

РЕФЕРАТ

Дипломна робота присвячена розробці технології отримання пробіотиків на основі бактерій *Lactobacillus*.

Проведений аналіз вітчизняної та закордонної літератури щодо технологій отримання біомаси бактерій роду *Lactobacillus* з використанням традиційних (молоко, лактоза) та промислових (сирна сироватка, м'яса) субстратів та перспектив використання пробіотиків в медицині, а саме для лікування та профілактики хвороб сечовидільної системи.

Зроблена порівняльна характеристика поживних середовищ для представників роду *Lactobacillus* та обрано найкращий біологічний агент (*L. rhamnosus* E / H), який у порівнянні з іншими (*L. plantarum* (штам не наведено), *Lactobacillus plantarum* PEN) утворює більше (23 г/л) біомаси.

Розраховано річну потребу населення України в цільовому продукті (біомасі) яка становить 114 кг.

Розроблено техніко-економічне обґрунтування та проект технології культивування *L. rhamnosus* E / H та біосинтезу. Проект виробництва препарату включає всі необхідні технологічні процеси виробництва лікарського засобу (ліофілізату у формі твердих желатинових капсул). В проекті проведене обґрунтування вибору необхідного обладнання для максимально економічно вигідного виробництва препарату.

Дипломна робота викладена на 101 сторінку друкованого тексту, містить 20 таблиць, 7 рисунків і складається з вступу, п'яти розділів, та списку використаної літератури (74 джерела).

Ключові слова: *L. rhamnosus* E / H, біомаса, пробіотичний препарат, сечовидільна система, інфекції.

ЗМІСТ

ВСТУП	6
РОЗДІЛ 1. ОСОБЛИВОСТІ ОТРИМАННЯ ПРОБІОТИЧНИХ МІКРООРГАНІЗМІВ РОДУ <i>LACTOBACILLUS</i> ТА ЇХ ПРАКТИЧНЕ ВИКОРИСТАННЯ	8
1.1. Використання традиційних субстратів для одержання біомаси молочнокислих бактерій.....	9
1.2. Промислові відходи як джерело вуглецю при культивуванні представників роду <i>Lactobacillus</i>	16
1.3. Перспективи використання молочнокислих бактерій у медицині.....	22
1.3.1. Профілактика та лікування хвороб сечовідвідних шляхів.....	24
РОЗДІЛ 2. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ВИПУСКУ СУБСТАНЦІЇ ДЛЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ (ЛЗ) ТА ВИРОБНИЦТВА ГОТОВОЇ ФОРМИ	29
2.1. Передумови виробництва.....	29
2.1.1. Аналіз фармакологічних властивостей цільового ЛЗ, галузей використання.....	30
2.1.2. Обсяг ринку та очікувані темпи його розвитку.....	31
2.1.3. Вибір форми випуску лікарського засобу.....	32
2.1.4. Опис лікарського засобу згідно АНД (проект АНД).....	33
2.2. Розрахунок потреби у субстанції для випуску ЛЗ.....	35
2.2.1. Перелік виробників кінцевого продукту і виробників (постачальників) субстанції.....	36
2.2.2. Розрахунок річної потужності виробництва субстанції, об'єму ферментера та кількості виробничих циклів.....	36
РОЗДІЛ 3. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ СУБСТАНЦІЇ ТА ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА ЛЗ	39

3.1. Обґрунтування вибору біологічного агенту, поживного середовища для його культивування	39
3.2. Обґрунтування вибору способу культивування і типу ферментера	42
3.3.Обґрунтування стадій виділення і очищення субстанції для виробництва ЛЗ	46
3.4. Обґрунтування вибору класів чистоти виробничих приміщень виробництва ЛЗ (підготовки персоналу, дезинфікуючих засобів, вентиляційного повітря)	59
РОЗДІЛ 4. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ	62
4.1. Матеріальний баланс ділянки біосинтезу	62
4.2. Специфікація обладнання ділянки виробничого біосинтезу	69
4.3. Опис технологічної схеми виробничого біосинтезу	70
4.4. Контроль ділянки біосинтезу.....	78
РОЗДІЛ 5. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ ВИРОБНИЦТВА БІОМАСИ	84
5.1. Специфікація обладнання ділянки виробництва ЛЗ	84
5.2. Опис технологічного процесу виробництва ЛЗ	85
5.3. Контроль ділянки виробництва	88
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	93

ВСТУП

Інфекції сечовивідних шляхів (ІСШ) належать до найпоширеніших захворювань як в амбулаторній, так і в стаціонарній практиці лікаря, вони обумовлені запальним процесом, передусім бактеріального генезу, що розвивається в різних анатомічних ділянках сечовивідної системи, від ниркової фасції до зовнішнього отвору уретри [1]

Найбільш частими збудниками є кишкові аероби, передусім кишкова паличка (*Escherichia coli*), що спричиняє в 75–90 % випадків захворювання, рідше збудником виявляється грампозитивна флора, а саме ентерококи, стафілококи (*Staphylococcus saprophyticus*), що характерні для хронічних латентних процесів [2]. Однак в умовах сьогодення перелік етіологічних чинників запального процесу з боку сечовивідних шляхів продовжує поповнюватись і визначається віковими особливостями.

Більш схильними до ІСВШ є жінки, переважно репродуктивного віку. Майже половина всіх жінок у світі хоча б один раз за своє життя перенесли епізод ІСВШ, причому одна з трьох – у віці до 24 років, а в періоді між 20 та 50 роками цистит у жінок зустрічається в 50 разів частіше, ніж у чоловіків. За таких умов відмічено 6–8 епізодів гострого циститу (ГЦ) упродовж року на 10 000 чоловіків віком від 21 до 50 років, що потребує урологічного обстеження та диференціальної діагностики стосовно переліку захворювань уrogenітального тракту, необхідності виключення можливої обструкції сечових шляхів [3].

Нині для лікування ІСШ використовують антибіотики широкого спектру дії, до яких резистентні більшість антибіотиків (фторхінолони і цефалоспорини). Така ситуація несе особливу загрозу для пацієнтів, які страждають урологічними захворюваннями.

					НУХТ БТЕК 02.02.11 КР ПЗ			
Зн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Пархоменко Т.Ю.			ВСТУП	Літ.	Арк.	Акрушіє
Керівник		Воронцов О.О.					6	100
Консультант						Кафедра БТМ		
Зав.каф.		Пирог Т.П.						

Тому на сучасному етапі більшість науковців шукають альтернативу антибіотикам, зокрема використання пробіотичних мікроорганізмів, які є нормальною мікрофлорою здорової людини, для профілактики та лікування таких інфекційних захворювань.

Так, деякі штами *Lactobacillus* пригнічують ріст потенційно патогенних бактерій за допомогою різних механізмів. В результаті метаболізму *Lactobacillus* утворюються органічні кислоти, зокрема молочна кислота і оцтова кислота, які сприяють низькому рН у вагінальній рідині, що є несприятливим для багатьох інших видів мікробів. *Lactobacillus* також можуть продукувати розчинні речовини, які безпосередньо пригнічують ріст потенційно патогенних бактерій і дріжджів. Також вони можуть продукувати перексид водню, який є токсичним для бактерій і грибів [4].

Однак, на даний час, кількість публікацій, що стосуються доказової медицини у використанні таких мікроорганізмів не багато чисельні. Це пов'язано з складністю підбору оптимальних умов культивування пробіотичних штамів, методів отримання готового лікарського препарату (зокрема стадій висушування і вибору захисного середовища) [5]

Така ситуація вказує на актуальність розробки технології отримання біомаси лактобактерій для їх використання у лікуванні та профілактиці захворювань сечовідвідних шляхів

Новизною даного проекту є використання *Lactobacillus rhamnosus* E/H для накопичення біомаси, який у порівнянні з іншими біологічними агентами (*L. plantarum* (штам не наведено) та *L. plantarum* PEN) утворює 23 г/л кінцевого продукту.

ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

РОЗДІЛ 1. ОСОБЛИВОСТІ ОТРИМАННЯ ПРОБІОТИЧНИХ МІКРООРГАНІЗМІВ РОДУ *LACTOBACILLUS* ТА ЇХ ПРАКТИЧНЕ ВИКОРИСТАННЯ

Пробіотики набувають все більшого значення в фундаментальних і клінічних дослідженнях, окрім цього вони також є предметом значного економічного інтересу через зростаючу популярність на тлі розвитку захворювань пов'язаних з зміною нормальної мікрофлори людини [1, 2]. Так, пробіотики знайшли своє використання у лікуванні захворювань шлунково-кишкового тракту, статевої і сечовивідної системи. Саме останні, щороку є причиною смертності людей у всьому світі. Така ситуація пов'язано перш за все з малою кількістю і ефективністю наявних лікарських засобів, зокрема антибіотиків, їх необмеженим використанням і швидким поширенням кількості резистентних мікроорганізмів [3]. Саме тому серед дослідників все більше інтересу викликають дослідження ролі пробіотичних штамів не тільки у профілактиці, а й лікуванні багатьох захворювань [4].

Підтвердженням цього є той факт, що починаючи з початку 1990-х до 2019 року наявна значна кількість публікацій присвячених як біотехнологічним способам отримання пробіотичних штамів (оптимізація параметрів культивування: складу компонентів поживного середовища, рН та температури культивування) так і поодинокі, клінічно підтвержені повідомлення, про практичне використання пробіотиків, зокрема на основі представників роду *Lactobacillus* [5]

У даному літературному огляді будуть розглянуто сучасні літературні дані про культивування представників роду *Lactobacillus* з метою отримання біомаси і шляхи їх практичного використання у лікуванні та профілактиці захворювань сечовидільної системи.

					НУХТ БТЕК 02.02.11 КР ПЗ			
Зн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Пархоменко Т.Ю.			РОЗДІЛ 1 ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушів</i>
Керівник		Воролицов О.О.					8	100
Консультант						Кафедра БТМ		
Зав.каф.		Пирог Т.П.						

1.1. Використання традиційних субстратів для одержання біомаси молочнокислих бактерій

Представники роду *Lactobacillus* зазвичай культивують на середовищі MRS, яке є складними, і як результат, макроелементи та мікроелементи такого середовища значною мірою не визначені, і у деяких випадках, не забезпечують накопичення максимальної кількості біомаси [6]. Тому у літературі наявні дослідження спрямовані на оптимізації такого традиційного середовища, зокрема внесенням до складу такого типового середовища, додаткових джерел вуглецю і азоту.

Оптимізація складу поживного середовища для накопичення біомаси

Так, наприклад у роботі [7] було встановлено можливість збільшення рівня біомаси, шляхом культивування *Lactobacillus plantarum* (штам не наведено) на модифікованому середовищі у яке додатково вносили різні вуглеводи: моносахариди глюкозу та лактозу у кількості 20 г/л та дисахариди галактозу і фруктозу у кількості 10 г/л. Додатково *L. plantarum* культивували на середовищі з перміатом сироватки (6%, масова частка) та дріжджовим автолізатом (0,5 %, масова частка). Результати показали, що використання таких багатих на поживні речовини середовищ впливає на утворення біомаси (див табл. 1.1), при цьому найвищий рівень синтезованої біомаси спостерігали у разі додавання у середовище моносахаридів. Дослідники це пояснюють «швидшим» залученням їх до метаболізму клітини, що безпосередньо впливає на ш накопичення біомаси.

У праці [8] оптимізували склад середовища MRS таким чином, що додавання синтетичної добавки (точна назва не наведена, виробник Sunrise Science Products) дозволило зменшити вміст компонентів у складі середовища на 70%, при цьому зі складу був повністю вилучений пептон, а кількість екстракту яловичини та дріжджового екстракту зменшилася у двічі (з 10 та 5 г до 5 та 2,5 г). При цьому автори зазначають, що така синтетична добавка є не тільки джерелом 20 амінокислот, а й слугувала джерелом піримідинів (урацилу), пуринів (аденіну) та інших метаболічних кофакторів,

включаючи інозитол і пара-амінобензойну кислоту. Однак така синтетична суміш не містить нікотинової кислоти, піридоксину гідрохлориду або пантотенової кислоти,

які є важливими факторами для представників роду *Lactobacillus*. У даній роботі автори не наводять кількість біомаси синтезованої на такому оптимізованому середовищі, а лише значення оптичної густини клітинної суспензії після культивування різноманітних штамів *Lactobacillus* spp, тому зробити висновки про ефективність такого поживного середовища не можна.

Окрім оптимізації складу середовища MRS, дослідники все більше уваги звертають на вплив умов культивування, а саме природи та концентрації джерела вуглецю у середовищі культивування пробіотичних штамів на накопичення біомаси.

У роботі [9] зібрана інформація з літературних оглядів з 1998 по 2014 рік про поживні середовища, які використовували для культивування представників роду *Lactobacillus*. Майже усі вони як джерело вуглецю містять глюкозу, джерело азоту – пептон, дріжджовий екстракт – джерело необхідних вітамінів групи В та амінокислот. Необхідні мікро- і мактоелементи містяться у вигляді солей. Однак така велика кількість органічних складових не завжди забезпечує високий рівень біомаси і у більшості випадків він не перевищував 5 г/л [9]. Одним з підходів до збільшення виходу біомаси є оптимізація складу поживних середовищ, тому публікації останніх років присвячених саме цьому, однак кількість таких публікацій на даний час є не великою.

Так, у роботі [10] дослідниками було показано, що використання оптимізованого поживного середовища, що містило (г/л): глюкозу – 13,4, піруват натрію – 3,4, м'ясний екстракт – 7,2, калій фосфат – 2,0, ацетат натрію – 5,0 цитрат амонію – 2,0 дало змогу отримати 5,5 г/л біомаси *Lactobacillus plantarum* PEN, у порівнянні з використанням середовища MRS (1,9 г/л) (не оптимізоване середовище). Окрім цього автори навіть підраховали вартість такого оптимізованого середовища. Не дивлячись на більшу кількість компонентів у його складі, вартість 1 л становила 6,75 долара, порівняно з типовим середовищем MRS, ціна якого за літр склала 9,92 долара.

Значно вищий рівень біомаси (14,97 г/л) вдалося отримати шляхом культивування *L. plantarum* (штам не наведено) на середовищі з лактозою (140 г/л, кінцева концентрація) пептоном (25 г/л) та дріжджовим екстрактом (15 г/л). Автори

зазначають, що лактоза у складі такого середовища може бути замінена на сирну сироватку. Відомо, що остання містить до 70% лактози у своєму складі і є побічним продуктом переробки молока, а отже її використання може вплинути не лише на вартість середовища, а й бути одним з шляхів утилізації цього промислового відходу [11].

У 2018 році Polak-Berecka з співавторами вдалося оптимізувати склад поживного середовища для отримання біомаси *L. rhamnosus* E/N, культивування штаму на якому не тільки забезпечувало найвищий вихід біомаси (23 г/л), а й вартість такого середовища порівняно зі стандартним була набагато меншою. Так, оптимізоване середовище містило (г/л): глюкозу – 15.4, піруват натрію –3,92, м'ясний екстракт – 8, калій фосфат – 1,88 , ацетат натрію – 4,7 та цитрат амонію – 1,88. У даному випадку автори не рахували вартість одного літра середовища, а визначали ціну за 1 г вже сухої біомаси. Так, було встановлено, що вартість 1 г біомаси *L. rhamnosus* E/N, отриманої шляхом культивування штаму на середовищі становила 0,44 Євро, тоді як на оптимізованому вартість була на 25% меншою, що вказує на рентабельність використання саме оптимізованого середовища [12].

Узагальнені дані щодо синтезу біомаси представниками роду *Lactobacillus* на традиційних, оптимізованих поживних середовищах наведено у таблиці 1.1.

Варто зазначити, що ключовою особливістю представників роду *Lactobacillus* є здатність до синтезу бактероцинів – невеликих рибосомально синтезованих пептидів з антимікробними властивостями. Саме завдяки останнім біомаса молочнокислих бактерій використовується не лише для поліпшення самопочуття на тлі прийому антибіотиків чи постінфекційному захворюванні, а й для лікування багатьох хвороб пов'язаних зі зміною нормальної мікрофлори патогенною.

Тому у літературі наявна велика кількість публікацій про синтез бактеріоцинів, зокрема на оптимізованому середовищі MRS. Окрім цього, у більшості цих робіт, автори окрім оптимізації складу середовища, здійснюють підбір оптимально значення рН та температури культивування. Так у роботах [13-16] було оптимізовано склад середовища MRS, зокрема зміною кількості основних компонентів середовища: триптон, м'ясного та дріжджового екстракту [13-15], які

безпосередньо впливають на співвідношення вуглець/азот у складі середовища, а отже і на синтез біактеріоцину чи внесенням у середовище додаткових факторів росту (наприклад біотину) [16]. При цьому концентрація утворених бактеріоцинів на оптимізованих середовищах була у 3,3-45 разів вищою у порівнянні з такою на не оптимізованих середовищах (табл. 1.2). Майже не вплинула на концентрацію утворених бактеріоцинів оптимізація складу середовища для культивування *L. lactis* ATCC 11454, кількість бактеріоцину вдалося збільшити лише в 1,3 рази. Щодо оптимізації параметрів культивування, то усіх випадках оптимальною температурою культивування було 30°C, а рН у діапазоні 5,5-6,5.

Варто зазначити, що у даних роботах визначали лише кількість синтезованих бактеріоцинів, і не досліджували як оптимізація складу поживного середовища чи параметрів впливатиме на утворення біомаси і її кінцевий вихід. Отже, наведені дані засвідчують необхідність проведення комплексних досліджень у цій області.

