змішувачі.

Завантаження сировини в змішувач здійснюють вручну. Натисканням кнопки "Пуск" приводять лопасті в рух і перемішують масу. Кінець перемішування і зупинку змішувача виробляють шляхом натискання кнопки "Стоп".

Змішування здійснюють при включеній вентиляції з використанням індивідуальних засобів захисту.

На вимірювальному приладі порціями відважують сировину в змішувач.

ТП 6. Наповнення, обезпилювання та полірування капсул

Наповнення, обезпилення та полірування капсул проводиться на установці NJP-1200B/1500B з продуктивністю 200 – 500 капсул за хвилину.

ТП 6.1. Орієнтування порожніх капсул

Із сировинного відділення беруть порожні капсул та візуально перевіряють їх цілісність.

Зважують порожні капсули на вагах. Заповнюють вручну порожніми капсулами бункер для капсул .

ТП 6.2. Розкриття порожніх капсул

ТП 6.3. Наповнення капсул

В апарат завантажують порожні капсули та підготовлену і просіяну масу для наповнення капсул.

Заповнюють за допомогою автоматичного пристрою подачі порошку масою для наповнення капсул прийомний бункер.

Зачиняють захисні дверцята. Виставляють автоматичний режим роботи установки для наповнення капсул. Виконують технологічну операцію наповнення капсул.

ТП 6.4. Закриття корпусу капсул

Після наповнення порожніх капсул відбувається процедура відбраковки.

Відбракування наповнених капсул, які залишаються порожніми здійснюється автоматично за допомогою пристрою відбракування, який є складовою частиною установки. Після чого вони передаються на знешкодження .

ТП 6.5. Обезпилювання та полірування капсул

Обезпилювання та полірування наповнених капсул здійснюється автоматично за допомогою пристрою обезпилювання, який є складовою частиною установки NJP-1200B/1500B.

Контроль середньої маси капсул проводиться на установці, що є складовою частиною установки для наповнення капсул. Контроль проводиться кожні 0,5 год зважуванням 20 невідкритих капсул на вагах. Показник – $7 \pm 0,7$ г. Дані заносять у протокол виробництва серії.

Тривалість та карантинне зберігання нерозфасованих капсул у збірнику в приміщенні карантинного зберігання не більше 18 год в сухому, захищеному від світла місці при кімнатній температурі.

Тривалість стадії «Наповнення, обезпилювання та полірування капсул» становить 8 годин

ПМВ 7. Пакування та маркування

Перед початком процесу фасування майстер або технолог повинен перевірити правильність виставлених на штампі: номеру серії (згідно протоколу виготовлення серії), терміну придатності (3 роки) та відсутності на робочому місці пакувальних матеріалів на інші препарати (відсутні).

ПМВ 7.1. Фасування препарату в блістери

Фасують капсули в контурні чарункові упаковки з плівки полівінілхлоридної (ПВХ) ЕП-73 та фольги алюмінієвої друкованої лакованої.

Перевіряють заповнення чарунок плівки капсулами (візуально).

Капсули вручну завантажують в бункер фасувального автомату:

- температура формування плівки $(140 \pm 10)^\circ\text{C}$ – термометр опору .

- температура склеювання плівки та фольги $(210 \pm 20)^\circ\text{C}$ – термометр опору

. Розфасовані контурні чарункові упаковки разом з протоколом виробництва серії в ємності передають на операцію «Пакування в пачки»

ПМВ 7.2. Пакування блістерів в пачки

Перед початком процесу фасування майстер або технолог повинен перевірити правильність нанесення на пачці маркування, номеру серії, терміну придатності.

По 2 контурні чарункові упаковки разом з інструкцією з медичного застосування вкладають у пачку на установці.

На контурній упаковці, пачці та етикетці вказують виробника, його товарний знак та адресу, назву препарату латинською, українською або російською мовами, кількість діючої речовини в грамах, кількість капсул в упаковці, «Приймати за призначенням лікаря», умови зберігання, реєстраційний номер, номер серії, термін придатності (всі написи вказуються у відповідності з затвердженим оригінал-макетом).

На пачці додатково вказують штриховий код.

Кількість пачок заносять до протоколу виробництва серії. Пачки передають на стадію «Пакування пачок у коробки».

ПМВ 7.3. Пакування пачок у коробки

На етикетці групової тари додатково вказують кількість упаковок, штриховий код.

Транспортне маркування у відповідності з стандартами.

Пакування пачок у гофрокоробки здійснюють вручну на столі для пакування.

Візуально перевіряють якість пакування (якісне та акуратне наклеювання стрічки з клеючим шаром).

ВКЯ проводить контроль готової продукції .

Готова продукція знаходиться на піддонах або стелажах в приміщенні карантинного зберігання до отримання позитивних результатів контролю готової продукції.

Для кожної серії препарату в процесі виробництва технолог (майстер) повинен сформулювати наступне: досьє серії. Папку з досьє на серію препарату передають у ВКЯ. Потім, після затвердження уповноваженою особою, досьє на серію разом з архівними документами серії передати на зберігання в архів. Зберігати готову продукцію на складі в сухому, захищеному від світла місці при температурі 20 – 25 ° С.