Узагальнені дані щодо культивування представників роду *Lactobacillus* на традиційних субстратах

Штам	Поживне середовище	Кількість біомаси (г/л)	Література
<i>Lactobacillus plantarum</i>	MRS* +20 г/л глюкози	5,76	[7]
	MRS* +20 г/л лактози	5,3	
<i>Lactobacillus plantarum</i> PEN	MRS*	1,9	[10]
	Оптимізоване середовище: глюкоза – 13,4, піруват натрію – 3,4, м'ясний екстракт – 7,2, калій фосфат – 2,0, ацетат натрію – 5,0 цитрат амонію – 2,0	5,5	
<i>Lactobacillus plantarum</i> (штам не наведено)**	Оптимізоване середовище: Лактоза – 140, пептон – 25, дріжджовий екстракт – 15	14,97	[11]
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> E/N**	Оптимізоване середовище: глюкоза – 15.4, піруват натрію – 3,92, м'ясний екстракт – 8, калій фосфат – 1,88, ацетат натрію – 4,7 та цитрат амонію – 1,88.	23	[12]

Примітка: *- склад середовища MRS: пептон – 10, глюкоза – 20, м'ясний екстракт – 8, цитрат амонію – 2.0, ацетат натрію – 5,0, сульфат магнію – 0,2, сульфат марганцю – 0,05, дигідрофосфат калію 2.0

** - дані щодо кількості біомаси на не оптимізованих середовищах не наведено.

Оптимізація складу поживного середовища для синтезу бактеріоцинів

Штам	Поживне середовище	Умови культивування	Кількість бактеріоцинів, Од/мл	Література
<i>Lactobacillus acidophilus</i> IBV 801	Не оптимізоване середовище MRS*	рН 5,5-6,5, температура 30°C. максимальне накопичення бактеріоцину на 14 год культивування	3800	[13, 14]
	Оптимізоване середовище (г/л): триптон – 10, м'ясний екстракт – 5, дріжджовий екстракт – 5, мальтоза – 20, манноза – 20		12800	
<i>Lactobacillus pentosus</i> ST151BR	Не оптимізоване середовище MRS*	рН 4,5, температура 30°C	1600	[15]
	Оптимізоване середовище (г/л): триптон – 12,5, м'ясний екстракт – 7,5, глюкоза – 20, мальтоза – 20	рН 5,5-6,5, температура 30°C	6400	
<i>Lactobacillus plantarum</i> st31	Не оптимізоване середовище MRS*	рН 6,5, температура 30°C	1400	[16]
	Оптимізоване середовище (% масова частка): м'ясний екстракт – 1,5, дріжджовий екстракт – 1, біотин – 0,01 мг/мл		6400	

Продовження таблиці 1.2

<i>Lactococcus lactis</i> ATCC 11454	Не оптимізоване середовище (г/л): сахароза– 10, соєвий пептон– 10, дріжджовий екстракт– 10, фосфат калію– 10, сульфат магнію – 2, хлорид натрію – 0,2	рН 6,8, температура 30°C, швидкість обертів мішалки 180 об/хв	1593	[17]
	Оптимізоване середовище (г/л): Сахароза – 10, соєвий пептон – 4,8, дріжджовий екстракт – 10, фосфат калію – 28,1, сульфат магнію – 2, хлорид натрію – 0,2		2100	

Примітка:*- склад середовища MRS: пептон – 10, глюкоза – 20, м'ясний екстракт –8, цитрат амонію – 2.0, ацетат натрію –5,0, сульфат магнію –0,2. сульфат марганцю –0,05, дигідрофосфат калію 2.0

1.2. Промислові відходи як джерело вуглецю при культивуванні представників роду *Lactobacillus*

Не зважаючи на підбір оптимальних умов культивування, що дають змогу досягти аж 23 г/л біомаси, використання традиційних субстратів, має ряд обмежень пов'язаних перш за все з високою вартістю такого середовища. Нині все більш актуальним є пошук альтернативних субстратів серед промислових відходів, таких як м'яса, відхід переробки сої чи сирна сироватка. Саме вони за рахунок низької собівартості та наявності у великих обсягах є потенційними субстратами у біотехнології, в тому числі для одержання пробіотиків.

Сирна сироватка – одна з головних субпродуктів молочної промисловості, і нині, є основним забруднювачем стічних вод через високий хімічний та біохімічний рівень споживання кисню. Тому утилізація такого промислового відходу є актуальною перш за все з економічної точки зору (великі обсяги виробництва – великі витрати на переробку відходів). Тому все частіше сирну сироватку використовують у технології мікробного синтезу як дешевий субстрат для отримання молочної кислоти. Однак є роботи у яких її використовують і для отримання біомаси молочнокислих бактерій [18-20].

Так, у праці [19] було показано можливість використання сирної сироватки (50 г/л) для отримання біомаси *L.delbrueckii* subsp. *bulgaricus* PTCC1737, при цьому концентрація синтезованої біомаси не перевищувала 5,2 г/л. Варто зазначити, що у даному випадку як джерело азоту використовували дріжджовий екстракт (10 г/л) .

Значно більшу концентрацію біомаси (16,01 г/л) вдалося отримати шляхом культивування *L.plantarum* AS-14 на сирній сироватці (75 г/л) з додавання глюкози (20 г/л) та дріжджового екстракту (8 г/л) При цьому як джерело азоту використовували кукурудзяний екстракт (20 г/л) [20]. Нині саме кукурудзяний екстракт з поміж інших потенційних джерел азоту (пептон, м'ясного екстракт) є дешевим і доступним.

Меляса - найпоширеніший відновлюваний вуглеводмісний відхід переробки цукрових буряків, тростини. Завдяки високому вмісту сахарози, використовується у біотехнологічних процесах отримання етилового спирту, органічних кислот та біомаси пробіотичних штамів.

Автори праці [21], опублікованої у 2019, підсумували наявну інформацію (з 2004 по 2016 рік), про синтез біомаси різноманітними штамми молочнокислих бактерій в тому числі і на мелясі. Варто зазначити, що кількість таких робіт є обмеженою, а у наявних, концентрацію біомаси не визначали, а лише вказували кількість колоній-утворюючих одиниць (КУО) на певний об'єм культурального середовища, і лише в поодиноких роботах ваговим методом з визначення кількості сухої біомаси. Так, наприклад у 2004 році було встановлено, що *Lactobacillus reuteri* на середовищі з 32 г/л меляси у яке додатково вносили (5 %, об'ємна частка) дріжджового автолізату синтезує до 4,5 г/л біомаси. При цьому такий процес накопичення біомаси відбувається у анаеробних умовах. Подача аераційного повітря і заміна дріжджового екстракту на казеїн пептону (10%, об'ємна частка) дала можливість накопичити до 5,5 г/л біомаси [21].

У кінці 2019 року, було опубліковано роботу у якій було показано можливість використання меляси (10%, об'ємна частка) для накопичення біомаси *L.plantarum* RPR42. При цьому автори досліджували не лише можливість використання меляси, а й оптимізації складу поживного середовища, за рахунок підбору найкращого джерела азоту з-поміж кукурудзяного екстракту, екстракту зародків пшениці та сирної сироватки. Так, авторами було встановлено, що оптимальним джерелом азоту є суміш кукурудзяний екстракт (7,5% об'ємна частка), екстракту зародків пшениці (3,2 % об'ємна частка) та слідових кількостей сирної сироватки, що забезпечувало синтез 12,6 г/л біомаси [22].

Інші промислові відходи. Окрім сирної сироватки і меляси, одним з потенційних джерел вуглецю для вирощування молочнокислих бактерій може бути рідка фракція (залишки), що утворюються після вилучення

соєвого протеїну. Такі відходи містять цукри та білки з низькою молекулярною масою, останні можуть без проблем катаболізуватися до амінокислот і залучатися до подальших метаболічних процесів. Тому у праці визначали можливість використання такого відходу та оптимізації складу поживного середовища для *L. plantarum* BL011, що містило: відхід, після екстракції соєвого білка (5-20 г/л), кукурудзяного екстракту (5-20 г/л), соєвого пептону (2-5 г/л), дріжджового екстракту (2-15 г/л). Так, було встановлено, що використання відходу після екстракції соєвого білка, який попередньо гідролізують до кількості цукрів 40 г/л та дріжджового екстракту (15 г/л) забезпечує максимальну кількість утвореної біомаси, а саме 17,87 г/л. Окрім оптимізації складу середовища авторами були підібрані й інші оптимальні умови культивування: швидкість перемішування (200 об/хв.), рН (5,5) та температура культивування 25°C. Отримані дані дали можливість авторам припустити, що саме таке поживне середовище, без наявності лактози чи тваринних компонентів (на прикладі м'ясного екстракту) може стати чудовою альтернативою для отримання пробіотиків [23] однак у даній роботі автори не зазначають їх можливого практичного використання.

Тим не менше, у літературі наявні поодинокі відомості про використання промислових відходів для накопичення біомаси і її практичне використання. Так, у праці [24] було показано можливість використання гідролізованого соку рослини таро, у який додатково вносили глюкозу 6,8-46,8 г/л, різноманітні джерела азоту (рибне, куряче, кісткове борошно, соєвий шрот, кукурудзяний протеїн) для накопичення клітин *L. acidophilus* BRCR 14079. При цьому автори визначали не біомасу, а кількість КУО/мл. Так, максимальна кількість колоній утворюючих одиниць (9,2 КУО/мл) спостерігали при культивуванні штаму на гідролізованому соку таро з додаванням глюкози (37 г/л) кукурудзяним борошном (25 г/л) та додатковим внесенням дріжджового автолізу (1 г/л). При цьому автори показали можливість використання термічно інактивованих клітини штаму як протипухлинних та імуномодулюючих агентів.

Також у літературі зустрічаються дані про можливість використання для отримання біомаси соку ананасу [25]. Варто зазначити, що у робот [25] сік ананасу не доповнювали додатковими вуглецевими чи азотними субстратами, при цьому його використання забезпечувало синтез біомаси трьома штамми *Lactobacillus sp* (FTDC 8133, FTDC 3666, та FTDC 8264), рівень якої становив 5,2-5,4 г/л і майже не відрізнявся від такої у разі культивування усіх штамів на середовищі MRS (5,6-5,8 г/л). Автори зазначають, що ананас є другим за споживанням та вирощуванням фруктів після бананів, що охоплює більш ніж 20% світового виробництва тропічних фруктів. Ананасові відходи є побічним продуктом ананасової промисловості і складаються із залишкової м'якоти, шкірки та шкіри. Близько 30% ананасів перетворюються на відходи під час консервування. Ці відходи можуть спричинити проблеми із забрудненням навколишнього середовища, якщо їх не використовувати, оскільки вони все ще містять високий вміст вуглеводів, а також високий вміст клітковини та низький вміст білка. Тому, виходячи з фізико-хімічних властивостей таких відходів, вони можуть бути використані як джерело вуглецю для отримання не тільки біомаси, а й, наприклад, молочної кислоти.

Окрім цього у огляді [21] є дані про можливість використання соку алое-вера, соку апельсину, яблука та кокосової води для отримання молочнокислих бактерій.

Отже, для отримання біомаси молочнокислих бактерій, окрім традиційних вуглецевих субстратів (глюкози та лактози), можуть бути використані і промислові відходи сирної промисловості, переробки буряка, соєвого білка та харчової промисловості. Варто зазначити, що залучення таких субстратів у біотехнологічні процеси, у деяких випадках більш ефективніше ніж використання, традиційних джерел вуглецю та азоту.

Узагальнені дані, що утворення біомаси представниками роду *Lactobacillus* наведено у таблиці 1.3.

Узагальнені дані щодо культивування представників роду *Lactobacillus* на промислових відходах

Штам	Субстрат (джерело вуглецю та азоту) г/л	Кількість синтезованої біомаси (г/л)	Література
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> PTCC1737	Сирна сироватка – 50 , дріжджовий екстракт – 10	5,2	[19]
<i>Lactobacillus plantarum</i> AS-14	Сирна сироватка – 75 глюкоза – 20 , кукурудзяний екстракт – 20+цитрат амонію – 2,0	16,01	[20]
<i>Lactobacillus reuteri</i>	М'яса – 32, дріжджовий автолізат – 5%, об'ємна частка	4,5	[21]
	М'яса – 32, казеїн пептону – 10%, об'ємна частка	5,5	
<i>Lactobacillus plantarum</i> RPR42	М'яса – 10 % об'ємна частка. кукурудзяний екстракт – 7,5% об'ємна частка , екстракт зародків пшениці – 3,2 % об'ємна частка, слідові кількості сирної сироватки (кількість не наведено)	12,6	[22]

<i>Lactobacillus plantarum</i> BL011	відхід, після екстракції соєвого білка (гідролізовний, кількість цукрів 40 г/л), дріжджовий екстракт – 15	17,87	[23]
<i>Lactobacillus acidophilus</i> BRCR 14079	гідролізований сік таро, глюкоза – 37, кукурудзяне борошно –25	9,2*	[24]
<i>Lactobacillus sp</i> (FTDC 8133, FTDC 3666, та FTDC 8264)	Ананасовий сік	5,2-5,4	[25]

Примітка: * - концентрація біомаси наведена у КУО/мл

1.3. Перспективи використання молочнокислих бактерій у медицині

На теперішній час однією з гострих проблем є швидке поширення антибіотико-резистентних штамів мікроорганізмів, що є причиною виникнення та поширення інфекційних хвороб у людей [26]. Особливо проблемним є підвищення резистентності до антибіотиків широкого спектру дії, таких як, як фторхінолони та цефалоспорини. Така ситуація несе особливу загрозу для пацієнтів, які страждають урологічними захворюваннями. Тому на сучасному етапі більшість науковців шукають альтернативу антибіотикам, зокрема використання пробіотичних мікроорганізмів, які є нормальною мікрофлорою здорової людини, для профілактики та лікування таких інфекційних захворювань.

Вивчення пробіотичної терапії у даному розрізі проблеми датується ранньою частиною 20 століття, коли вперше були використані молочнокислі бактерії для лікування циститу у жінок. Так, у 1970-х, коли канадський уролог Ендрю Брюс спостерігав зменшення кількості лактобактерій у жінок під час інфекційних захворювань сечовідвідного каналу [27]. У 1982 році було відкрито бактерії *Lactobacillus rhamnosus* GR-1, що призвело до дослідження їх використання для боротьби з патогенними мікроорганізмами [28] особливо на тлі рецидивуючих інфекцій сечовидільних шляхів (РІСШ) у жінок та чоловіків.

З початку XXI століття все більшу увагу лікарів різних спеціальностей приділяється питанню РІСШ. Якщо 20 років тому рецидиви ІСШ відзначалися у 10% перехворілих гострою інфекцією [29], то зараз - вже у 30% [30, 31]. І навіть ця частка, швидше за все, занижена, так як близько 50% хворих не звертаються до лікаря. Збільшення числа рецидивів ІСШ і складність ведення даної патології пов'язані з нераціональним використанням антибіотиків та дедалі більшої резистентністю мікробної флори до них, збільшенням числа інструментальних втручань на сечовивідних шляхах, частими супутніми гінекологічними захворюваннями, самолікуванням і ін. [32].

Збудники, їх поширення та стійкість при інфекціях сечовідвідних шляхів. Основним патогеном, що є причиною виникнення та рецидиву захворювання сечовидільної системи є різноманітні штами *Escherichia coli*. Патогенез перебігу інфекційного захворювання, спричинених *E. coli*, включає наступні фази:

- а) колонізацію *E. coli* переуретральній і вагінальній областях;
- б) сходження в просвіт сечового міхура і ріст клітин *E. coli* в сечі у вигляді планктонних форм;
- в) прилипання до поверхні і взаємодія з системою захисту епітелію сечового міхура;
- г) формування біоплівки;
- д) інвазія та реплікація шляхом утворення внутрішньоклітинних бактеріальних спільнот сечового міхура;
- е) колонізацію нирок і пошкодження тканини господаря з підвищеним ризиком бактеріями-збудниками, що в кінцевому випадку викликають сепсис [32].

В Європі резистентність *E. coli* до цефалоспоринів третього покоління становить в середньому 11,8%, до фторхінолонів - 22,3%. У США до 2010 р. резистентність до фторхінолонів серед госпіталізованих пацієнтів була 31,3% [33].

Найбільш ефективними антибіотиками проти всіх штамів *E. coli* визнані імipенем (100%), ертапенем (99,98%) і нітрофу рантоін (99,91%) [34]. У той же час ефективність деяких найбільш поширених препаратів знижується. Так, ефективність ампіциліну становить 96,42%, тетрацикліну - 85,71%, амікацину - 71,42%, ципрофлоксацину - 67,85% і гентаміцину - 58,71% [35].

Тому все більше досліджень присвячені вивченню можливостей використання латобактерій.

Механізм дії молочнокислих бактерій у урогенітальній системі. Бактерії роду *Lactobacillus* здатні розмножуватися в урогенітальному тракті і витісняючи патогенні мікроорганізми. Однак доказова база даного методу

лікування достатньо не вивчена. Передбачається, що лактобацили своєрідним комплексом, що не тільки запобігає розвитку та адгезії патогенних мікроорганізмів, а також є стимулятором неспецифічного імунітету, процесів фагоцитозу. Пробиотики виробляють антимікробні сполуки і видозмінюють специфічні рецептори до токсинів, блокуючи таким чином опосередковані токсинами реакції. Пробиотичні мікроорганізми конкурують з патогенними бактеріями за поживні речовини або місця адгезії. Позитивні ефекти пробіотиків, що виходять за місце колонізації, можуть пояснюватися модуляцією системних імунологічних реакцій. Зокрема, встановлено збільшення загальної кількості CD4 + і CD8 + Т-лімфоцитів у хворих, які отримували пробіотики

Імуномодулюючі механізми дії пробіотиків включають в себе індукцію утворення слизу, активацію макрофагів лактобацилами, стимуляцію секреторного імуноглобуліну А (IgA) і нейтрофілів, пригнічення вивільнення запальних цитокінів, підвищення активності природних клітин-кілерів та інші. Імуномодулюючі ефекти пробіотиків можуть залежати від стану імунітету людини і дози препарату, а також різнитися у різних штамів пробіотиків [36-39].

1.3.1. Профілактика та лікування хвороб сечовідвідних шляхів

У даний час у літературі наявні лише поодинокі відомості про використання молочнокислих бактерій. Так до 2009 року їх використовували лише з профілактичною метою у людей, що перехворіли на інфекції сечовідвідних шляхів (табл. 1.4) [40]

Варто значити, що дослідники у роботі [40] встановили, що окрім позитивного впливу молочнокислих бактерій на стан жінок, мікроорганізми по-різному адгезувалися на стінках внутрішніх органів, що потрібно враховувати під час розробки таких пробіотиквмісних препаратів. Окрім цього вони знайшли докази того, що саме деякі штами *Lactobacillus* (зокрема, *L. rhamnosus* GR-1 та *L. reuteri*) для лікування рецидивуючих урогенітальних інфекцій.

Дане дослідження було підтверджено і пізніше коли Veerroot зі співавторами провели рандомізоване подвійне сліпе дослідження, в якому порівнювали протирецидивний ефект препарату, який містить *L. rhamnosus* GR-1 та *L. reuteri* RC-14, і триметоприму/сульфаметоксазолу у жінок (n = 252) постменопаузального віку, які мали в анамнезі щонайменше три симптоматичні епізоди ІСШ протягом попереднього року. Авторами було виявлено, що неперервна профілактика з використанням пробіотика протягом року не менш ефективна, ніж застосування триметоприму/сульфаметоксазолу. Проте суттєвою перевагою лактобацил є відсутність формування резистентності до антибіотиків [41]. Безумовно, пробіотики не впливають на ерадикацію збудника інфекції, проте сприяють зниженню частоти рецидивів і запобігають розвитку бактеріальної резистентності.

З моменту публікації огляду [40], з'явилися лише дві праці щодо використання представників роду *Lactobacillus*. Що були підсумовані у роботі [42] (табл. 1.5)

Таким чином, вивчення біологічних властивостей нормальної мікробіоти та її взаємовідносин з макроорганізмом дали можливість з нових позицій підійти до розробки сучасних пробіотичних засобів і тактики їх призначення [43, 44]. Досягненням останніх років є створення інноваційних мультивидових та мультиштамових препаратів, що поєднують властивості декількох пробіотиків [45].

На українському фармацевтичному ринку представлена розробка компанії «Фармак» Лактіале® Уро, що являє собою комплекс пробіотичних культур *Lactobacillus acidophilus* та *Lactobacillus plantarum*. *L. acidophilus* та *L. plantarum* мають активність щодо поширених у сечовидільній системі патогенів – *E.coli* та *E. faecalis*. Ці лактобактерії мають високу антагоністичну активність по відношенню до патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів (ентеропатогенних кишкових паличок, протей, дизентерійних бактерій, сальмонел, коагулазопозитивних стафілококів та ін.)