ЗВ 8. Знешкодження і переробка відходів

ЗВ 8.1. Знешкодження і переробка твердих відходів

Тверді відходи (пил лікарських засобів), які осідають в рукавних фільтрах систем місцевих відсмоктувань і вакуумних пилеприбирань збираються в спеціальні мішки і утилізуються. Збір і утилізація твердих відходів виробництва (упаковки, тари і т. д.) проводиться згідно діючим договорам на утилізацію відходів.

ЗВ 8.2. Знешкодження і переробка рідких відходів

Використана вода надходить у спеціальні збірники, де проводиться її нейтралізація содою. Після колодязю, якщо вода відповідає вимогам скидання стічних вод у систему каналізації, вода потрапляє у останню.

ЗВ 8.3 Знешкодження газоподібних відходів

Повітря, яке використовується у виробничому процесі в обов'язковому порядку проходить фільтрацію, після чого знову може надходити на технологічні потреби.

6.3 Контроль ділянки виробництва ЛЗ

6.3.1 Ідентифікація

1. На хроматограмі випробуваного розчину, отриманої при кількісному визначенні, час утримування основного піку коліцину має збігатися з часом утримування піку коліцину на хроматограмі розчину порівняння коліцину.

2. Зразок масою 0,034 г поміщають у мірну колбу місткістю 100 мл, розчиняють в 70 мл 0,1 М розчину хлористоводневої кислоти, доводять об'єм розчину цим же розчинником до мітки, перемішують і фільтрують через паперовий фільтр «синя стрічка».

2 мл отриманого розчину поміщають у мірну колбу місткістю 100 мл, доводять об'єм розчину 0,1 М розчином хлористоводневої кислоти до мітки і перемішують.

Ультрафіолетовий спектр поглинання отриманого розчину в області від 220 нм до 400 нм повинен мати максимуми при довжинах хвиль 267 нм і 345 нм і мінімуми при довжинах хвиль 233 нм і 301 нм (ДФУ, вид.1, 2.2.25) [142].

6.3.2 Однорідність маси

Відхилення розміру часточок порошку допускається в межах $\pm 7,5\%$, від середньої маси.

Випробування проводять відповідно на ситах №2 з діаметром отворів 0,01 мм[142].

6.3.3 Розчинення

Проводять використовуючи "Прилад з лопатями".

Середовище розчинення – 0,01 М розчин хлористоводневої кислоти, обсяг середовища розчинення - 1000 мл, швидкість обертання лопаті - 100 об / хв, час розчинення – 45 хв.

Випробуваний розчин. У прилад поміщають зразок масою 0,1 г, через 45 хв відбирають 30 мл розчину з центру посудини для розчинення, фільтрують через паперовий фільтр "синя стрічка", відкидаючи перші 10 мл фільтрату.

5 мл отриманого фільтрату поміщають у мірну колбу місткістю 50 мл, доводять об'єм розчину 0,01 М розчином хлористоводневої кислоти до мітки і перемішують.

Розчин порівняння. 1 мл розчину порівняння, приготованого в розділі "Кількісне визначення", поміщають у мірну колбу місткістю 100 мл, доводять об'єм розчину 0,01 М розчином хлористоводневої кислоти до мітки і перемішують.

Вимірюють оптичну щільність випробуваного розчину та розчину порівняння на спектрофотометрі при довжині хвилі 267 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм, використовуючи як компенсаційного розчину 0,01 М розчин хлористоводневої кислоти.

Кількість коліцину (X_1), яке перейшло в розчин з капсули, у відсотках, обчислюють за формулою:

$$X_1 = \frac{A_1 * m_0 * 1 * 1000 * 50 * P * 100}{A_0 * 50 * 100 * a * 5 * 100} = \frac{A_1 * m_0 * 2 * P}{A_0 * a}$$

де: A_1 - оптична щільність досліджуваного розчину;

A_0 - оптична густина розчину порівняння;

m_0 - маса наважки СО коліцину, в грамах;

P - вміст коліцину в СО, у відсотках,

a - вміст коліцину, вказаний в розділі "Склад", в грамах;

Кількість коліцину, що перейшло у розчин через 45 хв для кожного зразка, має бути не менше 75% і не більше 115% від вказаної в розділі "Склад".[24]