та кислотоутворюючу здатність, тим самим, здійснюють коригуючу дію на мікрофлору кишечника; мають здатність синтезувати вітаміни групи В (В5 і В12), підвищуючи імунологічну реактивність організму [46].

Отже, пробіотики у сучасних умовах знайшли широке застосування для підтримання здоров'я, а також лікування і профілактики багатьох захворювань. Сфера використання цих засобів постійно розширюється. Удосконалюються й самі пробіотики, створюються мультиштамові та мультивидові препарати, які мають суттєві переваги перед засобами, що містять лише один вид або штам бактерій [47-49]. З огляду на склад уринарного мікробіому в нормі і патології та в умовах зростання антибактеріальної резистентності, застосування пробіотиків в урологічній практиці може розглядатись як перспективний напрямок терапії. Проте для широкого впровадження цих засобів необхідне проведення подальших досліджень [50].

Узагальнені дані, щодо лікування та профілактики інфекцій сечовідвідних шляхів з використанням представників роду *Lactobacillus* [37]

Тип досліджень	Кількість хворих	Тип хворих	Спосіб введення	Штам	Тривалість лікування
Рандомізовані, плацебо-контрольовані випробування	41	Жінки до менопаузи, після антибіотикотерапії	Інвагінально (супозиторії)	<i>Lactobacillus casei</i> var. <i>rhamnosus</i> GR-1; <i>Lactobacillus fermentum</i> B54 1.6x10 ⁹ /капсулу	Двічі на тиждень, впродовж двох тижнів, далі кожні 2 місяці
Квазіекспериментальні випробування	10	Жінки до та після менопаузи з рецидивуючою інфекцією сечовивідних шляхів (більше 4 випадків за рік)	Інвагінально (супозиторії)	<i>Lactobacillus casei</i> var. <i>rhamnosus</i> GR-1; <i>Lactobacillus fermentum</i> B54 >1.6x10 ⁶ /капсулу	Щотижня впродовж 12-16 місяців
Рандомізовані, одиночні сліпі випробування	55	Здорові жінки до менопаузи (більше 4 випадків інфекцій сечовивідних шляхів за рік)	Інвагінально (супозиторії)	<i>Lactobacillus casei</i> v. <i>rhamnosus</i> GR-1; <i>Lactobacillus fermentum</i> B54 1x10 ⁹ /флакон	Щотижня впродовж 12 місяців
Рандомізовані, відкрито контрольовані випробування	150	Здорові жінки до менопаузи	Орально	<i>Lactobacillus</i> GG 4x10 ¹⁰ КУО/100мл	5 днів на тиждень впродовж 1 року
Квазіекспериментальні випробування	9	Здорові, молоді жінки, 2 випадки інфекцій сечовивідних шляхів за рік	Інвагінально (супозиторії)	<i>Lactobacillus crispatus</i> GA 98322, 1x10 ⁸ КУО/капсулу	Кожні 2 дні впродовж 1 року

Сучасні дані, щодо лікування та профілактики інфекцій сечовідвідних шляхів з використанням представників роду *Lactobacillus* [39]

Місце, рік проведення досліджень	Тип досліджень	Кількість хворих	Штам пробіотичних культур	Доза, спосіб введення, тривалість лікування, тривалість спостереження	Попередня обробка медикаментами	Результат використання пробіотика
Нідерланди, 2012 рік	Рандомізовані контрольовані випробування	252	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GR-1 <i>Lactobacillus reuteri</i> RC-14	109, оральні капсули, 6 місяців, 15 місяців	Триметоприм сульфаметоксазол	Немає суттєвої різниці в рецидиві інфекції сечовивідних шляхів між пробіотиками та контролем; Зниження середньої повторюваності інфекції сечовивідних шляхів за рік; Зниження стійкості до антибіотиків в пробіотичній групі
США, 2011		100	Препарат, що містить <i>Lactobacillus crispatus</i> (CTV-05)	2×10^9 , вагінальні капсули, 3 місяці, 3 місяці	Невизначений "стандарт" лікування	Суттєва різниця в колонізації <i>Lactobacillus crispatus</i> в пробіотичній групі "Колонізація на високому рівні з <i>Lactobacillus crispatus</i> " Зниження вірогідності виникнення рецидиву інфекції сечовивідних шляхів

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

2.1. Передумови виробництва

Інфекції сечовивідних шляхів (ІСШ) відносяться до найбільш поширених інфекційних захворювання, які вимагають значних фінансових витрат. У США на ІСШ припадає понад 7 млн візитів до лікаря в рік [5]. Близько 15% всіх амбулаторно призначених в США антибіотиків призначаються у зв'язку з такими інфекціями і в деяких регіонах Європи спостерігаються схожі показники [52].

У США ІСШ є причиною понад 100 тис. госпіталізацій на рік, переважно з приводу пієлонефриту [53]. Ці показники не охоплюють ускладнені ІСШ, що розвиваються у урологічних хворих, поширеність яких невідома.

На частку ІСШ доводиться, як мінімум, 40 % всіх нозокоміальних інфекцій, які в більшості випадків обумовлені катетеризацією сечового міхура [52]. У 25% пацієнтів з встановленим сечовим катетером більше тижня розвивається бактериурия, при цьому щоденний ризик її розвитку становить 5-7% [52].

У нещодавно проведеному дослідженні Global Prevalence Infection in Urology (Поширеність урологічних інфекцій в світі) (GPIU) показано, що у 10-12% хворих, які перебувають в урологічних палатах, розвивається інфекція, пов'язана з медичними втручаннями. Штами мікроорганізмів, виділені у таких пацієнтів, мають велику резистентність до антимікробних препаратів [53].

Така ситуація, особливо на тлі антибіотико-резистентності вказує на необхідність розробки альтернативних, антибіотикам лікарських препаратів, які можуть використовуватися для лікування інфекційних захворювань сечовідвідних шляхів різної етіології у доросли та дітей.

					НУХТ БТЕК 02.02.11 КР ПЗ			
Зн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат				
Розроб.		Пархоменко Т.Ю.			РОЗДІЛ 2. Техніко-економічне обґрунтування випуску субстанції для лікарського засобу (ЛЗ) та виробництва готової форми	Літ.	Арк.	Акрушів
Керівник		Воронцов О.О.					29	100
Консультант						Кафедра БТМ		
Зав.каф.		Пирог Т.П.						

2.1.1. Аналіз фармакологічних властивостей цільового ЛЗ, галузей використання

Цільовий лікарський засіб являє собою ліофільно висушену бомасу представників роду *Lactobacillus*, а саме *Lactobacillus rhamnosus* GR-1® і *Lactobacillus reuteri* RC-14®. Медичний препарат, що містить ці бактерії зареєстровано під торговою назвою Вагісан®/Vagisan® у вигляді твердих желатинових капсул [54].

Vagisan® відновлює і підтримує природний баланс вагінальної мікрофлори.

Якісний та кількісний склад

Діюча речовина: 1 капсула містить бактерій *Lactobacillus rhamnosus* GR-1® - 10 мг (9,00 мг - 11,00 мг) і *Lactobacillus reuteri* RC-14® - 41 мг (36,90 мг - 45,10 мг) здатних до розмноження.

Допоміжні речовини: глюкоза безводна, крохмаль картопляний, целюлоза мікрокристалічна, магнію стеарат, желатин, титану діоксид.

Код АТС. G02C. Інші засоби, що застосовуються у гінекології.

Імунологічні і біологічні властивості

Капсули Вагісан®/Vagisan® використовуються для відновлення і підтримки природного балансу вагінальної мікрофлори. Природні лактобацили становлять більшу частину флори піхви та підтримують кисле середовище, що запобігає заселенню шкідливих мікроорганізмів. Нормальна піхвова флора характеризується позитивною рівновагою між корисними бактеріями, в основному, лактобацилами, а також потенційними патогенними бактеріями і дріжджами.

Стрес, слабкість імунної системи, гормональні впливи або лікування антибіотиками може мати несприятливий вплив на баланс вагінальної флори.

Зниження якості вагінальної флори збільшує значення рН, що призводить до виникнення вагінальних інфекцій. Вагісан®/Vagisan® капсули містять *Lactobacillus rhamnosus* GR-1® і *Lactobacillus reuteri* RC-14®, дія яких спрямована на підтримку і відновлення піхвової мікрофлори. Препарат сприяє збільшенню кількості природних лактобактерій в піхвовому середовищі,

покращує мікрофлору піхви. Лактобактерії сприяють стимулюванню імунної системи і формують слабокисле середовище, попереджаючи розвиток урологічних та гінекологічних інфекційних захворювань.

Показання для застосування. Препарат призначають жінкам і дівчатам, що досягли статевої зрілості. Патологічно змінена мікрофлора піхви:

- під час і після вагітності;
- під час і після перенесеної інфекції, що передається статевим шляхом;
- під час і після лікування антибіотиками;
- в період застосування ліків, що впливають на якість піхвової флори (пероральні контрацептиви);
- під час і після застосування гормональних препаратів;
- в комплексній терапії уrogenітальних інфекцій;
- при розладах, зумовлених стресом;
- при послабленні імунної системи.

Спосіб застосування і дози

Препарат приймають перорально. Капсули слід застосовувати під час прийому їжі, запиваючи водою. У складі комбінованої терапії при гострому та хронічному порушенні мікрофлори піхви слід приймати 1-2 капсули на добу впродовж 2-4 тижнів.

Під час лікування пероральними антибіотиками рекомендується приймати: 2 капсули на добу впродовж 2-4 тижнів. Препарат слід приймати не менше ніж за 2 години до або після застосування антибіотиків.

Навіть після прийому по 1 капсулі на добу терапевтичний ефект зазвичай спостерігається через 2 тижні.

Застосування при вагітності та годуванні груддю

Препарат можна застосовувати у період вагітності та годуванні груддю.

Виробник. «Ядран» Галенська Лабораторія д.д., Хорватія

2.1.2.Обсяг ринку та очікувані темпи його розвитку

Аналогом пропонованого препарату є лише Лактіале® Уро – комплекс пробіотичних культур *Lactobacillus acidophilus* та *Lactobacillus plantarum* з

вітаміном А та екстрактом журавлини, розроблений компанією АТ «Фар мак», і може бути використаний для лікування та профілактики захворювань сечовідвідної системи [55].

Відповідно обсяги ринку та орієновані темпи його розширення будуть високими, враховуючи те, що на ринку присутній лише один вітчизняний пробіотичний препарат, що може бути використаний у лікуванні та профілактиці таких захворювань

2.1.3. Вибір форми випуску лікарського засобу

За формою випуску пробіотики діляться на дві групи - рідкі та сухі.

Більшість дослідників вважають, що краще у складі пробіотиків застосовувати живі культури. Проте, по-перше, це вимагає суворого дотримання умов придатності, по-друге, термін зберігання у зазначених препаратів коротший за ліофілізовані аналоги – не більше трьох місяців.

Рідкі пробіотики можуть складатися з:

- мікроорганізмів, які знаходяться у фізіологічно активному стані;
- спеціального живильного середовища, що служить джерелом живлення фізіологічно активних бактерій;
- додатково введених інгредієнтів, які підсилюють ефективність препарату (водорозчинні вітаміни, мікро- і макроелементи, амінокислоти тощо);
- метаболітів (продукти життєдіяльності бактерій).

Рідка форма відкриває можливість введення пробіотичних препаратів різними шляхами (вагінально, перорально, інтраназально, ректально тощо). Також вони можуть бути використані при полосканні ротової порожнини, їх можливо наносити на шкіру і на волосяну частину голови, в залежності від необхідності відновлення мікроекології різних біологічних ніш [14].

Сухі пробіотики - це ліофілізовані мікроорганізми, які можуть перебувати у порошку, капсулах, таблетках. Термін зберігання сухих препаратів більш тривалий, ніж рідких, до того ж вони менш залежні від умов зовнішнього середовища і, таким чином, не вимагають суворого дотримання критеріїв зберігання.

Тому багато фірм, особливо зарубіжних, вважають доцільним виробляти саме сухі пробіотики, які також набагато зручніші і в транспортуванні.

Тому не дивлячись на переваги використання рідких пробіотиків, доцільно буде виготовляти сухий пробіотичний препарат у формі капсул. Вибір такої форми випуску обумовлений тим, що капсули є найкращою формою для збереження властивостей пробіотичних мікроорганізмів при пероральному прийомі.

2.1.4. Опис лікарського засобу згідно АНД (проект АНД)

Основні показники та характеристики субстанції для виготовлення пробіотика на основі *L.rhamnosus*

Найменування показника	Характеристика і норма
1.Опис	Сипучий порошок, від білого до світло бежевого кольору. Запах специфічний, без стороннього, пліснявого чи гнилого
2. Справжність	Фарбування за Грамом позитивно
3.Масова частка вологи, %, не більше	10,0
4.Час відновлення препарату	Протягом 5 хв
5.Втрата в масі при висушуванні	Не більше 3,5%.
6. Специфічна нешкідливість	Не шкідливий
7. Мікробіологічна чистота	Не допускаються Бактерії родів <i>Pseudomonas aeruginosae</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , родини <i>Enterobacteriaceae</i>
8.Специфічна активність.	Кількість життєздатних дріжджів <i>L.rhamnosus</i> , КУО/г, не менше $1,0 \times 10^9$

1.Опис. Наводиться опис зовнішнього вигляду відповідної лікарської форми лікарського засобу.

2.Справжність. Справжність підтверджують такими методами – мікроскопічним (забарвленням мазків по Граму), бактеріологічними (опис виду колоній, які вирости на поживних середовищах, і підтверджується специфічною активністю).

Мікроскопічний метод. У мазках, повинні бути присутніми клітини довжиною від 0,7 до 3,0 мкм, розташовані короткими ланцюжками, характерні для *L.rhamnosus*, фарбування за Грамом позитивне.

Бактеріологічний. На поверхні селективних щільних середовищ, в анаеробних умовах повинні утворитися колонії характерні для *L.rhamnosus*

3. Визначення вмісту вологи в пробіотику

Визначення вмісту вологи в пробіотику проводять по ГОСТ Р 54951-2012. Масова частка вологи, у ліофілізованих порошках має становити не менше 10 %

4. Час відновлення препарату.

Протягом 5 хв. При додаванні 0,9% розчину натрію хлориду, з розрахунку 1 мл на одну дозу, повинна утворюватися гомогенна непрозора суспензія різних відтінків білого або світло- бежевого кольору. Визначення проводять візуально.

5. Втрата в масі при висушуванні. Не більше 3,5%. Визначення проводять відповідно до ОФС «Втрата в масі при висушуванні» (за методикою визначення втрати в масі при висушуванні в біологічних лікарських препаратах).

6. Специфічна нешкідливість. Повинен бути нешкідливий для мишей при пероральному застосуванні кожної тварини однієї дози відповідно до ОФС «Безпека пробіотиків в тестах in vivo» (розділ 1). Вказуються вимоги і критерії специфічної нешкідливості; вимоги до тварин, що використовуються для контролю (порода / лінія, підлогу), їх кількість, групова маса тварин перед введенням препарату і після закінчення терміну спостереження; дози, умови розведення та методи введення лікарського засобу; тривалість спостереження і враховуються показники. Лікарський засіб має бути нешкідливим

7. Мікробіологічна чистота. Визначення можливої контамінації випробуваного препарату проводять відповідно до ОФС «Мікробіологічна чистота» методом прямого посіву. Лактомісні пробіотики повинні відповідати нормативним вимогам, викладеним в ОФС «Мікробіологічна чистота».

Вказують використовувані поживні середовища, кількість і обсяг випробуваного матеріалу, умови інкубації і її тривалість, особливості обліку результатів

8. Специфічна активність. Специфічна активність визначається кількістю життєздатних бактерій в 1 дозі лікарського засобу та активністю

кислотоутворення (або антагоністичну активність) відповідно до ОФС «Визначення специфічної активності пробіотиків».

В 1 дозі (таблетці, капсулі і т.д.) препарату повинно міститися:

- лактобактерій виду *L.plantarum* - не менше 10^9 КУО.

Активність кислотообразовання штаму-продуцента, що входить в випробовуваний препарат, повинна бути не менше 220°T .

9. Пакування та маркування. Відповідно до ОФС «Упаковка, марки-ровка і транспортування лікарських засобів» і ОФС «Лікарські форми» і ОФС «Біологічні лікарські препарати».

10. Транспортування і зберігання. Відповідно до ОФС «Упаковка, маркування та транспортування лікарських засобів» та «Зберігання лікарських засобів» і ОФС «Біологічні лікарські препарати» при температурі від 2 до 8°C .

2.2. Розрахунок потреби у субстанції для випуску ЛЗ

За даними перепису населення на 2019 рік кількість людей, що страждають на хвороби сечовідвідних шляхів пов'язані з розвитком безсимптомної бактеріурії, ускладнень та реінфекції захворювань сечовідвідних шляхів наведено у таблиці 2.1

Таблиця 2.1

Потреба у біомасі лактобактерій

Захворювання	Кількість хворих в Україні, тис	Кількість капсул для 1 курсу лікування	Кількість капсул для усіх хворих	Кількість біомаси для усіх капсул, кг
Безсимптомна бактеріурія	1 65500	12	1 986 000	49,6
Ускладнені Інфекції сечовивідних шляхів	324 000	14	4 536 000	113,4
Реінфекція сечовивідних шляхів	616500	14	8 631 000	215,7
Всього				378,7

Примітка: середній курс лікування 6-8 діб, 1 капсула двічі на день. Кількість біомаси у одній капсулі (на прикладі Лактіале[®] Уро) – 25 мг

Для забезпечення випуску препаратів, що будуть містити біомасу молочнокислих бактерій потрібно отримати 378,7 кг субстанції (біомаси).

Враховуючи той факт, що на ринку України є один препарат вітчизняного виробництва на основі моноштамової культури та закордонні багато штамові аналоги, припустимо, що будемо забезпечувати половину (30%) від розрахованої потреби, тобто 114 кг.

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

На фармацевтичному ринку України звертає на себе увагу пробіотичний препарат Лактостар плюс, що містить *Lactobacillus rhamnosus* DSM 21690 ($2,0 \times 10^9$ КУО) та *Bifidobacterium lactis* DSM 17741 ($2,0 \times 10^9$ КУО) у формі капсул для перорального прийому. Виробник АТ ТОЛЛІ Мануфактурінг Сервісез, Мадрид, Іспанія [56].

Препарат Єкофемін на сонові *Lactobacillus acidophilus* (не менше 100 млн КУО/г), виробник PHARMA-VINCI, A/S (Данія). Препарат Гінолакт, що містить *Lactobacillus plantarum* P 17630 не менше 10^8 КУО. Виробник: Каталент Італі С.п.А. (Італія).

Отже, серед наявних на ринку України препаратів з аналогічним спектром дії, що містять в основі про біотичні штами є 5, 1 – вітчизняного виробництва, 4 – закордонні

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

Для забезпечення населення України про біотичним препаратом на основі біомаси молочнокислих бактерій, потрібно 114 кг біомаси.

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

Приймаємо кількість робочих трудоднів ($T_{рд} = 110$), тоді кількість біомаси на добу ($G_{нтд}$) становитиме:

$$G_{нтд} = G_{нт} / T_{рд} = 114 / 110 = 1,03 \text{ кг}$$

Кількість продукту за добу з урахуванням втрат за виробничий цикл:

$$G_{\text{пд}} = G_{\text{нтд}} / (1 - E_{\text{св}}) = 1,03 / (1 - 0,2) = 1,3$$

Кількість біомаси за цикл ($G_{\text{цк}}$) буде становити:

$$G_{\text{цк}} = G_{\text{пд}} \cdot T_{\text{цф}} / 24 = 1,3 \cdot 24 / 24 = 1,3 \text{ кг/цикл,}$$

де $T_{\text{цф}}$ – цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу (18 год) та час підготовки ферментера до роботи (6 год).

Підготовка ферментатора включає: миття та огляд (1 год), перевірка на герметичність (1 год), стерилізація (1 год), охолодження (1 год), завантаження середовища (1 год), засів (0,5 год), вивантаження культуральної рідини (0,5 год). Сумарний час складає 6 годин.

Кількість культуральної рідини на один цикл ферментації:

$$V_{\text{кр}} = G_{\text{цк}} \cdot C_{\text{Ртп}} \cdot K_1 / P_{\text{кр}} = 1,3 \cdot 0,95 \cdot 1,1 / 0,021 = 64,6 \text{ л,}$$

де $C_{\text{Ртп}}$ – вміст сухих речовин в готовому продукті, K_1 – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій ($K_1 = 1,1 \div 1,5$), $P_{\text{кр}}$ – концентрація цільового продукту.

Об'єм ферментера, враховуючи втрати культуральної рідини при культивуванні:

$$V_{\text{роб.1}} = V_{\text{кр}} / (1 - E_{\text{ф}}) = 64,6 / (1 - 0,2) = 80,8$$

Для визначення геометричного об'єму ферментера потрібно мати величину коефіцієнта заповнення ($K_{\text{зап}}$), приймаємо її за 0,8.

$$V_{\text{гф}} = V_{\text{роб.1}} / K_{\text{зап}} = 80,8 / 0,8 = 101 \text{ л}$$

Знаходимо найближчий за геометричним об'ємом ферментер $V_{\text{сф}} = 100 \text{ л}$.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зф}} = V_{\text{роб.1}} / V_{\text{сф}} = 80,8 / 100 = 0,8, \text{ що не перевищує заданого значення.}$$

Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

За виробничий цикл отримують $V_{\text{кр}} = 64,6 \text{ л}$ культуральної рідини.

При одержанні культуральної рідини потрібно врахувати її втрати при біосинтезі, які становлять від 10 до 20 %.

Таким чином кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом становитиме:

$$V_{\text{роб.1}} = V_{\text{кр}} / (1 - E_{\text{ф}}) = 64,6 / (1 - 0,2) = 80,7 \text{ л,}$$

де E_f – втрати культуральної рідини під час біосинтезу.

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері з робочим об'ємом $V_{роб.1} = 80,7$ л.

Приблизний геометричний об'єм ферментера при вибраному коефіцієнті заповнення ($K_{зап} = 0,8$) складе:

$$V_{гф} = V_{роб.1} / K_{зап} = 80,7 / 0,8 = 100 \text{ л.}$$

З таблиці стандартних ферментерів обираємо найближчий за об'ємом: $V_{сф} = 100$ л, та перевіряємо обраний коефіцієнт заповнення:

$$K_{зап1} = V_{роб.1} / V_{сф} = 80,7 / 100 = 0,8.$$

Доза посівного матеріалу для ферментера становить 10% від об'єму поживного середовища.

Тоді кількість поживного середовища в ферментері буде становити:

$$V_{пс1} = V_{роб.1} / (1 + X_f) = 80,7 / (1 + 0,1) = 73,4 \text{ л,}$$

де $X_f = 0,1$ – доза посівного матеріалу для ферментера.

Кількість посівного матеріалу становить:

$$V_{пм1} = V_{роб.1} - V_{пс1} = 80,7 - 73,4 = 7,3 \text{ л.}$$

Для одержання 7,3 л посівного матеріалу в посівному апараті враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять 10%.

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

$$V_{роб.2} = V_{пм1} / (1 - E_{ін}) = 7,3 / (1 - 0,1) = 8,1 \text{ л.}$$

Кількість поживного середовища в посівному апараті становитиме:

$$V_{пс2} = V_{роб.2} / (1 + X_{ін}) = 8,1 / (1 + 0,1) = 7,3 \text{ л,}$$

де $X_{ін} = 0,1$ – доза посівного матеріалу для інокулятора.

Кількість посівного матеріалу для посівного апарату становить:

$$V_{пм2} = V_{роб.2} - V_{пс2} = 8,1 - 7,3 = 0,8 \text{ л.}$$

Кількість інокуляту для засіву малого інокулятора можна одержати культивуванням бактерій у колбі. Для цього використовують колби об'ємом 1 л

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

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

Основою необхідної субстанції (біомаси) є бактерії роду *Lactobacillus*. Зокрема штами *L.rhamnosus* E/Н, *L. plantarum* (штам не наведено) та *L. plantarum* PEN [57-59].

Для вибору найкращого біологічного агента, що буде основою пробіотику, доцільно порівняти склад поживних, середовищ умови культивування та концентрацію біомаси у вище наведених штамів. Узагальнюючу характеристику біологічних агентів наведено в табл.2.1. Варто зазначити, що для всіх штамів використовують двостадійний спосіб біосинтезу. Перша стадія слугує для вирощування інокуляту, друга-для накопичення біомаси. Оскільки середовище для вирощування інокуляту для всіх вище наведених штамів є одноковим (середовище MRS) сенсу його порівнювати немає.

Найбільшу кількість біомаси (23 г/л) утворює штам *L.rhamnosus* E / Н на середовищі, яке є багатокомпонентним [57]. Значно менше біомаси синтезують штами *L. plantarum* (14.97 г/л) та *L. plantarum* PEN (5,5 г/л). Окрім концентрації біомаси, дані штами відрізняються і тривалістю культивування. Так, *L.rhamnosus* E/Н вирощують лише 18 год, у той час як для інших штамів тривалість культивування становить 24 год [58, 59].

Проте такого порівняння (див.табл.3.1) є недостатньо. Тому на наступному етапі вибору біологічного агента доцільно порівняти вартість поживних середовищ, що використовуються продуцентами (табл. 3.2), що синтезують найбільше біомаси, а саме *L.rhamnosus* E/Н та *L. plantarum* PEN. Дані наведені у табл.2.2, засвідчують, що середовище для культивування *L.rhamnosus* E /Н є дешевшим у порівнянні з таким для *L. plantarum* (штам не наведено)

					НУХТ БТЕК 02.02.11 КР ПЗ			
Зн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Пархоменко Т.Ю.			РОЗДІЛ 3. Обґрунтування вибору технологічної схеми біосинтезу субстанції та технологічної схеми виробництва ЛЗ	Літ.	Арк.	Акрушів
Керівник		Ворожцов О.О.				39	100	
Консультант						Кафедра БТМ		
Зав.каф.		Пирог Т.П.						

Таблиця 3.1.

Узагальнена характеристика штамів, що є основою для одержання біомаси лактобактерій

Біологічний агент	Склад поживного середовища, г/л	Концентрація біомаси, г/л	Особливості процесу культивування	Література
<i>L. rhamnosus</i> E / H	глюкоза -15,44 м'ясний екстракт- 8,0 C ₃ H ₃ NaO ₃ -3,92 K ₃ PO ₄ - 1,88 CH ₃ COONa- 4,7 (NH ₄) ₃ C ₆ H ₅ O ₇ -1,88	23	Тривалість культивування 18 год, T=37 ° C. Культивування проводили в ферментері об'ємом 3 л. рН 5.0. Тривалість культивування 18 год	Polak-Berecka M., Waśko A., Kordowska-Wiater M., Targoński Z. Application of response surface methodology to enhancement of biomass production by <i>Lactobacillus rhamnosus</i> E/N.J. <i>Brazil. Microbiol.</i> .2011,42(4): 1485–1494. doi: 10.1590/S1517-838220110004000035 .
<i>L. plantarum</i> (штам не наведено)	глюкоза -140 дріжджовий екстракт- 15 пептон – 25	14,97	Культивування проводили в ферментері об'ємом 5 л. рН 5,5. Тривалість культивування 24 год	Brinques, G. B., do Carmo Peralba, M., & Ayub, M. A. Z.. Optimization of probiotic and lactic acid production by <i>Lactobacillus plantarum</i> in submerged bioreactor systems. <i>J Ind Microbiol & Biotechnol</i> , 2015, 37(2), 205–212. doi:10.1007/s10295-009-0665-1
<i>Lactobacillus plantarum</i> PEN	глюкоза – 13,4, піруват натрію –3,4, м'ясний екстракт– 7,2, калій фосфат – 2,0 , ацетат натрію –5,0 цитрат амонію – 2,0	5,5	Культивування проводили в кобах. рН 5,5. Тривалість культивування 24 год	Polak-Berecka M., Waśko A., Kordowska-Wiater M., Podleśny M., Targoński Z., Kubik-Komar A. Optimization of Medium Composition for Enhancing Growth of <i>Lactobacillus Rhamnosus</i> PEN Using Response Surface Methodology <i>Pol J Microbiol.</i> 2015;59(2):113-8.

Вартість компонентів поживного середовища для культивування

L.plantarum AS-14 та *L.rhamnosus* E / H

Біологічний агент	Компонент поживного середовища,г/л	Ціна компонента, грн./кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Література*
<i>L. rhamnosus</i> E / H	глюкоза -15,44	60	0,92	1
	піруват натрію -3,92	1 239	4,85	1
	м'ясний екстракт- 8,0	5 220	43,08	1
	K ₃ PO ₄ - 1,88	10	0,01	1
	CH ₃ COONa - 4,7	41	0,19	2
	цитрат амонію -1,88	120	0,22	1
	Вартість 1 л середовища =47,95 грн			
<i>L. plantarum</i> (штам не наведено)	глюкоза -140	60	8,4	1
	дріжджовий екстракт- 15	1950	29,25	1
	пептон – 25	2470	61,75	1
	Вартість 1 л середовища =99,4 грн			

Примітка.*- Ціни наведено станом на травень2020р.

1 [.https://prom.ua/](https://prom.ua/),2 <http://lab-mir.com/>,

Для того, щоб остаточно обрати найкращий біологічний агент, що буде основою препарату розраховуємо умовну вартість 1 г цільового продукту-біомаси (табл. 3.3).

Таблиця 3.3

Умовна вартість 1 г цільового продукту (біомаси) при культивуванні

L.plantarum та *L.rhamnosus* E / H

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища, грн	Концентрація біомаси,г/л	Умовна вартість 1 г біомаси, грн./г	Тривалість культивування,год	Кількість утвореної біомаси за годину, г/год
<i>L.plantarum</i>	99,4	14,97	6,63	24	0,62
<i>L.rhamnosus</i> E / H	47,95	23	2,08	18	1,1

Узагальнивши всі дані, можна зробити висновок, що доцільніше використовувати для одержання біомаси *L. rhamnosus* Е/Н, адже він синтезує більше біомаси (23 г/л) ніж *L.rhamnosus* (14,97 г/л), даний штам росте на середовищі, що має меншу вартість, що в свою чергу впливає на вартість 1 г цільового продукту (див табл. 3.3).

3.2. Обґрунтування вибору способу культивування і типу ферментера

Спосіб культивування *L. rhamnosus* Е/Н обираємо виходячи з морфолого-культуральних та фізіолого-біохімічних ознак продуцента [21]:

- грампозитивні паличковидні бактерії;
- прямі або скривлені палички розмірами $1-5 \times 0,5-1,0$ мікрон;
- по відношенню до кисню – факультативні анаероби;
- оптимальне значення рН для росту – 5,0-5,5;
- мезофіли, оптимальна температура росту 28-30 °С

такі особливості вказують на те, що нам потрібно культивувати штам періодичним (при безперервному культивуванні клітини завжди знаходяться у експоненційній фазі, а накопичення біомаси (максимальний рівень) відбувається у стаціонарній, що забезпечує періодичний процес), глибинним (поверхневий має ряд недоліків і використовується зазвичай для отримання ферментів, що використовуватимуться у сільськогосподарських цілях) методом

Глибинний спосіб культивування має ряд переваг над поверхневим:

- скорочуються виробничі площі;
- забезпечує стерильність виробництва;
- поліпшується гігієна праці;
- виключення важкої ручної роботи, забезпечує можливість оперативного контролю та можливість втручання у процес, у разі потреби;

Крім вище зазначеного, при глибинному культивуванні більш раціонально використовується поживне середовище, що дає змогу значно скоротити відходи виробництва, типу нерозчинних осадів твердого середовища.

Отже, культивування молочнокислих бактерій здійснюють в асептичних умовах глибинним способом у періодичному режимі протягом 18 годин. Температура культивування становить 28-30°C, рН=5,0-5,5

Для культивування *L. rhamnosus* Е/Н потрібно обрати ферментер з механічним перемішуванням барботажного типу. Так як штам є факультативним анаеробом, потрібна подача стерильного повітря, і перемішування для його кращого розчинення.

Оскільки біологічний агент бактерія – немає небезпеки пошкодження клітин внаслідок зрізових зусиль, отже обмежень у виборі перемішувача пристрою немає. Обираємо лопатеву мішалку, яка забезпечує інтенсивний масообмін навіть при невеликих обертах. Стерилізацією обладнання та комунікацій, поживного середовища, аераційного повітря – забезпечуються асептичні умови під час біосинтезу.

Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища

Склад поживного середовища для вирощування інокуляту (г/л): пептон-10, дріжджовий екстракт-5, екстракт яловичини -10, глюкоза-20, CH_3COONa -5, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ -2, $(\text{NH}_4)_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ - 2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0,1; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ -0,05

Склад поживного середовища для біосинтезу (г/л): *L. rhamnosus* Е/Н вирощують в рідкому поживному середовищі такого складу (г/л): глюкоза - 15,44, м'ясний екстракт- 8,0; $\text{C}_3\text{H}_3\text{NaO}_3$ -3,92; CH_3COONa - 4,7; K_3PO_4 - 1,88; $\text{C}_6\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_7$ – 1,88.

Підготовка та стерилізація компонентів поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах

На цьому етапі необхідно отримати 760 мл інокуляту. Проаналізувавши склад поживного середовища для вирощування інокуляту, його умовно ділимо на такі композиції (залежно від режиму стерилізації) :

Композиція А: пептон, екстракт яловичини, глюкоза, дріжджовий екстракт (режим стерилізації: 112°C, 30 хв).

Композиція Б: CH_3COONa , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
(режим стерилізації 131°C, 40 хв).

Композиція В: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (режим стерилізації 131°C, 40 хв).

Основні солі (композиція Б) стерилізуємо окремо від фосфорних (композиція В), щоб запобігти випадінню в осад фосфорних солей при нагріванні.

Оскільки об'єм середовища невеликий, стерилізація відбувається в автоклаві.

Підготовка та стерилізація компонентів поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 10 л.

Для наступного етапу культивування бактерій у ферментері необхідно приготувати 7,6 л поживного середовища.

Для приготування 7,6 л середовища склад композицій буде такий:

Композиція А: пептон, екстракт яловичини, глюкоза, дріжджовий екстракт, (режим стерилізації: 112°C, 30 хв).

Композиція Б: CH_3COONa , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (режим стерилізації 131°C, 40 хв).

Оскільки для даної стадії біосинтезу потрібно 7,6 л поживного середовища, тому основні і фосфорні солі об'єднують в одну композицію Б, готують у збірнику з сорочкою і мішалкою, а стерилізують в інокуляторі об'ємом 10 л при рН 4,5-5,0, щоб уникнути випадання осаду. Для цього середовище підкислюють 6%-м розчином соляної кислоти. Для підкислення 6,3 л середовища необхідно внести 14 мл 6% розчину соляної кислоти.

Для підлучення 6,3 л середовища необхідно внести 14 мл 6%-го стерильного розчину гідроксид натрію, який готують в колбі об'ємом 50 мл і стерилізують в автоклаві.

Відповідно композицію А (пептон, екстракт яловичини, глюкозу, дріжджовий екстракт) готують та стерилізують збірнику об'ємом 5 л.

Приготування та стерилізація середовища для виробничого біосинтезу

На даному етапі необхідно приготувати 76,3 л поживного середовища. Приготування та стерилізація глюкози та м'ясного автолізу (Композиція А) буде відбуватися безпосередньо у збірнику для його приготування, а стерилізація мінеральних компонентів (солей) – Композиція Б – у ферментері. Тому потрібно передбачити наявність збірника для попереднього розчинення середовища.

У даному поживному середовищі відсутні магнійні та кальцієві солі, тому не утворюється осад фосфатів магнію та кальцію, і необхідності забезпечити кисле (4,0-4,5) рН середовища немає.

Додаткове обладнання:

- Збірник для приготування середовища на стадії виробничого біосинтезу;
- Збірник для приготування середовища на стадії вирощування посівного матеріалу в інокуляторі

3.3. Обґрунтування стадій виділення і очищення субстанції для виробництва ЛЗ

Кінцевим продуктом процесу культивування є біомаса *Lactobacillus rhamnosus* E/H, яку використовують як субстанцію для виготовлення лікарських препаратів для лікування сечовідвідних шляхів.

Аналіз літературних джерел показав, що технологічний процес отримання сухих бактеріальних концентратів включає стадії концентрування біомаси, додавання захисного середовища та сам процес висушування [60]. Для розробки технології отримання сухого концентрату потрібно врахувати особливості продуцента та об'єми виробництва (кінцевий об'єм культуральної рідини, що зливається за один цикл), щоб підібрати найкращий метод та відповідне обладнання.

Так, *L. rhamnosus* E/H – грампозитивні паличковидні бактерії розмірами 1,5-2,0 мкм, спор не утворюють. Згідно розрахунку потужності виробництва за 1 цикл виробництва одержують 80,7 л поживного середовища, кількість біомаси при цьому становить 1856 г (штам *L. rhamnosus* E/H синтезує 23 г/л біомаси) [61].

Обґрунтування способу концентрування біомаси

Для концентрування біомаси на сьогоднішній день застосовуються такі методи:

- 1) Центрифугування;
- 2) Фільтрація;
- 3) Сепарація.

Фільтрація. Процес передбачає відділення твердої фази від рідкої шляхом проходження через фільтруючий матеріал або через полімерну сітку з відповідним діаметром отворів і характеризується рядом **недоліків, а ніж переваг**. Перш за все це втрати біомаси (за рахунок проходження частини клітин через пори фільтруючого матеріалу), необхідність частої заміни фільтрів (забивання пор фільтру), дорогі фільтраційні установки та

необхідність виготовлення фільтруючого матеріалу на замовлення (з необхідним діаметром пор)

Сепарування – процес відділення твердої фази від рідкої, оснований на відділенні часточок з різними характеристиками. Рушійною силою процесу являється відцентрова сила [62, 63].

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

Процес **центрифугування** на відміну від двох попередніх найчастіше використовується для концентрування біомаси. Переваги такого процесу полягають у високому виході біомаси (вище 80 %), відсутності потреби у зміні і підготовці фільтрів та газів. Єдиним недоліком є енергоємність такого процесу, однак через малу тоннажність нашого виробництва цей недолік є значним. Тому обираємо даний метод як найбільш доцільний [63].