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Yang R., Ray B. Factors influencing production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Ibid* 1994; 4: 281-291.
2. Gonsales B., Arca P., May O.B. Detection, purification and partial characterization of plantaricin C, a bacteriocin produced by a *Lactobacillus plantarum* strain of dairy origin. *Appl. Environ Microbiol* 1994; 60: 6: 2158-2163.
3. Ali D., Lacroix C., Thuault D. et al. Characterization of diacetin B, a bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv *diacetylactis* UL 720. *Can J Microbiol* 1995; 41: 9: 832-841.
4. Parrot M., Caufield P.W., Lavoie M.C. Preliminary characterization of four bacteriocins from *Streptococcus mutans*. *Can J Microbiol* 1990; 36: 2: 123-130.
5. De Vuyst L., Callewaert P., Crabbe K. Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by *Lactobacillus amylovorus* and evidence for stimulation of bacteriocin production under unfavourable growth conditions. *Microbiology* 1996; 142: 4: 817-827.
6. Rawis R.Y. Identification and characterization of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Chem Eng New* 1997; 75: 22: 35-39.
7. Nemeth A., Gasparik-Reichardt J., Farkas J. et al. Identification and characterization of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Fleischwirtschaft* 1996; 70: 10: 1042-1044.
8. Aumerich T., Holo H., Hoavarstein L.S. et al. Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecalis*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. *Appl Environ Microbiol* 1996; 62: 5: 1676-1682.
9. Joosten H., Nunes M., Devreese B. et al. Purification and characterization of enterocin 4, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* INIA 4. *Appl Environ Microbiol* 1996; 6: 6: 11: 4220-4223.

10. Joosten N., Nunes M. Prevention of histamine formation in cheese by bacteriocin-producing lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol* 1996; 62: 4: 1178-1181.
11. Giraffa G. Enterococcal bacteriocins: their potential as antilisteria factors in dairy technology. *Food Microbiol* 1995; 12: 4: 291-299.
12. Criado R., Dzung B., Diep A. et al. Complete Sequence of the Enterocin Q- Encoding Plasmid pCIZ2 from the Multiple Bacteriocin Producer *Enterococcus faecium* L50 and Genetic Characterization of Enterocin Q Production and Immunity // *Ibid.* - 2006. - Vol. 72, N 10. - P. 6653–6666.
13. Ruiz-Barba J.L., Cathcart D.P., Warner P. Use of *Lactobacillus plantarum* LPCO10, a bacteriocin producer, as a starter culture in Spanish-Style green olive fermentation. *Appl Environ Microbiol* 1994; 60: 6: 2054-2064.
14. Sasaki M., Ishii S., Yamauchi Y. et al. Lactic acid bacteria, antibacterial substance, produced by the bacteria, fermented milk starter containing the bacteria and process for producing fermented milk by using the starter . Пат 5338682 США, МКИ5, с 12p/04 с 12P, 7/56 от 1994 г.
15. Vedamuthu E.R. Method of producing a yogurt product containing bacteriocin PA-1. Пат 5445835 США, МКИ6; А23С9/12 от 29.8.1995 г. НКИ 429/9.
16. 24. Hooven H.W., Lagerwerf F.M., Herma W. et al. The structure of the lantibiotic lactacin 481 produced by *Lactococcus lactis*: location of the thioether bridges. *Febs Lett* 1996; 391; 3: 317-322.
17. Ryan M.P., Rea M.C., Hill C. et al. An application in cheddar cheese manufacture for a strain of *Lactococcus lactis* producing a novel broad-spectrum bacteriocin, lactacin 3147. *Appl Environ Microbiol* 1996; 62: 612-619.
18. Ishizaki A., Matuzaci H., Uryu K., Inui T. Biochemical properties of a new lantibiotic produced by *Lactococcus lactis* 10-1. *РЖ Биотехнология* 1993; 4P1193: 22.

19. Sahl H.G. Staphylococcin 1580 is identical to the lantibiotic epidermin: implications for nature of bacteriocins from gram-positive bacteria. *Appl Environ Microbiol* 1994; 60: 2: 752-755.
20. Valdes-Stauber N., Scherer S. Nucleotide sequence and taxonomical distribution of the bacteriocin gene *lin* cloned from *Brevibacterium linens* M18. *Appl Environ Microbiol* 1996; 62: 4: 1283-1286.
21. Surugau L.N. Peptide separation by capillary electrophoresis with ultraviolet detection: some simple approaches to enhance detection sensitivity and resolution // *The Malaysian Journal of Analytical Sciences*. - 2011. - Vol. 15 (2). - P. 273-287.
22. Enfedaque J., Ferrer S., Francesc Q. et al. Identification of *E. coli* surface components involved in bacteriocin binding and translocation. *Can J Microbiol* 1996; 42: 1: 19-26.
23. Шарга Б.М., Туряица А.И. Исследование антимикробного спектра действия бактериоцинов и бактериофагов некоторых штаммов *Klebsiella*. *Микробиол журн* 1993; 55: 5: 59-68.
24. Rodelas B., Gonsales-Lopes J., Salmeron V. et al. Bacteriocin produced by a strain of *Rhizobium leguminosarum* bv viceae. *РЖ Биология* 1996; 5: 04Б3: 143: 22.
25. Venema K., Venema G., Kok J. *Lactococcal* bacteriocins: mode of action and immunity. *Trends Microbiol* 1995; 3: 8: 299-303.
26. Nissen-Meyer J., Holo H., Havarstein L.S. et al. A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. *J Bacteriol* 1992; 174: 17: 5686-5692.
27. Nissen-Meyer J., Larsen A., Sletten K. et al. Purification and characterization of plantaricin A, a *Lactobacillus plantarum* bacteriocin whose activity depends on the action of two peptides. *J Gen Microbiol* 1993; 139: 9: 1973-1978.
28. Saris P.E.Y., Immonen T., Reis M., Sahl H.G. Immunity of lantibiotics. *Intern. J Gen Mol Microbiol* 1996; 69: 2: 151-159.