Щоб обрати найкращий і економічно вигідний метод потрібно порівняти переваги і недоліки кожного з них (табл. 3.4)

Таблиця 3.4

Порівняльна характеристика основних методів попередньої обробки культуральної рідини [62, 63]

Процес	Переваги	Недоліки
Фільтрування	повне відділення завислих часточок; простота проведення процесу; продуктивність	значні витрати фільтрувальної тканини; налипання клітин продуцента
Центрифугування	продуктивність та ефективність розділення (можна відділяти частинки розміром до 0,01 мкм)	складність конструкції, висока вартість та енергоємність, складність експлуатації, нагрівання мікроорганізмів, складність герметизації та асептики
Сепарування	висока продуктивність; високий рівень концентрування	складність конструкції; енергоємність

Отже, з огляду на переваги та недоліки кожного з методів, найкращим для осадження біомаси є процес центрифугування.

На наступному етапі потрібно обрати тип центрифуги.

За принципом дії розрізняють:

- осаджувальні центрифуги;
- фільтрувальні центрифуги;
- відстійні.

Кожна з них характеризується ефективністю розділення фаз, речовини яких є певних розмірів тому вибір будемо робити на основі цього. Так, фільтрувальні центрифуги використовують для розділення суспензій тверда фаза яких кристалічна або має зернисту структуру, з розміром зерен 30–150 мкм, а відстійні – для розділення суспензій, тверда фаза яких має розмір 5–40 мкм.

Оскільки розмір клітини *L. rhamnosus* Е/Н складає близько 1,5-2,0 мкм, доцільно використовувати осаджувальну центрифугу (рис 1.1).

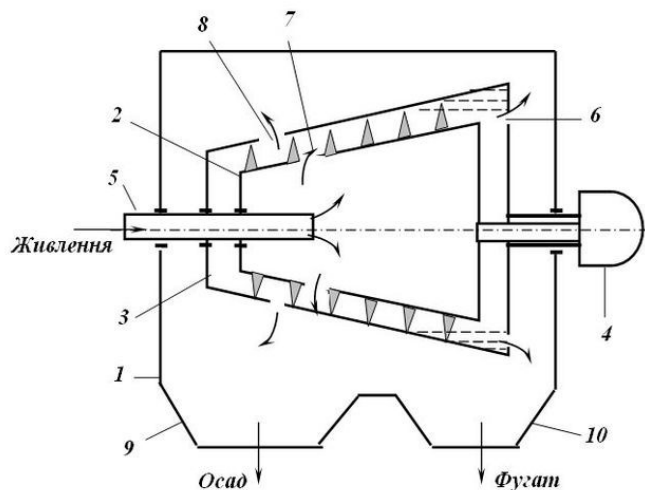


Рис. – Осаджувальна центрифуга:
1 – корпус; 2 – шнек; 3 – ротор; 4 – планетарно-диференціальний механізм; 5 – живильна труба; 6 – зливні вікна; 7 – радіальні отвори; 8 – розвантажувальні отвори; 9 – камера осаду; 10 – камера фугату.

Рис.3.1. Осаджувальна центрифуга

Так як кількість культуральної рідини, що йтиме на процес центрифугування становить 63 л, доцільно буде виготовити центрифугу на замовлення. Адже представлені на ринку центрифуги є багатонажними.

Виготовлення центрифуги може бути здійснено ПАТ «Сумська НПО» [<http://snpo.ua/uk/produktsiya/tsentrifugi/>]. Основний парламент роботи центрифуги це її продуктивність. Так, як об'єм культуральної рідини що зливається за одну ферментацію лише 63 л, продуктивність центрифуги має становити 20-25 л/год.

Обґрунтування способу висушування біомаси

Сушіння – процес видалення рідини (як правило, води) шляхом випаровування з твердих або пастоподібних матеріалів, а також із суспензій, емульсій та розчинів. Даний процес широко використовують у різних виробництвах: фармацевтичному, хімічному, сільськогосподарському, харчовому, та ін. У фармацевтичній промисловості, як правило, є заключною стадією виробництва і застосовується для отримання готової лікарської речовини відповідної якості [64, 65].

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

При *контактній сушці* матеріал нагрівається в результаті безпосереднього зіткнення з гарячими поверхнями (плитами, вальцями). На цьому принципі засновані шафові і вальцьові сушарки. Проте вони малопридатні для сушки термолабільних препаратів і мають ряд недоліків.

В процесі *конвективної сушки* теплота підводиться до висушуваного матеріалу за допомогою газоподібного сушильного агента-теплоносія, який служить і для відведення вологи, що випаровується. Цей метод найширше застосовується в біотехнології і лежить в основі роботи розпилюючих, пневматичних, аерофонтанних сушарок і сушарок з киплячим шаром.

При *радіаційній сушці* теплота передається від нагрітого джерела до висушуваного матеріалу за допомогою інфрачервоного випромінювання. Цей метод застосовується при сушці сублімації деяких мікробних препаратів [64].

Сушарки, що застосовуються в мікробіологічній промисловості, можна характеризувати за способом подачі продукту і теплоносія в сушильні камери, а також по гідродинамічним умовами їх роботи. Найбільше застосування знайшли сушарки: вальцьові, стрічкові, барабанні, розпилювальні, пневматичні, сублімаційні [65].

Вальцьові сушарки часто використовуються для сушки кормових дріжджів з вмістом сухих речовин до 20-25%. Процес сушіння проводиться при суворому контролі температурного режиму, щоб уникнути денатурації білків. На вальцьових сушарках межа температури теплоносія становить 70-80 °С. У барабан, який закритий з торців кришками, подається пар. У торців барабанів зверху встановлюються клини, що утворюють між барабанами ванну, в яку безперервно надходить концентрат біомаси. При обертанні барабана клітинна біомаса змочує їх поверхню тонким шаром, який висушується до вологості 8-10%. Суха біомаса знімається з поверхні барабана ножами і обсипається в поздовжні шнеки, звідки подається на фасовку [60].

Основним недоліком вальцьових сушарок є те, що їх використовують здебільшого для багатотоннажних виробництв.

Стрічкова сушарка (рис. 32) – пастоподібна біомаса попередньо змішується з наповнювачем, а потім формується у вигляді брикетів, які подаються на транспортер стрічкової сушарки. Після сушіння матеріал розмелюють на молоткової дробарці. Застосування стрічкових сушарок доцільно і тому випадку, коли вологий матеріал заздалегідь відформований і сушіння можливе лише в такому вигляді [60, 63].

Основним недоліком сушарок стрічкового типу є відносна громіздкість і невисока продуктивність, віднесена до одиниці об'єму апарату [60].

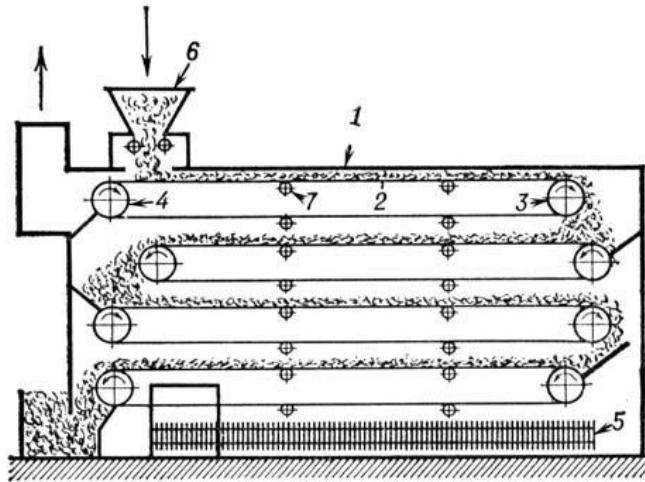


Рис 3.2 Стрічкова сушарка

Найбільш простою сушаркою, заснованою на конвективному теплопереносі, є **пневматична сушарка** (рис. 3.3). Повітря, підігріте в калорифері разом з тим, що подається через живильник матеріалом, поступає в сушильну трубу. Сухі частки препарату відділяються від повітря в циклоні, а відпрацьоване повітря поступає на додаткове очищення у фільтрі. Пневматичні сушарки застосовуються у виробництві деяких антибіотиків [66].

Основні недоліки пневматичних сушарок – це підвищені витрати сушильного агента і теплоти, ерозійний знос внутрішніх поверхонь при сушінні твердих матеріалів і велике навантаження на циклон (циклони) з огляду на необхідність вивантаження матеріала, що висушується через циклон (циклони) [60].

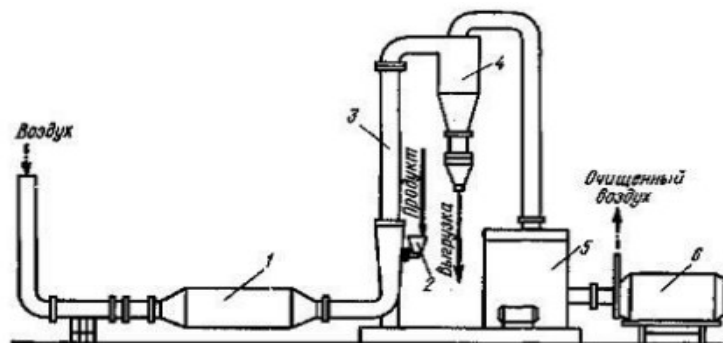


Рис 3.3.Схема пневматичної сушарки: 1 - калорифер; 2 - живильник; 3 -сушильна труба; 4 - циклон-віддільник; 5 - фільтр; 6 - вентилятор

Барабанні сушарки (рис. 3.4), що застосовуються для безперервного сушіння сипучих матеріалів, представляють собою обертовий циліндричний барабан, що встановлюється з невеликим ($2-7^\circ$) нахилом до горизонту. Барабан повільно обертається, що сприяє подовжньому переміщенню і поперечному перемішуванню сипучих матеріалів, що заповнює внутрішній обсяг барабана зазвичай на 10-30%. Лопаті на внутрішній поверхні барабана і елементи насадки в усьому його обсязі збільшують час падіння частинок матеріалу і покращують умови обтікання кожної частинки потоком сушильного агента.

Барабанні сушарки надійні в роботі, забезпечують глибоке висушування сипучих матеріалів при їх прямоточному або протиточному русі з топковим газом (або з гарячим повітрям). Слід зазначити, що вони є досить великими за розмірами [60, 63].

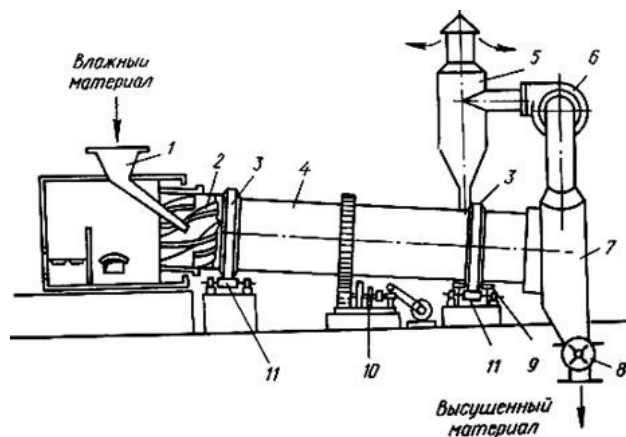


Рис 1.4 Барабана сушарка

Вакуум-сушильна шафа (рис. 3.5) працює в періодичному режимі і являє собою шафу циліндричної або прямокутної форми та закривається герметично. Як і сублімаційні сушарки, вони призначені для сушіння нетерmostійких матеріалів, але процес відбувається за кімнатної або підвищеної температури.

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

Сушіння відбувається періодично, тобто у шафу на полиці закладають вологий матеріал, створюють вакуум, починають обігрівання шафи парою через порожнини в плитах або електричним струмом. Процес закінчують, коли матеріал матиме певну залишкову вологість. Ці апарати призначені для сушіння порівняно невеликих кількостей вологого матеріалу.



Рис 3.5. Вакуум сушильна шафа

Перевагами даного обладнання є сушіння матеріалів при невисоких температурах, як наслідок менша витрата тепла.

Недоліками є:

- 1) низька продуктивність;
- 2) необхідність застосування ручної праці;
- 3) витрата часу на завантаження й вивантаження матеріалу, наслідок – привалість процесу [60, 63].

Сушіння сублімацією – один з найефективніших способів зневоднення живої біомаси дріжджів, бактерійних препаратів та інших термолабільних біологічних об'єктів.

При 0°C колоїдна система матеріалів, у тому числі їх волога, замерзає і надалі відбувається процес сублімації, тобто випаровування твердого тіла без його розплавлення; у даному разі з твердого агрегатного стану вода переходить у пароподібний, проминувши рідку фазу. За такого способу сушіння молекулярна структура матеріалу зберігається майже без змін і

висушений матеріал характеризується доброю дисперсністю і пористістю, тим часом як за звичайного сушіння відбувається значне зменшення об'єму матеріалу [60].

Процес заморожування-висушування можна розділити на наступні стадії:

1. Заморожування.
2. Первинне висушування або стадія сублімації.
3. Вторинне висушування або досушування і упаковка.

Принцип дії сублімаційної сушарки: попередньо заморожений матеріал кладуть на полиці субліматора, що обігривається паром або гарячою водою. Пара, яка виділяється під час випаровування, потрапляє в конденсатор, де конденсується на його стінках і перетворюється на лід, який скребками видаляється з апарата. Вакуум-насосна установка створює в сушильній камері залишковий тиск 0,1—1,0 мм рт. ст. Цей тиск забезпечує сушіння при температурі 15° С [60].

Переваги сублімаційного сушіння:

- волога видаляється при низьких температурах, що практично виключає термоінактивації продукту;
- практично виключається видалення летючих компонентів, що висушується, порушення його хімічного складу;
- полегшується можливість отримання сухого продукту в фасованому стерильному вигляді (ампули, флакони).

Вибір сублімаційної сушарки

Основним критерієм у виборі сублімаційної сушки є її продуктивність. Так, як після процесу центрифугування, передбачувана кількість біомаси складе приблизно 1800 г, максимальна місткість камери сушарки може складати до 3-х кілограм. Сублімаційні сушарки такої продуктивності виготовляє компанія MILLAB. Серед представленого обладнання саме сублімаційна сушка Epsilon 2-4 LSCplus задовольняє наші вимоги по технічних характеристиках

[http://www.millab.ru/equipments/3506_liofilnaja_sushilka_epsilon_2-4_lscplus/]:

Максимальна місткість	4 кг
Максимальна продуктивність	3 кг/добу
Розміри полицок	270×400 мм
Кількість полицок	1 шт
Температурний діапазон	від -50 до +60°C
Розміри сушильної шафи	780×975×550 мм

Обґрунтування вибору захисного середовища

З метою зниження до мінімуму пошкоджень клітин мікроорганізмів за сублімаційного сушіння застосовують кріопротектори, які входять до складу захисних середовищ (ЗС), і здатні зменшити негативний вплив температурного і осмотичного шоку та забезпечити певний рівень життєздатних клітин у сухому препараті [67, 68]. Механізм захисної дії кріопротекторів заснований, головним чином, на їх здатності створювати міцніші зв'язки з молекулами води, ніж зв'язок молекул води між собою, що перешкоджає формуванню правильної кристалічної решітки льоду і затримує початок росту кристалів.

За компонентами, що залучаються до захисних середовищ, останні поділяють на три групи: колоїдні середовища тваринного, рослинного чи мінерального походження; середовища з розчинними сполуками, такими як вуглеводи, продукти гідролізу білків (пептони, дріжджовий екстракт, амінокислоти); а також середовища, в яких поєднані колоїди з розчинними сполуками. Найчастіше використовують комбіновані захисні середовища, до складу яких залучають цукрозу, лактозу, декстрин, манозу, фруктозу, крохмаль, желатин, гліцерин, сусло, буферні солі, знежирене та гідролізоване молоко, суху сироватку, цитрат, глутамат натрію, казеїнат натрію, лізин, апілак, бульйон, пептон, колаген, екстракт солоду, поліетиленгліколь, полівінілпірролідон тощо [67, 68].

При розробленні захисних середовищ для виробництва бактеріальних препаратів, які використовуються в харчовій промисловості, до складу повинні залучатися кріопротектори, які мають статус харчових. Слід зауважити, що жодне відоме захисне середовище не є універсальним, тому для кожного виду бактеріального препарату його підбирають емпіричним шляхом [69].

У літературних джерелах наявна досить велика кількість публікацій, щодо використання різних типів захисних середовищ [70, 71]. Для вибору найкращого потрібно врахувати відсоток збереження життєдіяльності клітин після висушування біомаси з тим чи іншим захисним середовищем.

Серед зазначених у таблиці 3.6 середовищ саме середовище під № 4 характеризується найбільшою життєздатністю клітин молочнокислих бактерій і на відміну від інших його потрібно у два рази менша кількість. Це буде впливати перш за все на собівартість кінцевого продукту.

Тому серед наведених середовищ обираємо середовище під номером 4. Після сушіння біомаси, утворення суцільного коржа не відбуватиметься, однак стадію подрібнення не можна виключати так як суха біомаса використовуватиметься як субстанція і має мати певні розміри. Так, як кількість сухої біомаси є невеликою (до 2-х кг враховуючи втрати при висушуванні) використання лабораторного млина чи дисмембратора є не доцільним (через високі втрати), тому подрібнення буде відбуватися вручну.

Захисні середовища для ліофільного висушування бактерій

№	Склад г/л	Співвідношення біомаси і захисного середовища	Збереженість життєздатних клітин	Література
1	Сахароза – 150 Желатин – 50 Сухе знежирене молоко – 30	1:2	96,7 %	[11]
2	Сахароза – 150 Сухе знежирене молоко – 50 Цитрат натрію – 50	1:2	94,7 %	[11]
3	Сухе знежирене молоко – 140 Сахароза – 100 Желатин -1	1:2	94 %	[12]
4	Сахароза – 100 желатоза – 10 аеросил –30	1:1	97 %	[12]

Після процесу висушування отриману субстанцію слід подрібнити. Так як кількість її становитиме приблизно до 2-х кілограм, подрібнення буде здійснюватися на молотковій дробарці-подрібнювачі YF8-1 призначеній для подрібнення фармацевтичних порошків (рис 3.6).

З бункера сировина потрапляє в камеру подрібнення, обертаючись зі швидкістю 2800 об / хв молотки розбивають сировину об стінки, подрібнену сировину проходить через сітку обраної фракції. Збір подрібненої сировини відбувається в фільтр-рукав.

Особлива форма частин камери подрібнення створює тягу, таким чином створюється повітряне охолодження проходить потоком повітря. Завдяки системі захисту, при відкритій кришці камери подрібнення неможливо запустити двигун.



Рис 3.6. Молоткова дробарка- YF8-1

Вибір обладнання для фасування, пакування та маркування

Двохпотокова машина по фасуванню і спайці капсул НЕСПРЕССО (рис 3.7). Лінія складається з блоків наповнення, запаювання, системи автоматичного відбракування, роботів-маніпуляторів для подачі капсул, вузла упаковки в туби і картонні коробки.