29. Fimland G., Blingsmo O.B., Sletten K. et al. New biological activity hybrid bacteriocins constructed by combining regions from various pediocin-like bacteriocins: The C-terminal region is important for determining specificity. *Appl Environ Microbiol* 1996; 62: 9: 331- 338.
30. Kowai Y., Saito T., Uemura J. et al. Rapid detection method for bacteriocin and distribution of bacteriocin-producing strains in *Lactobacillus acidophilus* group lactic acid bacteria isolated from human feces. *Biosci Biotechnol Biochem* 1997; 6: 1: 179-182.
31. Kai Li, Lici A. Schurig-Briccio, Xinxin Feng, Ashutosh Upadhyay, Venugopal Pujari, et. al.. Multitarget Drug Discovery for Tuberculosis and Other Infectious Diseases. *J. Med. Chem.* 2014. 57, 3126-3139;
32. Ville Ojala, Jarkko Laitalainen, Matti Jalasvuori. Fight evolution with evolution: plasmid-dependent phages with a wide host range prevent the spread of antibiotic resistance. *Evol Appl.* 2013. 6, 925-932;
33. Cesar A. Arias, Barbara E. Murray. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nat Rev Micro.* 2012. 10, 266-278;
34. Alessandra C. Rios, Carla G. Moutinho, Flávio C. Pinto, Fernando S. Del Fiol, Angela Jozala, et. al.. Alternatives to overcoming bacterial resistances: State-of-the-art. *Microbiological Research.* 2016. 191, 51-80;
35. Mor Shlezinger, Leron Khalifa, Yael Hourri-Haddad, Shunit Copenhagen-Glazer, Grégory Resch, et. al.. Phage Therapy: A New Horizon in the Antibacterial Treatment of Oral Pathogens. *CTMC.* 2017.17, 1199-1211;
36. Luc De Vuyst, Frédéric Leroy. Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Production, Purification, and Food Applications. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 2007. 13, 194-199;
37. Nalisa Khochamit, Surasak Siripornadulsil, Peerapol Sukon, Wilailak Siripornadulsil. Antibacterial activity and genotypic–phenotypic characteristics of bacteriocin-producing *Bacillus subtilis* KKU213: Potential as a probiotic strain. *Microbiological Research.* 2015. 170, 36-50;

38. Тараканов Б.В., Яковлева А.А., Николичева Т.А., Комкова Н.М., Манухина А.И., Алешин В.В. Вектор pLF22 для экспрессии генов в молочнокислых бактериях. Микробиология. 2004. Т73(2). С. 170-175.
39. Тараканов Б.В., Яковлева А.А., Алешин В.В. Характеристика энтеробактерий, продуцирующих микроцины - низкомолекулярные антибиотики Микробиология. 2004. Т. 73(2) С. 150-155.
40. Кузнецова М.В., Масленникова И.Л. Конъюгативный перенос гена бактериоцина ColE7, используемого в качестве альтернативного антибактериального агента. Вестник пермского научного центра. 2017. №4. с. 45-52.
41. Кузнецова М.В., Масленникова И.Л., Гизатуллина Ю.С., Žgur Bertok D., Starčić Ertjavec M. Биопрепарат на основе штамма *Escherichia coli* ŽР. Сообщение I. Оценка эффективности колицина при конъюгативной доставке *colE7* в клетки АРЕС *in vitro* и *in vivo*. Сельскохозяйственная биология, 2020, том 55, № 2, с. 364-377. DOI: 10.15389/agrobiology.2020.2.364rus
42. Ачаев, Р.А. Адгезивная способность некоторых условно патогенных энтеробактерий, выделенных от овец при ассоциативных гельминтознобактериальных заболеваниях / Р.А. Ачаев, Р.Х. Гайрабеков, Ф.С. Турлова // Естественные науки. – 2011. – № 2 (35). – С.113-117.
43. Андреева, И.Н. Влияние условий культивирования на рост и пигментацию *Serratia marcescens* / И.Н. Андреева, Т.И. Огородникова // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 1999. – №3. – С. 16-20.
44. Балко А.Б. Характеристика, свойства, перспектива применения бактериоцинов. Мікробіологічний журнал., 2012, Т. 74, № 6. с. 99-106
45. Grozdanov L., Raasch C., Schulze J., Sonnenborn U., Gottschalk G., Hacker J., Dobrindt U. Analysis of the genome structure of the nonpathogenic probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 // J. Bacteriol. - 2004. - Vol. 186(16). - P. 5432-5441.