АВТОМАТИЧЕСКАЯ ЛИНИЯ ПО УПАКОВКЕ КАПСУЛ НЕСПРЕССО (4500 шт в час)



Рис 3.7. Двохпотокова машина по фасуванню і спайці капсул НЕСПРЕССО

3.4. Обґрунтування вибору класів чистоти виробничих приміщень виробництва ЛЗ (підготовки персоналу, дезинфікуючих засобів, вентиляційного повітря)

Обґрунтування вибору класів чистоти виробничих приміщень

Для того, щоб продукція була безпечною для людей, які будуть приймати препарат, українські підприємства працюють згідно правил GMP.

Належна виробнича практика (Good Manufacturing Practice, GMP) — сукупність правил щодо організації виробництва і контролю якості, які є елементом системи забезпечення якості.

За правилами GMP існує 4 класи чистоти:

1. Клас А — локальна зона для операцій, при яких контамінація може становити високий ризик для якості продукції (зона дозування, закупорювання ємностей, відкривання ампул і флаконів, змішування в асептичних умовах).

2. Клас В — навколишнє середовище для зони класу А у разі виготовлення і дозування в асептичних умовах.

3. Клас С і D — чисті зони для здійснення менш критичних стадій, виробництва нестерильних лікарських засобів.

Згідно класифікації лікарських засобів ліофілаз (біомаса) буде виготовлятися у класах чистоти C/D.

Обґрунтування необхідності підготовки персоналу

Захист ліків від забруднень, джерелом яких служить людина, є однією з основних проблем технологічної гігієни; і вирішується вона, як правило, завдяки особистій гігієні співробітників і використанню технологічного одягу.

Персонал, що входить у виробниче приміщення, повинен бути одягненим у спеціальний одяг, який відповідає виконуваній виробничій операції. Технологічний одяг персоналу має відповідати класу чистоти тієї зони, в якій він працює, тобто максимально захищати продукт виробництва від частинок, що виділяються людиною.

Так, як виробництво буде здійснюватися у класах чистоти C/D персонал обов'язково має мати захисний халат, шапочку, рукавички, захисну маску на обличчі.

Обґрунтування вибору дезінфікуючих засобів

Дезінфекція приміщень і поверхонь обладнання призводить, як правило, до зниження мікроорганізмів на 40 – 60% від їх початкового вмісту. При виборі дезінфікувальної речовини необхідно враховувати не тільки її бактерицидні та фунгіцидні властивості і спектр дії, але й можливу токсичність для людини. Треба враховувати також те, що тривале використання дезінфікувального засобу призводить до утворення стійких форм мікроорганізмів. Тому рекомендують дезінфікувальний засіб змінювати кожні 10 – 14 днів або застосовувати декілька типів. Для дезінфекції рук обладнання у класах чистоти C/D будемо використовувати робочий розчин «Вімол», для дезінфекції поверхонь робочий розчин Хлорантоїну, а для рук – Стериліум.

Обґрунтування вибору підготовки повітря для класів чистоти

Виробництво ліофілізатів здійснюється в приміщеннях де контролюється норми наявності у повітрі мікроорганізмів та часточок, відповідно Методичних рекомендацій, затверджений наказом МОЗ України від 14.12.01. № 502.

Очищення повітря, що подається до виробничих приміщень класу чистоти C/D, проводять по трьох ступеневій системі: груба, тонка очистка та очистка на фільтрі HEPA.

На першому ступені використовуються чарункові фільтри типу ФільтрФяК 3362 – фільтр групи G. На другому – Фільтр ФяС-F-MПе або Фільтр ФяС-12 С, на третьому ступені фільтр групи H–фільтр HEPA.

Зовнішнє повітря, що надходить до приточних установок, попередньо очищується, а потім за допомогою вентиляторів поступає до виробничого приміщення.

Попереднє очищення приточного повітря від пилу відбувається у чарункових фільтрах марки ФяК 3362 за допомогою скловолокна марки ФСВУ.

В якості тонкого очищення використовують фільтр з фільтрувальним матеріалом марки ФПП-15-15. В процесі експлуатації фільтри тонкого очищення повітря не піддаються регенерації, а згодом їх міняють на нові. Міняють фільтри по мірі його забруднення відносно до показників диференційного манометру, що вимірює різницю тисків повітря, який надходить на фільтр і виходить після фільтрації.

Внутрішні, зовнішні поверхні фільтра камер і повітроводів мають покриття, що дозволяє їх обробляти дезінфікуючим розчином, що складається з 3% -ного розчину перекису водню і 0,5% -ного рідкого миючого засобу.

Вентиляційні установки працюють безперервно протягом всього часу, коли працює персонал.

Контроль мікробної контамінації повітря у виробничих приміщеннях проводить мікробіолог за допомогою приладу Кротова, не менше одного разу в тиждень, під час виробничого процесу, та 1 раз на 2 тижні за 1,0 – 1,5 години до початку робочого дня. Максимально допустима кількість життєздатних мікроорганізмів повинно складати 200 КУО/м³. Контроль механічних часточок в повітрі робочої зони під час виробничого процесу не передбачений. Наявність у повітрі спорових мікроорганізмів не допускається.

РОЗДІЛ 4. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ

4.1. Матеріальний баланс ділянки біосинтезу

Згідно з ТЕО (див. розділ 1) кількість біомаси становить 114 кг/рік. Таку кількість препарату необхідно виготовити за $T_{рд} = 110$ днів. Згідно з даними [59], максимальна концентрація біомаси (23 г/л) досягається при культивуванні *L. rhamnosus* Е/Н на середовищі наступного складу (г/л):

- C_1 – глюкоза - 15,44;
- C_2 – м'ясний екстракт-8,0;
- C_3 – $C_3H_3NaO_3$ -3,92;
- C_4 – K_3PO_4 - 1,88;
- C_5 – $C_6H_{17}N_3O_7$ – 1,88
- C_6 – CH_3COONa - 4,7
- Всього $C_{\Sigmaп}$ = 35,82 г/л.

Посівний матеріал вирощують на поживному середовищі наступного складу (г/л):

- C_1 – глюкоза - 20;
- C_2 – екстракт яловичини-10;
- C_3 – пептон- 10;
- C_4 – дріжджовий екстракт – 10;
- C_5 – $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ -24
- C_6 – CH_3COONa -5;
- C_7 – $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ -0,1;
- C_8 – $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ -0,05

Всього $C_{\Sigmaп}$ = 79,15г/л.

Для подальших розрахунків приймаємо наступні показники: час роботи ферментера $T_{цф} = 24$ год (мийка та огляд – 1,5 год, перевірка на герметичність – 0,5 год, підігрів та стерилізація апарату – 1,5 год, охолодження ферментера – 0,5 год, завантаження поживного середовища – 1,5 год, засів культурою – 0,5 год та ферментація –18 год),

- $K_1=1,1$ – коефіцієнт запасу часу, що враховує можливість нестерильних операцій

					НУХТ БТЕК 02.02.11 КР ПЗ			
Зн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Пархоменко Т.Ю.			РОЗДІЛ 4. Опис технологічного процесу виробничого біосинтезу	Літ.	Арк.	Аркуші
Керівник		Воронцов О.О.					62	100
Консультант						Кафедра БТМ		
Зав.каф.		Пирог Т.П.						

-Сумарні втрати продукту при виробництві $E_{св}=0,2$.

Розрахунок кількості виробничих циклів

1.1. Кількість продукту на добу:

$$G_{нтд} = G_{нт}/T_{рд} = 114/110 = 1,03 \text{ кг/добу.}$$

1.2. Кількість продукту на добу з урахуванням втрат за виробничий цикл ($E_{св}$):

$$G_{пд} = G_{нтд}/(1 - E_{св}) = 1,03 / (1-0,2) = 1,3 \text{ кг/добу.}$$

1.3. Кількість продукту за цикл:

$$G_{цк} = G_{пд} T_{цф}/24 = 1,3 \times 24/24 = 1,3 \text{ кг/цикл.}$$

1.4. Об'єм КР, що зливається за одну ферментацію (цикл):

$$V_{кр} = G_{цк} \cdot CP_{тп} \cdot K_1/P_{кр} = 1,3 \cdot 0,95 \cdot 1,1/0,021 = 64,6 \text{ л}$$

1.5. Кількість ферментацій (циклів) на рік:

$$N_{цк} = G_{нт}/G_{цк} = 114/1,1 = 103 \text{ циклів.}$$

Приготування та стерилізація поживних середовищ для виробничого біосинтезу та вирощування посівного матеріалу

Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу

Об'єм готового поживного середовища (ПС) та посівного матеріалу (ПМ) у виробничому ферментері з врахуванням втрат при біосинтезі ($E_{ф}=0,1$), складе:

$$V_{ф} = V_{кр}/(1-E_{ф}) = 64,6/(1-0,2) = 86,1 \text{ л.}$$

Об'єм готового поживного середовища для виробничого ферментера:

$$V_{псф} = V_{ф}/(1+X_{ф}) = 86,1/(1+0,13) = 76,5 \text{ л.}$$

Кількість посівного матеріалу на засів виробничого ферментера:

$$V_{пмф} = V_{ф} - V_{псф} = 86,1 - 76,5 = 9,6 \text{ л.}$$

При вибраному коефіцієнті заповнення ферментера $K_{зф} = 0,8$ його приблизний геометричний об'єм складе:

$$V_{гф} = V_{ф}/K_{зф} = 86,1/0,8 = 107,6 \text{ л.}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{гф} = 100 \text{ л.}$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення: $86,1/100 = 0,861$.

Визначаємо кількість стадій вирощування посівного матеріалу

Оскільки кількість ПМ становить $X_{\phi} = X_{\text{па}} = X_i = X_{\text{колб}} = 10\%$ від кількості ПС визначаємо кількість ПМ для інших стадій. Приблизна кількість ПМ для інших стадій становитиме:

ПМ для ферментера з інокулятора:

$$V_{\text{пмф}} = 7,6 \text{ л}$$

ПМ для інокулятора з качалочних колб:

$$V_{\text{пмі}} = V_{\text{пмф}} \times X_{\text{ін}} = 6 \times 0,1 = 760 \text{ мл}$$

Отже, отримання ПМ буде проходити в 1 стадію

Розрахунок кількості компонентів поживного середовища для виробничого ферментера

Відповідно з прийнятим складом поживного середовища для виробничого біосинтезу, загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища ($V_{\text{псф}}$) складуть:

$$G_{\phi} = V_{\text{псф}} C_{\Sigma\phi} = 75,6 \times 35,82 = 2667,1 \text{ г, в тому числі:}$$

$$\text{глюкоза} - G_1 = G_{\phi} \times C_1 / C_{\Sigma\phi} = 2667,1 \times 15,44 / 35,82 = 1149,6;$$

$$\text{мясний екстракт} - G_2 = G_{\phi} \times C_2 / C_{\Sigma\phi} = 2667,1 \times 8 / 35,82 = 595,6;$$

$$\text{C}_3\text{H}_3\text{NaO}_3 - G_3 = G_{\phi} \times C_3 / C_{\Sigma\phi} = 2667,1 \times 3,92 / 35,82 = 291,8;$$

$$\text{K}_3\text{PO}_4 - G_4 = G_{\phi} \times C_4 / C_{\Sigma\phi} = 2667,1 \times 1,88 / 35,82 = 139,9;$$

$$\text{C}_6\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_7 - G_5 = G_{\phi} \times C_5 / C_{\Sigma\phi} = 2667,1 \times 1,88 / 35,82 = 139,9$$

$$\text{CH}_3\text{COONa} - G_6 = G_{\phi} \times C_5 / C_{\Sigma\phi} = 2667,1 \times 4,7 / 35,82 = 349,9$$

Розрахунок кількості води для приготування поживного середовища для виробничого ферментера

Розраховуємо об'єм конденсату при стерилізації поживного середовища в окремих реакторах гострою парою, $K_{\text{кон}} = 0,1$. Загальна кількість конденсату, що утворюється при стерилізації ПС у ферментері, становитиме:

$$V_{\text{кф}} = V_{\text{псф}} \cdot K_{\text{кон}} = 73,3 \times 0,1 = 7,33 \text{ л}$$

Загальна кількість води, яка необхідна для розбавлення компонентів поживного середовища буде:

$$V_{\text{в}} = V_{\text{псф}} - V_{\text{кф}} = 73,3 - 7,33 = 65,97 \text{ л}$$

Склад композицій для стерилізації поживного середовища у ферментері

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 75,6 л середовища, г (л)	Композиція	Об'єм композиції (л)
Глюкоза	15,44	1149,6	А	7,1
мясний екстракт	8	595,6		
Вода		4,705		
Конденсат		0,545		
C ₃ H ₃ NaO ₃	3,92	291,8	Б	68,5
K ₃ PO ₄	1,88	139,9		
C ₆ H ₁₇ N ₃ O ₇	1,88	139,9		
CH ₃ COONa	4,7	349,9		
Вода		60,00		
Конденсат		6,320		
Разом:		75,6		

Композиція Б стерилізується у ферментері. Композиція А готується і стерилізується у збірнику.

Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу в інокуляторі становить:

$$V_i = V_{\text{псф}} / (1 - E_{\text{па}}) = 7,6 / (1 - 0,1) = 8,4 \text{ л}$$

Кількість поживного середовища у інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{псі}} = V_i / (1 + X_{\text{па}}) = 8,4 / (1 + 0,1) = 7,6 \text{ л}$$

Необхідна кількість посівного матеріалу для засіву посівного апарата:

$$V_{\text{псі}} = V_i - V_{\text{псі}} = 8,4 - 7,6 = 0,8 \text{ л}$$

Згідно з прийнятим складом поживного середовища для вирощування інокуляту загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища $V_{\text{псі}}$ складають:

$$G_i = V_{\text{псі}} C_{\Sigma i} = 7,6 \times 79,15 = 601,5 \text{ г, в тому числі:}$$

$$\text{глюкоза} - G_1 = G_{\text{ф}} \times C_1 / C_{\Sigma \text{ф}} = 601,5 \times 20 / 79,15 = 152;$$

$$\text{екстракт яловичини} - G_2 = G_{\text{ф}} \times C_2 / C_{\Sigma \text{ф}} = 601,5 \times 10 / 79,15 = 75,9;$$

$$\text{пептон} - G_3 = G_{\text{ф}} \times C_3 / C_{\Sigma \text{ф}} = 601,5 \times 10 / 79,15 = 75,9$$

$$\text{дріжджовий екстракт}_4 - G_4 = G_{\phi} \times C_4 / C_{\Sigma\phi} = 601,5 \times 10 / 79,15 = 75,9;$$

$$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} - G_5 = G_{\phi} \times C_5 / C_{\Sigma\phi} = 601,5 \times 24 / 79,15 = 182,3;$$

$$\text{CH}_3\text{COONa} - G_6 = G_{\phi} \times C_6 / C_{\Sigma\phi} = 601,5 \times 5 / 79,15 = 37,9;$$

$$\text{MnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} - G_7 = G_{\phi} \times C_7 / C_{\Sigma\phi} = 601,5 \times 0,01 / 79,15 = 0,84;$$

$$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O} - G_8 = G_{\phi} (C_8 / C_{\Sigma}) = 601,5 \times 0,05 / 79,15 = 0,37$$

Загальна кількість води необхідної для розбавлення компонентів поживного середовища буде:

$$V_{\text{вiн}} = V_{\text{псiн}} - G_{\text{заг}} = 7600 - 601,5 = 6998,5 \text{ мл,}$$

де $G_{\text{заг}}$ – сума компонентів середовища, г.

Розраховуємо об'єм конденсату при стерилізації поживного середовища в окремих реакторах гострою парою, $K_{\text{кон}} = 0,1$. Загальна кількість конденсату, що утворюється при стерилізації ПС у посівному апараті, становитиме:

$$V_{\text{кпа}} = V_{\text{вiн}} \cdot K_{\text{кон}} = 6998,5 \times 0,1 = 699,8 \text{ мл}$$

Отже, без урахування конденсату, кількість води, необхідної для розбавлення компонентів поживного середовища становитиме:

$$V_{\text{в}} = V_{\text{вiн}} - V_{\text{кпа}} = 6998,5 - 699,8 = 6298,7 \text{ мл}$$

Для спрощення розрахунків приймемо, що густина компонентів приблизно дорівнює густині води, тобто 1 л = 1 кг. Розраховуємо кількість води для розчинення компонентів, мл:

$$\text{глюкоза} - V_1 = V_{\text{вiн}} \times C_1 / C_{\Sigma\text{iн}} = 6998,5 \times 20 / 79,15 = 1768,4;$$

$$\text{екстракт яловичини} - V_2 = V_{\text{вiн}} \times C_2 / C_{\Sigma\text{iн}} = 6998,5 \times 10 / 79,15 = 884,27;$$

$$\text{пептон} - V_2 = V_{\text{вiн}} \times C_2 / C_{\Sigma\text{iн}} = 6998,5 \times 10 / 79,15 = 884,2;$$

$$\text{Дріжджовий автолізат} - V_3 = V_{\text{вiн}} \times C_3 / C_{\Sigma\text{iн}} = 6998,5 \times 10 / 79,15 = 884,2;$$

$$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} - V_4 = V_{\text{вiн}} \times C_4 / C_{\Sigma\text{iн}} = 6998,5 \times 24 / 79,15 = 2122;$$

$$\text{CH}_3\text{COONa} - V_5 = V_{\text{вiн}} \times C_5 / C_{\Sigma\text{iн}} = 6998,5 \times 5 / 79,15 = 442,1,$$

$$\text{MnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} - V_6 = V_{\text{вiн}} \times C_6 / C_{\Sigma\text{iн}} = 6998,5 \times 0,01 / 79,15 = 0,88,$$

$$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O} - V_7 = V_{\text{вiн}} \times C_7 / C_{\Sigma\text{iн}} = 6998,5 \times 0,05 / 79,15 = 4,4$$

де $C_{\Sigma\text{iн}}$ – сума компонентів середовища (г).

Склад композицій для стерилізації поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 7,6 л середовища, г (л)	Композиція	Об'єм композиції (мл)
Глюкоза	40	152	А	4420
екстракт яловичини	10	75,9		
пептон	10	75,9		
Дріжджовий автолізат	10	75,9		
Вода		3980		
Конденсат		441		
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	24	182,3	Б	3270
CH ₃ COONa	5	37,9		
MgSO ₄ × 7H ₂ O	0,01	0,81		
MnSO ₄ · 4H ₂ O	0,05	0,37		
Вода		2315		
Конденсат		257		
Разом:		7,6		7,6

Композиція А готується і стерилізується у збірнику, композиція Б - готується у збірнику, а стерилізується у інокулярі

Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування в колбах

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу в колбах становить: $V_{\text{пмі}} = V_{\text{кол}} = 0,760$ л.

Кількість поживного середовища в колбах становить:

$$V_{\text{пск}} = V_{\text{пмі}} / (1 + X_{\text{кол}}) = 0,760 / (1 + 0,1) = 0,7 \text{ л.}$$

Необхідна кількість посівного матеріалу для засівання колб, л:

$$V_{\text{пмк}} = V_{\text{пмі}} - V_{\text{пск}} = 0,760 - 0,7 = 0,06 = 60 \text{ мл.}$$

Згідно з прийнятим складом поживного загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища $V_{\text{пск}}$ складають:

$$G_{\text{к}} = V_{\text{пск}} \cdot C_{\Sigma} = 0,760 \times 79,15 = 60,1 \text{ г, в тому числі:}$$

$$\text{глюкоза} - G_1 = G_{\text{ф}} \times C_1 / C_{\Sigma\text{ф}} = 60,1 \times 20 / 79,15 = 15,1;$$

$$\text{екстракт яловичини} - G_2 = G_{\text{ф}} \times C_2 / C_{\Sigma\text{ф}} = 60,1 \times 10 / 79,15 = 7,6;$$

$$\text{пептон} - G_3 = G_{\text{ф}} \times C_3 / C_{\Sigma\text{ф}} = 60,1 \times 10 / 79,15 = 7,6$$

$$\text{дріжджовий екстракт}_4 - G_4 = G_{\text{ф}} \times C_4 / C_{\Sigma\text{ф}} = 60,1 \times 10 / 79,15 = 7,6;$$

$$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} - G_5 = G_{\text{ф}} \times C_5 / C_{\Sigma\text{ф}} = 60,1 \times 24 / 79,15 = 18,2;$$

$$\text{CH}_3\text{COONa} - G_6 = G_{\phi} \times C_6 / C_{\Sigma\phi} = 60,1 \times 5 / 79,15 = 3,8;$$

$$\text{MnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} - G_7 = G_{\phi} \times C_7 / C_{\Sigma\phi} = 60,1 \times 0,01 / 79,15 = 0,0075;$$

$$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O} - G_8 = G_{\phi} (C_8 / C_{\Sigma}) = 60,1 \times 0,05 / 79,15 = 0,037$$

де C_{Σ} – сума компонентів середовища (г).

Враховуючи малу кількість компонентів їх стерилізація проводиться в колбах в автоклаві при цьому конденсат не утворюється. Загальна кількість води необхідної для розбавлення компонентів поживного середовища буде:

$$V_{\text{вк}} = V_{\text{впск}} - G_{\text{к}} = 760 - 60,1 = 700 \text{ мл}$$

Розрахуємо кількість води для розчинення покомпонентно, мл:

$$\text{глюкоза} - V_1 = V_{\text{вн}} \times C_1 / C_{\Sigma\text{н}} = 700 \times 20 / 79,15 = 176,8;$$

$$\text{екстракт яловичини} - V_2 = V_{\text{вн}} \times C_2 / C_{\Sigma\text{н}} = 700 \times 10 / 79,15 = 88;$$

$$\text{пептон} - V_2 = V_{\text{вн}} \times C_2 / C_{\Sigma\text{н}} = 700 \times 10 / 79,15 = 88;$$

$$\text{Дріжджовий автолізат} - V_3 = V_{\text{вн}} \times C_3 / C_{\Sigma\text{н}} = 700 \times 10 / 79,15 = 88;$$

$$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} - V_4 = V_{\text{вн}} \times C_4 / C_{\Sigma\text{н}} = 700 \times 24 / 79,15 = 212,2;$$

$$\text{CH}_3\text{COONa} - V_5 = V_{\text{вн}} \times C_5 / C_{\Sigma\text{н}} = 700 \times 5 / 79,15 = 44,0,$$

$$\text{MnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} - V_6 = V_{\text{вн}} \times C_6 / C_{\Sigma\text{н}} = 700 \times 0,01 / 79,15 = 0,088,$$

$$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O} - V_7 = V_{\text{вн}} \times C_7 / C_{\Sigma\text{н}} = 700 \times 0,05 / 79,15 = 0,44$$

Формування композицій:

Таблиця 4.3

Склад композицій для стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 760 мл середовища, г (мл)	Композиція	Об'єм композиції (мл)
Глюкоза	40	15,1	А	477
екстракт яловичини	10	7,6		
пептон	10	7,6		
Дріжджовий автолізат	10	7,6		
Вода		441		
CH ₃ COONa	5	3,8	Б	53
MgSO ₄ × 7H ₂ O	0,01	0,0075		
MnSO ₄ · 4H ₂ O	0,05	0,037		
Вода		44,5		
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	24	18,2	В	230
Вода		212,2		
Разом:		760		760

Усі композиції готуються у лабораторному посуді і стерилізуються в автоклаві.

4.2. Специфікація обладнання ділянки виробничого біосинтезу

Специфікація обладнання, зображеного на апаратурній схемі, наведена у табл. 4.4.

Таблиця 4.4

Специфікація ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу біомаси *L. rhamnosus* E/H

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
1	2	3	4
З-1	Збірник для приготування миючого розчину	1	Збірник об'ємом 100 л, оснащений сорочкою та перемішувачем (100 об/хв), сталь 12Х18Н10Т. Виробник: «Красный октябрь». ¹
Н-2 Н-9	Насос відцентровий	2	Насос відцентровий герметичний ДМЕ з нержавіючої сталі. Продуктивність 60-940 л/год 2 ¹⁰
Р-3 Р-6	Реактор для приготування композиції А	2	Реактор-змішувач об'ємом 5 і 10 л, оснащений сорочкою та лопатевою мішалкою (150 об/хв), сталь 12ХРМ0Т. Виробник «Красный октябрь». ¹
Р-4	Реактор для приготування розчину солей	1	Реактор-змішувач об'ємом 5 л, оснащений сорочкою та перемішувачем (100 об/хв), сталь 12Х18Н10Т. Виробник: «Красный октябрь». ¹
З-5 З-8	Збірник для аміачної води	2	Збірник об'ємом 2 л, сталь 12Х18Н10Т. Виробник: «Красный октябрь». ¹
І-7	Інокулятор	1	Інокулятор об'ємом 10 л, оснащений сорочкою, трубою перетискування, пробовідбірником, лопатевою мішалкою (до 20-1500 об/хв), сталь AISI 304. Виробник: «BIOSTAT® Cplus» ¹
Р-8	Реактор-змішувач для приготування композиції Б	1	Реактор-змішувач об'ємом 60 л, оснащений сорочкою та перемішувачем (150 об/хв), сталь 12РНН10Т. Виробник: «Красный октябрь». ¹
ФР-10	Ферментер	1	Ферментер об'ємом 100 л, оснащений сорочкою, пробовідбірником, лопатевою мішалкою (20-700 об/хв), сталь AISI 316L. Виробник: «BIOSTAT® D-DCU» ¹

Примітка*: пошук і підбір обладнання здійснювався з використанням наступних електронних джерел:

1. http://www.sartogosm.ru/biostat_c_plus.html, <https://www.sartorius.com/sartorius/en/EN/UR/products/bioreactors-fermentors/in-situ-sterilizable-pilot-production/biostat-d-dcu> (інокулятор та ферментер)

2. <http://ua.grundfos.com> (насоси).

4.3. Опис технологічної схеми виробничого біосинтезу

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

ДР 1.1. Підготовка персоналу

Поєднує в собі навчання персоналу, яке забезпечує саме підприємство та санітарно-гігієнічну підготовку персоналу (миття рук).

ДР 1.2. Приготування миючих та дезінфікуючих розчинів

ДР 1.2.1. Приготування робочого розчину Вімолу

На даному етапі необхідно приготувати 97 л робочого розчину Вімолу, концентрацією 1,0 %. Через об'ємно-ваговий дозатор у реактор-змішувач (З-1) об'ємом 140 л вносять 1 кг препарату і додають 96 л питної води, вмикають перемішувальний пристрій (100 об/хв) та підігрівають глухою парою до температури 70-80 °С, до повного розчинення порошку.

ДР 1.2.2. Приготування робочого розчину Хлорантоїну

У переносну емальовану ємність вносять 18 г порошку Хлорантоїну, додають 9 л питної води, підігрітої до температури 65 °С, та перемішують до повного розчинення.

ДР 1.3. Підготовка виробничих приміщень

ДР 1.3.1. Щоденне прибирання.

Щоденне прибирання приміщень проводиться за допомогою миючо-дезінфікуючого засобу Хлорантоїну (від ДР 1.2.2.) концентрацією 0,2%. Під час щоденного прибирання миють підлогу, та протирають ззовні апаратуру. Періодичність зміни ємності з миючим засобом кожні 30 м². (КУО < 800/см²).

ДР 1.3.2. Генеральне прибирання

Для обробки виробничих приміщень при генеральному прибиранні використовують 0,2 % розчин Хлорантоїну (від ДР 1.2.2.). Генеральне прибирання проходить раз на місяць та включає миття дверей, стін та вікон.

Для перевірки мікробіологічної чистоти проводять мікробіологічний контроль (КУО < 300/см²).

ДР 1.4 Підготовка обладнання та комунікацій

ДР 1.4.1. Миття та ополіскування обладнання

Для миття обладнання та комунікацій застосовують розчин Вімолу у концентрації 1 % (від ДР. 1.2.1) підігрітого до температури 70 – 80 °С. Робочий розчин зі збірника (Р-1) відцентровим насосом подають на миття обладнання. Розчином Вімолу промивають обладнання протягом 1 год при перемішуванні. Відпрацьований розчин йде на стадію знешкодження відходів (ЗВ 7.1). Ополіскування здійснюють технічною водою кімнатної температури. Далі після зливу вода направляєється на стадію знешкодження відходів (ЗВ 7.1).

ДР 1.4.2. Технічний огляд

Після миття та ополіскування ємкісного обладнання проводять його технічний огляд з метою виявлення можливих неущільнень в комунікаціях та запірній арматурі на обладнанні. У разі їх знаходження проводять підтягування різьбових з'єднань.

ДР 1.4.3. Перевірка обладнання на герметичність

Закривають усю запірну арматуру ємнісного обладнання і подають аераційне повітря до рівня надлишкового тиску $P = 0,1-0,2$ МПа. Далі перекривають вентиль подачі повітря і фіксують показання манометра на кришці апарату та час витримки (30-60 хв) в операційному журналі. Апарат вважається герметичним, якщо падіння тиску не перевищує 0,01 МПа. В іншому випадку здійснюють пошук неущільнень за допомогою галогенових течієпошукачів. В апарат вносять невелику кількість легкої галогенвмісної речовини (чотирихлористий карбон), знову закривають усю запірну арматуру. Апарат нагрівають до температури 80 °С і збільшують тиск до 0,2 МПа. Пари галогенвмісної речовини проникають через неущільнення і виявляються у разі наближення щупа течієпошукача до них. Тривалість операції – 1 год. У разі виявлення неущільнень здійснюють їх ліквідацію.

ДР 1.4.4. Стерилізація обладнання

Нагрів апарата. Попередньо в сорочку апарата подають насичену пару і прогрівають обладнання до температури 80-90 °С.

Стерилізація. Відкривають усю запірну арматуру на відкритих трубних закінченнях та підведених до апарата комунікаціях і подають гостру пару безпосередньо в апарат. В ферментер (ФР-10) та посівний апарат (І-7), збірники

(P-2 та P-6) – гостру пару подають через нижній спуск, попередньо відкривши вентиль виходу відпрацьованого повітря для видалення повітря з апарату. При досягненні в апараті температури стерилізації 130-135 °С закривають усю запірну арматуру, крім парової, і витримують 1,5 год (тиск 0,2 МПа). При стерилізації апарату паралельно стерилізуються індивідуальні фільтри стерильного та відпрацьованого повітря.

Охолодження. Закривають усю запірну арматуру подачі пари в апарат. Далі у сорочку подають холодну воду. Для компенсації падіння тиску в апарат подають стерильне повітря. Процес охолодження здійснюють до досягнення температури 30-40 °С і надлишкового тиску $P = 0,003-0,005$ МПа.

ДР 2. Приготування та стерилізація титрувальних агентів

ДР 2.1. Приготування 6-% розчину HCl

У стерильну колбу об'ємом 50 мл циліндром наливають 0,5 мл дистильованої води, далі за допомогою мірного циліндру відміряють і додають 6,2 мл 35% розчину HCl та перемішують.

ДР 2.2. Приготування та стерилізація 6-% розчину NaOH

Необхідно приготувати розчину 6 % NaOH для різних стадій підготовки поживного середовища

ДР 2.2.1 Приготування та стерилізація 6-% розчину NaOH для інокулятора об'ємом 10 л

На технічних вагах зважують 0,42 г кристалічного NaOH. Наважку переносять в колбу об'ємом 50 мл, додають 6,4 мл дистильованої води і перемішують до повного розчинення, закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при температурі 131°C упродовж 40 хв.

ДР 3. Приготування та стерилізація поживного середовища

ДР 3.1 Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту об'ємом 760 мл в колбах

Вміст компонентів для приготування 760 мл середовища наведено у табл. 5.1.

**Склад композицій для стерилізації компонентів для вирощування
посівного матеріалу в колбах**

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 760 ил середовища, г (мл)	Композиція	Об'єм композиції (мл)
Глюкоза	40	15,1	А	477
екстракт яловичини	10	7,6		
Пептон	10	7,6		
Дріжджовий автолізат	10	7,6		
Вода		441		
CH ₃ COONa	5	3,8	Б	53
MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,01	0,0075		
MnSO ₄ · 4H ₂ O	0,05	0,037		
Вода		44,5		
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	24	18,2	В	230
Вода		212,2		
Разом:		760		760

ДР 3.1.1 Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 15,1 г глюкози та по 7,6 г екстракту яловичини, пептону та дріжджового автолізату. Наважки переносять у колбу об'ємом 1 л та додають 440 мл питної води, перемішують. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при температурі 112°C 20 хв.

ДР 3.1.2 Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 3,8 г CH₃COONa, 0,0075 г MgSO₄×7H₂O та 0,037 MnSO₄ · 4H₂O. Наважки переносять у колбу об'ємом 100 мл, додають 44 мл дистильованої води, закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°C 60 хв.

ДР 3.1.3 Приготування та стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 18,2 г Na₂HPO₄ · 2H₂O. Наважки переносять у колбу об'ємом 500 мл, додають 212 мл дистильованої води, закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°C 60 хв. Змішування компонентів, мікробіологічний контроль.

ДР 3.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 10 л

Для одержання посівного матеріалу на даному етапі необхідно приготувати 7,6 л поживного середовища (без врахування посівного матеріалу).

Вміст компонентів для приготування 7,6 л поживного середовища наведено в табл. 5.2

Таблиця 5.2

Склад композицій для стерилізації поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 7,6 л середовища, г (л)	Композиція	Об'єм композиції (мл)
Глюкоза	40	152	А	4420
екстракт яловичини	10	75,9		
пептон	10	75,9		
Дріжджовий автолізат	10	75,9		
Вода		3980		
Конденсат		441	Б	3270
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	24	182,3		
CH ₃ COONa	5	37,9		
MgSO ₄ × 7H ₂ O	0,01	0,81		
MnSO ₄ · 4H ₂ O	0,05	0,37		
Вода		2315		
Конденсат		257		
Разом:		7,6		7,6

ДР 3.2.1 Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 152 г глюкози та по 75,9 г екстракту яловичини, пептону та дріжджового автолізату. Наважки переносять у збірник об'ємом 7 л та додають 3980 мл питної води, перемішують. Шляхом подачі гострої пари у збірник при температурі 112°C 20 хв.

ДР 3.2.2 Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 37,9 г CH₃COONa, 0,81 г MgSO₄ × 7H₂O, 0,37 г MnSO₄ · 4H₂O та 182,3 г Na₂HPO₄ · 2H₂O. Наважки переносять у збірник об'ємом 5 л, додають 2315 мл питної води. Вмикають перемішуючий пристрій для кращого розчинення солей. Вміст збірника подають у інокулятор об'ємом 10 л, де розчин солей підкислюють нестерильним розчином HCl (від ДР 1.1) до рН

4-4,5 В сорочку ферментера подають пару до температури 80-90 °С, далі в апарат подають гостру пару та стерилізують при температурі 131 °С протягом 1 год.

ДР 3.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу в ферментері об'ємом 100 л

Для вирощування культури на даному етапі необхідно приготувати 75.6 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 75.6 л поживного середовища наведено в табл. 5.3.

Таблиця 5.3

Склад композицій для стерилізації поживного середовища у ферментері

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 75,6 л середовища, г (л)	Композиція	Об'єм композиції (л)
Глюкоза	15,44	1149,6	А	7,1
мясний екстракт	8	595,6		
Вода		4,705		
Конденсат		0,545		
$C_3H_3NaO_3$	3,92	291,8	Б	68,5
K_3PO_4	1,88	139,9		
$C_6H_{17}N_3O_7$	1,88	139,9		
CH_3COONa	4,7	349,9		
Вода		60,00		
Конденсат		6,320		
Разом:		75,6		75,6

ДР 3.3.1 Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 1149,6 г глюкози та 595,6г м'ясного екстракту. Наважки переносять у збірник об'ємом 10 л та додають 4705 мл питної води, перемішують. В сорочку збірника подають пару до температури 80-90 °С, далі в апарат подають гостру пару та стерилізують при температурі 112°С протягом 20 хв.

ДР 3.3.2 Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 291,8.3 г $C_3H_3NaO_3$, по 139,9 г K_3PO_4 та $C_6H_{17}N_3O_7$, 349,9 г CH_3COONa . Наважки переносять у збірник об'ємом 100 л, додають 60 л питної води. Вмикають перемішуючий пристрій для кращого

розчинення солей. Вміст збірника подають у ферментер об'ємом 100 л. В сорочку ферментера подають пару до температури 80-90 °С, далі в апарат подають гостру пару та стерилізують при температурі 131 °С протягом 1 год.

ТП 4. Підготовка посівного матеріалу

*ТП 4.1. Підтримання колекційної культури *L. rhamnosus* E/H*

Колекційну культуру *L. rhamnosus* E/H зберігають у пробірках (в товщі агару MRS). Пересіви здійснюють кожні 3–4 місяці. Всі роботи з колекційною культурою проводять строго в асептичних умовах.

*ТП.4.2 Одержання робочої культури *L. rhamnosus* E/H*

Колекційну культуру *L. rhamnosus* E/H, що зберігалася в пробірках з середовищем MRS агаром, розсівають петлею до ізольованих колоній на чашки Петрі із середовищем MRS агаром і вирощують при температурі 28–30°C.

*ТП 4.3. Вирощування робочої культури *L. rhamnosus* E/H на агаризованому середовищі*

Ізольовані колонії пересівають уколом в товщу агару MRS агаром та інкубують протягом 24 год.

ТП 4.4. Вирощування інокуляту в колбах

У колбу об'ємом 1 л з композицією А (від ДР 3.1.1) в асептичних умовах вносять композицію Б (від ДР 3.1.2), та композицію В (від ДР 3.1.3). Після зливання композицій проводять мікробіологічний контроль. Колбу закривають гумовим корком.

У пробірку з робочою культурою *L. rhamnosus* E/H, вирощеною на MRS агарі, вносять 5 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини, піпеткою вносять одержану суспензію у колби з розлитим поживним середовищем. Для засіву однієї колби використовують суспензію, одержану з однієї пробірки.

Культивування *L. rhamnosus* E/H здійснюють в колбі закритій резиною пробкою впродовж 24 год. Після вирощування інокуляту здійснюють мікробіологічний контроль в колбі.

ТП 4.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 10 л

В інокулятор (І-7), зі стерильною композицією Б (від ДР 3.2.2) самоплином стерильну композицію А від (від ДР 3.2.1). Далі доводять рН середовища до 5,5

стерильним 6%-м розчином NaOH (від ДР 2.2.1) при постійному перемішуванні. Перед внесенням посівного матеріалу, відбирають пробу для проведення мікробіологічного контролю.