46. Juraj Bosák, Lenka Micenková, Matěj Hrala, Katarína Pomorská, Michaela Kunova Bosakova, Pavel Krejci, Eduard Göpfert, Martin Faldyna, and David Šmajš. Colicin F_Y inhibits pathogenic *Yersinia enterocolitica*. - Sci Rep. 2018. 8: 12242. doi: 10.1038/s41598-018-30729-7

47. Arumugam S., Manikkam R., Gopal S., Nainangu P., Sivaraj A., Jerrine J. Isolation of colicinogenic *E. coli*, optimization of colicin production and transformation of Col plasmid. Journal of Applied Pharmaceutical Science Vol. 4 (07), pp. 047-049, July, 2014. doi: 10.7324/JAPS.2014.40708

48. Gokce I., Lakey J.H. Production of an *E. coli* toxin protein; Colicin A in *E. coli* using an inducible system. Turkish Journal of Chemistry. 2012. 27(3). P. 323-331.

(https://www.researchgate.net/publication/286463905_Production_of_an_E_coli_toxin_protein_Colicin_A_in_E_coli_using_an_inducible_system)

49. Tada, S. Synthetic medium for pigment production of *Serratia marcescens* / S. Tada // Abstr. 79-th. Annu. Meet. Amer. Soc. Microbiol. Los Angeles, Calif. 1979. – Washington, 1979. – P.348

50. Pal R.B., Rebello J.S., Banker DD, Jain P K. Klebocin typing of *Klebsiella* species isolated from nosocomial infection in intensive care unit. J Postgrad Med 1997;43:98-101.

51. Alaa Hani Al-Charrakh Antimicrobial spectrum of the action of bacteriocins from *Klebsiella* in Hilla/Iraq Conference: Conference of Microbiology and Biotechnology, Basrah, Iraq December 2007 https://www.researchgate.net/publication/309351220_Antimicrobial_spectrum_of_the_action_of_bacteriocins_from_Klebsiella_in_HillaIraq

52. Szewzyk U. Growth and survival of *Serratia marcescens* under aerobic and anaerobic conditions in the presence of materials from blood bags / U. Szewzyk, R. Szewzyk, P. Stenström // J Clin Microbiol. – 1993. – Vol. 31, № 7. – P. 1826-1830.

53. Shaista Bano, Mireille Vankemmelbeke, Christopher N. Penfold, Richard James Detection of induced synthesis of colicin E9 using ColE9p::gfpmut2 based

reporter system. World Journal of Microbiology and Biotechnology volume 30, pages 2091–2099. 2014. <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1635-y>

54. Darja Žgur-Bertok Regulating colicin synthesis to cope with stress and lethality of colicin production. Biochem Soc Trans. 2012 Dec 1;40(6):1507-11. doi: 10.1042/BST20120184

55. Langa, S., Arqués, J., Medina, M. and Landete, J., Coproduction of colicin V and lactic acid bacteria bacteriocins in lactococci and enterococci strains of biotechnological interest. J Appl Microbiol, (2017) 122: 1159-1167. <https://doi.org/10.1111/jam.13439>

56. Xing Jin, Weston Kightlinger, Yong-Chan Kwon³, Seok Hoon Hong. Rapid production and characterization of antimicrobial colicins using *Escherichia coli*-based cell-free protein synthesis. Synth Biol (Oxf). 2018 Jun 6;3(1):ysy004. doi: 10.1093/synbio/ysy004.

57. Tjener, K., Stahnke, K.H., Andersen, L., Martinussen, J. 2008. "A fermented meat model system for studies of microbial aroma formation". Meat Science, 66(1), 211-218.

58. Pamela Oliveira de Souza de Azevedo, Carlos Miguel Nóbrega Mendonça, Ana Carolina Ramos Moreno, Antonio Vinicius Iank Bueno, Sonia Regina Yokomizo de Almeida, Liane Seibert, Attilio Converti, Ii-Sei Watanabe, Martin Gierus, and Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira. Antibacterial and antifungal activity of crude and freeze-dried bacteriocin-like inhibitory substance produced by *Pediococcus pentosaceus*. Sci Rep. 2020; 10: 12291. doi: 10.1038/s41598-020-68922-2

59. Tahiri I, Desbiens M, Benech R, Kheadr E, Lacroix C, Thibault S, Ouellet D, Fliss I. Int J Food Microbiol. 2004 Dec 15;97(2):123-36. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.04.013.

60. Koji Yamazaki, Minako Suzuki, Yuji Kawai, Norio Inoue, Thomas J Montville. Appl Environ Microbiol. 2005 Jan;71(1):554-7. doi: 10.1128/AEM.71.1.554-557.2005.

61. Sridevi, M. & Mallaiah, K.V. Production of bacteriocins by root nodule bacteria. *International J. Agri. Res.*, 2008. 3:161-165.
62. Ambika, R., Kavitha, P., Panneerselvam, A. & Sengottaian, N. Production of bacteriocin by *Rhizobium* isolated from rhizosphere soil of maize in Lalgudi Taluk, Trichy district, Tamil Nadu, India. *Inter. J. Curr. Res.* 2014 6: 5346-5348.
63. Yajima, A., Van Brussel, A.A.N., Schripsema, J., Nukada, T. & Yabuta, G. Synthesis and stereochemistry activity relationship of small bacteriocin, an autoinducer of the symbiotic nitrogen-fixing bacterium *Rhizobium leguminosarum*. *Organic letters*. 2008. 10:2047-2050.
64. Butt, A.M., Khan, I.B., Haq, F. & Tong, Y. (2011) De novo structural modeling and computational sequence analysis of a bacteriocin protein isolated from *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* strain LC-31. *Afr. J. Biotech.*,10: 7381-7388.
65. Butt, A.M., Khan, I.B., Haq, F. & Tong, Y. De novo structural modeling and computational sequence analysis of a bacteriocin protein isolated from *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* strain LC-31. *Afr. J. Biotech.*, 2011. 10: 7381-7388.
66. Edulamudi, P., Masilamani, A.J.A., Divi, V.R.S.G. & Konada, V.M. Production bacteriocin by rhizobia obtained from root nodules of *Macrotyloma uniflorum* (Lam.) Verdc. (Horse Gram). *Ban. J. Microbiol.*, 2011. 28: 76-79
67. Dorosky R. J., Pierson L. S., Pierson E. A. J. A.. *Pseudomonas chlororaphis* produces multiple R-tailocin particles that broaden the killing spectrum and contribute to persistence in rhizosphere communities. *Appl. Environ. Microbiol.* (2018)84, e01230–e01218. 10.1128/AEM.01230-18.
68. Robert J. Dorosky, Leland S. Pierson, and Elizabeth A. Pierson *Pseudomonas chlororaphis* Produces Multiple R-Tailocin Particles That Broaden the Killing Spectrum and Contribute to Persistence in Rhizosphere Communities. *Appl Environ Microbiol.* 2018 Sep 15; 84(18): e01230-18. doi: 10.1128/AEM.01230-18.
69. Ghequire MG, De Mot R. Ribosomally encoded antibacterial proteins and peptides from *Pseudomonas*. *FEMS Microbiol Rev.* 2014. 38:523–568. doi:10.1111/1574-6976.12079.

70. Behrens H. M., Six A., Walker D., Kleanthous C. The therapeutic potential of bacteriocins as protein antibiotics. *Emerging Topics in Life Sciences*. 2017, 1(1): 65-74. doi: 10.1042/ETLS20160016
71. Ghequire M. G., Buchanan S. K., De Mot R. The ColM family, polymorphic toxins breaching the bacterial cell wall. *MBio*. 2018, 9(1): e02267-17. doi: 10.1128/mBio.02267-17.
72. Atanaskovic I., Kleanthous C. Tools and approaches for dissecting protein bacteriocin import in gram-negative bacteria. *Frontiers in microbiology*. 2019, 10: 646. doi: 10.3389/fmicb.2019.00646
73. Micenková L., Bosák J., Kucera J., Hrala M., Dolejšová T., Šedo O., et al. Colicin Z, a structurally and functionally novel colicin type that selectively kills enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* strains. *Scientific reports*. 2019, 9(1): 1-12. doi: 10.1038/s41598-019-47488-8
74. Ecoy G., Chaotham C., Suksomtip M., Chanchavarote P., Arunmanee W. Recombinant bacterial-protein Colicin N causes cytotoxicity and oxidative stress in human lung cancer cells. *The 6th International Conference on Biochemistry and Molecular Biology*. 2018, 1: 1-8.
75. Arunmanee W., Ecoy G. A. U., Khine H. E. E., Duangkaew M., Prompetchara E., Chanvorachote P., Chaotham C. Colicin N mediates apoptosis and suppresses integrin-modulated survival in human lung cancer cells. *Molecules*. 2020, 25(4): 816. doi: 10.3390/molecules25040816
76. Brown C. L., Smith K., Wall D. M., Walker D. Activity of Species-specific Antibiotics Against Crohn's Disease–Associated Adherent-invasive *Escherichia coli*. *Inflammatory bowel diseases*. 2015, 21(10): 2372-2382. doi: 10.1097/MIB.0000000000000488
77. GRAS notice for colicin as an antimicrobial food processing aid for meat products. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.fda.gov/media/101422/download>

78. Болезнь Крона. [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://amclinic.ru/med-spravochnik/bolezn_krona
79. Наталя Кізлова « Пацієнт має бути активним учасником процесу власного лікування. Від цього залежить і його здоров'я, і якість життя». [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://www.vin.gov.ua/departament-okhorony-zdorovia/27037-natalia-kizlova-patsiiient-maie-butyu-aktyvnyum-uchasnykom-protsesu-vlasnoho-likuvannia-vid-tsoho-zalezhyt-i-ioho-zdorovia-i-iakist-zhyttia>
80. Степанов Ю. М., Скирда И. Ю., Петишко О. П. Хронические воспалительные заболевания кишечника: особенности эпидемиологии в Украине. *Гастроентерологія*. 2017, 51(2): 97-105. doi: 10.22141/2308-2097.51.2.2017.101703
81. Медикаментозное лечение болезни Крона. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.5gram.eu/ru/vocational-information/bolezn-krona/lechenie-bolezni-krona/medikamentoznoe-lechenie/>
82. Лечение болезни Крона. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.zdorovo365.ru/lechenie-bolezni-krona.html>
83. Стратегия медикаментозной терапии болезни Крона. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.lvrach.ru/2005/06/4532669>
84. Лекарственные препараты при Воспалительных Заболеваниях кишечника. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://clck.ru/WYUf3>
85. Метронидазол Никомед. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.takeda.com/4ab49d/siteassets/ru-ru/home/what-we-do/1/23/metronidazol-tab-06062017.pdf>
86. Ilomuanya M. O., Nashiru B., Ifudu N. D., Igwilo C. I. Effect of pore size and morphology of activated charcoal prepared from midribs of *Elaeis guineensis* on adsorption of poisons using metronidazole and *Escherichia coli* O157: H7 as a case study. *Journal of microscopy and ultrastructure*. 2017, 5(1): 32-38. doi: 10.1016/j.jmau.2016.05.001

87. Население Украины Киевская области. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://index.minfin.com.ua/reference/people/kievskaya/88/>
89. Загальна характеристика мікроорганізмів і способи їх культивування [Електронний ресурс] Режим доступу: https://moodle.znu.edu.ua/pluginfile.php?file=/236895/mod_resource/content/1/2.pdf
90. Перемішування. Види і конструкції мішалок [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://ukrbukva.net/page,3,117379-Peremeshivanie-Vidy-i-konstrukcii-meshalok.html>
91. BIOSTAT® А – Ваш первый биореактор [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://www.sartorius.com/download/122528/6/broch-biostat-a-sbi1518-r-data.pdf>
92. Сидоров Ю.І., Влязло Р.Й., Новіков В.П. Процеси і апарати мікробіологічної та фармацевтичної промисловості. – Львів: Інтеллект-Захід, 2008. – 736 с.
93. Данилов І.П. Апарати мікробіологічної промисловості//Біотехнологія – Харків НТУ – 2008. – С.271
94. Карлаш Ю.В., Омельчук Є.О. Основи проектування біотехнологічних виробництв/ Київ НУХТ – 2019 – с. 253.
95. Центрифуги з шнековим пристосуванням для видалення осаду.[Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://leksii.org/1-64169.html>
96. Плановский А.Н. Процессы и аппараты химической технологии: Изд. 5. – 1962. – 848 с.
97. Ионнообменная сорбция, механизм ионного обмена. [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://studbooks.net>
98. Гравіметричний метод. [Електронний ресурс] – Режим доступу: https://tdmuv.com/kafedra/internal/pharma_2/lectures_stud/uk/pharm/prov_pharm
99. Метод экстракции.[Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://xumuk.ru/toxicchem/34.html>
100. Приточно-втяжні установки АФ. [Электронный ресурс] – Режим доступа: <http://v-z.com.ua/ua/category/pritочно-vytzhnye-ustanovki-af/>

101. Сушилка. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <http://www.etwinternational.ru/1-2-3-horizontal-paddle-vacuum-dryer-46871.html>
102. Білоус С.Б. Теоретичне та експериментальне обґрунтування складу, технології і дослідження лікарських засобів антимікробної дії на основі наноматеріалів. / Львів 2019 – с. 45
103. Лікарські засоби. Належна виробнича практика. [Електронний ресурс] – Режим доступу: https://www.dls.gov.ua/wp-content/uploads/2018/10/GMP-1_2016.
104. Належна виробнича практика у виробництві лікарських препаратів. [Електронний ресурс] – Режим доступу: https://tdmuv.com/kafedra/internal/upr_ekon/classes_stud/uk/pharm/prov_pharm/ptn
105. Вентиляції та кондиціонування повітря у робочій зоні виробничих приміщень. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://dsp.gov.ua/ventyliatsii-ta-kondytsiiuvannia-povitria-u-robochii-zoni-vyrobnychykh-prymishchen/>
106. Кондиціонування повітря робочої зони. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://studfile.net/preview/5253362/page:10/>
107. Очищення та покращення води. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://buklib.net/books/36176>
108. Технологія зворотнього осмосу. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://ecosoft.ua/blog/chto-takoe-obratnyu-osmos/>
109. Фильтр карманный грубой очистки воздуха Фильтр ФПО FA-3 [Електронний ресурс] – Режим доступу: <http://air-klimat.prom.ua>
110. Компрессор винтовой Atlas Copco GX 7 10P / 400В 3ф 50Гц без N / CE [Електронний ресурс] – Режим доступу: <http://www.companyaair.ru>
- 111.осушувач ОВ 42 «АСО» [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://tehnofilter.ub.ua/ua/>
112. Ресивер вертикальний РВ 110/10 «АСО» [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://tehnofilter.ub.ua/ua/>
113. Теплообмінник HF75 «Pahlen» [Електронний ресурс] – Режим доступу: <http://www.airone.ru>

114. Фільтр ФПО FA-3 «Уралкомпрессормаш» [Електронний ресурс] – Режим доступу: <http://air-klimat.prom.ua>
115. Реактор с мешалкой и нагревом NLF Bioengineering AG [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://tehnolog.com.ua>
116. Фільтри HEPA H14 СКБ Технофільтр [Електронний ресурс] – Режим доступу: <http://www.airpol.com.ua>
117. Ферментер фірми «BIORUS» на 10 л та на 100 л [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://bio-rus.ru>
118. Відцентровий насос [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://trudovik.com.ua>
119. Фарбування за граммом. [Електронний ресурс]- Режим доступу: <https://studfile.net/preview/5280072/>
120. *Пирог Т. П.* Загальна мікробіологія // Підручник. – К.: НУХТ. – 2010. – 623с.
121. Датчик *Aber Futura* [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://www.bioprocessonline.com>
122. Определение аминного азота медным способом [Електронний ресурс] – Режим доступу: <http://helpiks.org/2-51110.html>
123. Пральна машина LN-18 TP2 E [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://technofood.com.ua/ua/shop/product/stiralnaia-mashina-ln-18-tp2-e>
124. ШАФА СУШИЛЬНА СП-100С [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://uoslab.com/sushylne-obladnannia/sushylni-shafy/sushilnyj-shkaf-sp-100c>
125. Стерилізатор повітряний ГПО-150 [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://uoslab.com/sushylne-obladnannia/sterylizatory/sterylizatory-serii-gpo/medicinskij-sterilizator-gpo-150>
126. Сборники нержавеющей V=0,063 - 0,25 м3 [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://tdredoctober.com/catalog/sborniki-nerzhaveyushchiy/581.html>
127. Фильтр круглый патронный Scutti Srl. серия FGS [Електронний ресурс] – Режим доступу: <http://prombeton.in.ua/scutti-fgs/#gabarity>

128. Песочный фильтр для бассейна Emaux T600B Volumetric [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://ekosklad.com.ua/p718039342-pesochnyj-filtr-dlya.html>
129. Угольный фильтр CLACK ICE 16*65 CORB [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://filtry-vody.com.ua/ugolnyj-filtr-clack-ice-16-65-corb>
130. Фільтр знезапіднення та пом'якшення води ECOSOFT FK 4872CE2 [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://ecosoft.ua/ua/filtr-kompleksnoy-ochistki-vody-ecosoft-fk-4872ce2/>
131. Система обратного осмоса Stanko Watertech RO-500Steel из нержавеющей стали [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://hydro.in.ua/p1243758875-sistema-obratnogo-osmosa.html>
132. Крышный воздухозаборник круглый ZL-500 ZS [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://ccktm.prom.ua/p550112262-kryshnyj-vozduhozabornik-kruglyj.html>
133. Панельные воздушные фильтры для грубой очистки. [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://shop.alterair.ua/ru/product/vozdushnyye-panelnyye-filtry-gruboy-ochistki-g1-g4/>
134. Вытяжной канальный вентилятор SOLER&PALAU Jetline-100 [Электронный ресурс] – Режим доступа: https://bt.rozetka.com.ua/soler_palau_5145895600/p306697903/?gclid=CjwKCAiAlrSPBhBaEiwAuLSDUFoyXPLcUKiHWTwyF-Aeh58ntWMno0_QkkR79zqNQ-uDDKOJuBYoVhoCFh8QAvD_BwE
135. Компрессор повітряний Dnipro-M AC-100 VG [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://dnipro-m.ua/uk/tovar/kompressor-ac-100-vg/?tab=characteristics>
136. Фильтр тонкой очистки воздуха (ФТОВ, НЕРА, ХЕПА) [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://tehnofilter.ua/ru/goods/view/6364274/all/filtr-tonkoy-ochistki-vozduha-ftov-hepa-hepa/>

137. Мультиголовочный весовой дозатор ВД-10К [Электронный ресурс] – Режим доступа: https://agrovektor.com/ua/physical_product/2960573-multigolovochnyy-vesovoy-dozator-dlya-sypuchih-produktov-vd10k.html
138. Вибрующе сито [Электронный ресурс] – Режим доступа: https://russian.alibaba.com/product-detail/wheat-vibrating-sieve-fine-milk-powder-food-china-vibratory-sieve-equipment-62126160529.html?spm=a2700.7735675.normal_offer.d_image.91b97cb8G5J0dl&=&#p
139. Порошковый змішувач VL-300 [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://minipress.ru/pharma/ukrainian/industrial-equipment/powder-mixers/mixer-v-shaped-for-powders-vl-300/>
140. Автоматичний капсулятор NJP-1200В/1500В [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://chumaki.in.ua/p474894066-avtomaticheskij-kapsulyator-njp.html>
141. Автоматическая Блистерная Линия DPP-120 [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://chumaki.in.ua/p1025311551-avtomaticheskaya-blisternaya-liniya.html>
142. *Фармакологическая* энциклопедия . [Электронный ресурс] – 2014. – Режим доступа: <http://farmakopea.ru>