Посівний матеріал (від ТП 4.4) подають в асептичних умовах через стерильну засівну колбу, об'ємом 1 л. Вмикають мішалку, подають пару в рубашку (для підтримання температури 30°C). Сигналізатор рН інформує про зниження рівня рН, підтитровка розчином аміачної води відбувається автоматично. К ультивують впродовж 24 год. Кожні 4-6 год відбирають проби для проведення мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси. По закінченню процесу, орієнтовна концентрація біомаси має становити 10 г/л.

ТП 5. Біосинтез

ТП 5.1. Виробниче культивування

У ферментер (ФР-10) зі стерильною композицією Б (від ДР 3.3.2) через трубопровід подають стерильну композицію А (від ДР 3.3.1). Далі доводять рН середовища до 5,5 стерильним 6%-м розчином NaOH (від ДР 2.2.2) при постійному перемішуванні (швидкість обертів мішалки 150 об/хв). Перед внесенням посівного матеріалу, відбирають пробу для проведення мікробіологічного контролю.

Посівний матеріал (від ТП 4.5) подають через трубу перетискування з інокулятора (І-7). Вмикають мішалку, подають пару в рубашку та культивують при температурі 30 °С. Сигналізатор рН інформує про зниження рівня рН, підтитровка розчином аміачної води (від Р-8) відбувається автоматично. Кожні 4-6 год відбирають проби для проведення мікробіологічного контролю, визначення рівня біомаси. В кінці процесу культивування, концентрація біомаси має сягати 23 г/л.

4.4. Контроль ділянки біосинтезу

Визначення мікробіологічної чистоти.

1) Мікроскопування (метод роздавленої краплі).

На поверхню знежиреного предметного скла наносять краплю досліджуваного матеріалу або суспензію бактерій і покривають її покривним склом. Крапля повинна бути невеликий, що не виходить за край покривного скла. Мікроскопіюють препарат з об'єктивом 40×.

2) До ізольованих колоній.

Для визначення загальної кількості бактерій по 1 мл суспензії висівають не менш, ніж на дві чашки Петрі з поживним середовищем МПА, з додаванням 5% глюкози методом двошарового висівання, для визначення загальної кількості бактерій [14].

Для визначення загальної кількості грибів і дріжджів по 1 мл зависі висівають не менш, ніж на дві чашки Петрі з середовищем Сабуро.

Посіви на МПА інкубують у термостаті за температури $(38 \pm 1)^\circ\text{C}$ протягом 48 год. Посіви на середовищі Сабуро інкубують при температурі $(22 \pm 1)^\circ\text{C}$ протягом 72 год. Після закінчення інкубації на чашках Петрі повинен бути відсутній ріст сторонніх мікроорганізмів [72].

Визначення концентрації біомаси

Концентрацію біомаси визначають за оптичною густиною клітинної суспензії із наступним перерахунком на абсолютно суху біомасу у відповідності з калібрувальним графіком.

У пробірки із 9 мл дистильованої води вносять по 1 мл культуральної рідини. Суміш збовтується, потім вимірюється оптична густина (при 540 нм). Концентрацію біомаси визначають за калібрувальним графіком [73].

Визначення концентрації джерела вуглецю

Концентрацію глюкози визначали з використанням ферментативного аналізу на основі глюкозооксидази та пероксидази хрому з використанням 2,2-азино-біс(3-етилбензтіазолін-6-сульфонової) кислоти (ABTS) в якості хромогенного субстрату. Суть методу полягає у тому, що при окисненні

глюкози одним з продуктів реакції є пероксид водню, який розкладається пероксидазою та окисляє хромогенний субстрат.

Для визначення відбирали 20 мкл супернатанту (отриманого шляхом центрифугування культуральної рідини при 5 тис об/хв протягом 30 хв) змішували з 80 мкл натрій-фосфатного буфера (0,1 моль/літр, рН 7), а потім додавали 40 мкл розчину глюкозооксидази. Далі до суміші додавали 840 мкл розчину АВТS і 40 мкл пероксидази, аналіз інкубували протягом 20 хв при 37 °С. Екстинкцію вимірювали при 415 нм, та визначали концентрацію глюкози в зразках за стандартною кривою [63].

Визначення концентрації джерела азоту

Джерелом амінного азоту в середовищі для культивування *L. rhamnosus* Е/Н є дріжджовий екстракт і пептон, до складу якого входить аміний азот у складі амінокислот.

В основі методу лежить здатність амінокислот утворювати розчинні з'єднання з міддю, кількість якої визначають йодометричним титруванням.

Суть методу полягає в тому, що до слабо лужного розчину амінокислот додають надлишок суспензії ортофосфату міді $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ у боратному буферному розчині. При цьому утворюються розчинні мідні з'єднання. Для їхнього відділення від нерозчинного ортофосфату міді суміш фільтрують. Потім до фільтрату прибавляють оцтову кислоту, яка відщеплює мідь від комплексного з'єднання і перетворюється в ацетат міді [49].

Для визначення кількості міді, яка брала участь в реакції, до розчину добавляють йодид калію. В результаті реакції виділяється йод в кількості, еквівалентній кількості міді, а відповідно, і азоту амінокислот, який відтитровують розчином тіосульфату натрію.

1 мл 0,01 н розчину тіосульфату натрію відповідає 0,28 мг амінного азоту, оскільки один атом міді реагує з двома молекулами амінокислот, утворюючи з'єднання типу $\text{Cu}(\text{RCHNH}_2\text{COO})_2$.

Техніка визначення. Культуральну рідину у кількості 50 мл відбирають з ферментера, вносять у центрифужні пробірки та центрифугують

при 3000 об/хв 15-20 хв, далі суспензію фільтрують через фільтрувальний папір, фільтрат відбирають у окрему ємність для аналізів.

В мірну колбу місткістю 50 мл піпеткою вносять 5 мл культуральної рідини, додають 3-4 краплини індикатору тимолфталейну і по краплям розчин гідроксиду натрію концентрацією 0,1 моль/л до появи блідно-блакитного забарвлення. До слабо лужного розчину із циліндра при перемішуванні порціями обережно приливають 30 мл суспензії ортофосфату міді, вміст колби доводять дистильованою водою до мітки, перемішують і фільтрують через паперовий фільтр. Фільтрат повинен бути прозорим.

10 мл абсолютно прозорого фільтрату піпеткою переносять в фарфорову чашку або конічну колбу, добавляють 0,5 мл 80 %-ї оцтової кислоти (підкислюють) і 10 мл розчину йодату калію. Після перемішування йод, що виділився, титрують із мікробюретки розчином тіосульфату натрію концентрацією 0,01 моль/л . В кінці титрування до розчину додають 1-2 краплини розчину крохмалю. Кінець титрування визначають по зникненню синього забарвлення від однієї краплі тіосульфату натрію.

При прийнятому розбавленні кількість амінного азоту в 10 мл фільтрату отримують множенням маси тіосульфату натрію, витраченого на титрування, на 0,28. З урахуванням розчинення це відповідає 1 мл культуральної рідини.

Таблиця 5.4

Карта постадійного контролю біосинтезу біомаси

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
1	2	3	4	5
ДР 1. Санітарна підготовка виробництва				
ДР 1.2. Підготовка миючих та дезінфікуючих засобів				
Кх, Кт 1.2.1. Приготування робочого розчину Вімолу	Концентрація розчину Вімолу	Хімічний метод	Після приготування розчину	C = 1%
Кх 1.2.2. Приготування робочого розчину Хлорантоїну	Концентрація розчину Хлорантоїну	Хімічний метод	Після приготування розчину	C = 0,2%
ДР 2. Приготування та стерилізація титрувальних агентів				
Кх 2.1. Приготування 6-% розчину HCl	Концентрація розчину HCl	Хімічний метод	Концентрація визначається після приготування розчину	C = 6%
Кт, Кх, Км 2.2. Приготування та стерилізація 6-% розчину NaOH	Концентрація розчину NaOH, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, хімічний метод, мікробіологічний метод	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, концентрація визначається після приготування розчину, мікробіологічний контроль після стерилізації	C = 6%, P=0,15 МПа, t=130 °C, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти

ДР 3. Приготування та стерилізація поживного середовища				
ДР 3.1. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту об'ємом 600 мл в колбах на качалках				
Кт, Км 3.1.1. Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,05 МПа, t=112 °С, τ = 20 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.1.2. Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,15 МПа, t=130 °С, τ = 60 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.1.2. Приготування та стерилізація композиції В	Композиція В, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,15 МПа, t=130 °С, τ = 60 хв, відсутність мікробіоти
ДР 3.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 10 л				
Кт, Км 3.2.1. Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,05 МПа, t=112 °С, τ = 20 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.2.2. Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,15 МПа, t=130 °С, τ = 60 хв, відсутність мікробіоти

ДР 3.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу в ферментері об'ємом 100 л				
Кт, Км 3.3.1. Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,05 МПа, t=112 °C, τ = 20 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.3.2. Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,15 МПа, t=130 °C, τ = 60 хв, відсутність мікробіоти
ТП 4. Підготовка посівного матеріалу				
Кт, Км 4.4 Вирощування інокуляту в колбах на качалках	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури, концентрація біомаси	Термометр технічний, годинник, тахометр, фотоелектроколориметр, мікробіологічний контроль	Після вирощування культури в колбах на качалках	t = 30 °C, τ = 24 год, n = 150об/хв, X=100 г/л, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 4.4 Вирощування інокуляту об'ємом 10 л	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури, концентрація біомаси	Термометр технічний, годинник, тахометр, фотоелектроколориметр, мікробіологічний контроль	Після вирощування культури в інокуляторі об'ємом 10 л	t = 30 °C, τ = 24 год, рН =5,5, n = 150 об/хв, X=10 г/л, відсутність сторонньої мікробіоти
ТП 5. Виробничий біосинтез				
Кт, Км, Кх 6.1 Виробниче культивування	Культуральна рідина, швидкість перемішування, температура, рН, тривалість культивування, мікробіологічна чистота культури, концентрація гіалуронової кислоти	Термометр технічний, годинник, датчик рН, фотоелектроколориметр, мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль та визначення рівня біомаси проводять кожні 4-6 годин, концентрація гіалуронової кислоти визначається після закінчення процесу культивування	t = 30 °C, τ = 18 год, рН =5,5, n =150 об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти, конц. біомаси=21,0 г/л,

РОЗДІЛ 5. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ ВИРОБНИЦТВА БІОМАСИ

5.1. Специфікація обладнання ділянки виробництва ЛЗ

Специфікація обладнання, зображеного на апаратурних схемах (див. графічна частина), наведена у табл. 5.1.

Таблиця 5.1

Специфікація обладнання допоміжних робіт, виробничого біосинтезу та виділення біомаси *L. rhamnosus* Е/Н

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
1	2	3	4
З-1	Збірник для культуральної рідини	1	Збірник об'ємом 100 л, оснащений перемішувальним пристроєм (100 об/хв) та сорочкою, виготовлений із нержавіючої сталі AISI 304. Виробник: ТОВ «Метал сервіс груп», Україна ¹ .
Н-2	Насоси відцентрові	2	Насос фірми РСМ серії Delasco (Франція), продуктивністю до 15 л/хв для об'єму 63 л, високоякісна нержавіюча сталь ²
Ц-3	Центрифуга	1	Відстійна центрифуга періодичної дії виготовлена на замовлення, продуктивністю 20-25 л/год. Виробник: ПАТ «Сумське НПО» ² .
Р-4	Реактор-змішувач	1	Реактор-змішувач JGR10L, обладнаний перемішувальним пристроєм, об'ємом 5 л. Розміри 630x700x1280 мм. Виробник: «ПраймКемікалсГруп», Росія ³ .
СС-5	Сублимаційна сушарка	1	Вертикальна сублимаційна сушарка Epsilon 2-6D LSCplus. Розмір сушки 780×975×550 мм. Максимальна місткість 4 кг, продуктивність 3 кг/добу. Розмір полок 270×400 мм, кількість полок 1 шт Температурний діапазон роботи від -50 до + 60 °С. Виробник: Китай ⁴ .
П-6	Подрібнювач	1	Молоткова дробарка подрібнювач YF8-1 Розмір 580 x 360 x 480мм. Діаметр пор сита: 0,25 мм, кількість сит 4. Кількість оборотів: 2800 об/хв. Виробник: Китай
ФПМ-7	Фасувально-пакувальна машина	1	Двохпотокова машина по фасуванню і спайці капсул НЕСПРЕССО Розміри 4100×1300×1900 мм. Обсяг накопичувального бункера до 15 кг. Продуктивність 4500 шт/год. Діапазон дозування 0,05-20 гр.

					НУХТ БТЕК 02.02.11 КР ПЗ			
Зн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Пархоменко Т.Ю.			РОЗДІЛ 5 Опис технологічного процесу виробництва біомаси	Літ.	Арк.	Акрушів
Керівник		Воронцов О.О.					84	100
Консультант						Кафедра БТМ		
Зав.каф.		Пирог Т.П.						

Примітка*: пошук і підбір обладнання здійснювався з використанням наступних електронних джерел:

1. <https://odessa.flagma.ua/smesitel-reaktor-sbornik-meshalka-lyubogo-o3264874.html>, (ємнісне обладнання, 500 л);
2. <https://trudovik.com.ua> (насос)
3. <http://snpo.ua/uk/produktsiya/tsentrifugi/> (центрифуга);
4. <https://reahimpribor.ru/catalog/reaktory-dlya-himicheskogo-sinteza/duplicate-of-reaktor-himicheskij-na-10-l-s-zashhitnoj-obolochkoj-model-jgr-10l.html> (реактор змішувач);
5. http://www.millab.ru/equipments/3507_liofilnaja_sushilka_epsilon_2-6d_1scplus/ (сублімаційна сушарка);
6. <https://chumaki.in.ua/p606012619-izmelchitel-yf8-melnitsa.html> (подрібнювач);
7. <https://packtech.com.ua/uk/obladnannya/fasualne/avtomaty-seriyi-sashe/af-35-sgo> (фасувально-пакувальна машина).

5.2. Опис технологічного процесу виробництва ЛЗ

ДР 6. Приготування захисного середовища

Захисне середовище складається із сахарози, желатози та аеросил в співвідношенні до концентрованої біомаси 1:1. Об'єм концентрату, враховуючи втрати при центрифугуванні становить 1320. Отже, нам необхідно приготувати захисне середовище об'ємом 1320 л.

ДР 6.1. Підготовка захисного середовища

На технічних вагах у паперовій тарі зважують 132 г сахарози,

13,2 г желатози та 39,6 г аеросилу розчиняють у дистильованій воді об'ємом 1135 мл.

ТП 7. Відділення біомаси

ТП 7.1. Центрифугування культуральної рідини

Культуральна рідина з ферментеру відцентровим насосом подається в збірник культуральної рідини об'ємом 100 л (З-1).

Зі збірника (З-1) відцентровим насосом (Н-2) культуральна рідина подається у осаджувальну центрифугу зі шнековим вивантаженням осаду (Ц-13), де здійснюється центрифугування при 4000 об/хв, тривалістю 30-40 хв.

Сконцентровану біомасу вивантажують і вручну вносять у реактор-змішувач (Р-4) об'ємом 5 л, центрифугат подають на стадію знешкодження рідких відходів.

ТП 8. Одержання напівфабрикату

ТП 8.1. Змішування біомаси із захисним середовищем

У реактор (Р-4), в якому знаходиться біомаса (від ТП 7.1), вносять захисне середовище (від ДР 6.1). Вмикають перемішуючий пристрій реактора на відмітку 200 об/хв і перемішують протягом 20 хв.

ТП 9. Сушіння препарату

Сушіння напівфабрикату здійснюють у сублімаційній сушарці (С-15). Для цього отриманий після гомогенізатора продукт, вручну розливають в асептичних умовах на стерильні лотки товщиною шару (10 ± 2) мм.

ТП 9.1. Заморожування препарату

Заморожування суміші біомаси і захисного середовища (від ТП 8.1) відбувається на лотках в сублімаційній сушарці (С-15), створюється температура для заморожування, яка складає $-50 \pm 3^\circ \text{C}$, тривалість процесу складає 10-12 години.

ТП 9.2. Сублімаційне сушіння

Перед сушінням відкривають вакуумний вентиль, включають вакуумний насос і створюють в сушильній камері необхідний тиск (9 Па), відстежуючи його за показаннями вакуумметра.

За допомогою теплоносія поступово підіймають температуру в камері де знаходиться заморожений продукт до $42 \pm 3^\circ \text{C}$, тривалість сушіння складає 10-13 годин.

ТП 10. Подрібнення та просіювання препарату

ТП 10.1. Подрібнення та просіювання

Висушену біомасу (від ТП 9.2) з лотків вручну транспортують до молоткової дробарки а YF8-1 (П-16), де відбувається її подрібнення та просіювання через сито.

Діаметр пор вібросити складає 250 мікрон що забезпечує відповідний розмір частинок.

Подрібнену та просіяну біомасу відправляють на подальші стадії технологічного процесу.

ПМВ 11. Пакування та маркування готового продукту

ПМВ 11.1. Пакування продукту в капсули

Подрібнений та просіяний препарат (від *ТП 10.1*) подається у накопичувальний бункер вагового фасувального автомату (ФПМ-17 що окрім фасування здійснює і запайку капсул. Кількість просіяного продукту в одній капсулі становить 25 мг, точність дозування 0,05 г

ПМВ 11.2. Пакування капсул в первинну тару, маркування

Після чого капсули пакуються у первинну тару (блістер) та заклеюються фольгою. Маркування роблять фарбою чорного кольору безпосередньо на фользі, на якій зазначають назву та марку препарату, підприємства-виробника, масу нетто, номер партії, дату виготовлення, особливі відмітки.

ПМВ 11.3. Фасування у вторинну тару

Пакування промаркованих блістерів (від *ПМВ 1.2*) здійснюється у картонні коробки, вручну. Коробки відвантажуються на склад для зберігання готової продукції та подальшої реалізації.

5.3. Контроль ділянки виробництва ЛЗ

Визначення масової частки вологи

Визначення вологості біомаси після ліофільного сушіння буде проводитися на приладі Чижової.

Суть метода полягає у висушуванні наважки досліджуваної речовини між двома нагрітими металевими плитами. Загальний час визначення не перевищує 35-40 хвилин.

Техніка визначення: виготовляють пакети з цупкого паперу (2 шт. на 1 дослід). Нумерують їх простим олівцем. Висушують пакети протягом 3 хвилин при температурі 165 - 170 °С. Після цього пакети на 5-6 хвилин лишають в ексікаторі для охолодження, а потім зважують на технічних терезах з точністю до 0,01 г. У сухі пакети зважують приблизно 5 г речовини для визначення вологості середньої проби. За можливістю розміщують речовину у конверті рівним шаром, потім пакет з вологою наважкою зважують і вкладають у прилад Чижової, де пробу висушують при температурі 165-170°С впродовж 7 хвилин. Після 5-6 хвилин охолодження в ексікаторі пакети з наважкою знов зважують. Вологість розраховують за формулою:

$$W = (a - v/a - б) \times 100$$

де W – вологість, %; а – маса пакета з наважкою до висушування, г; б – маса сухого висушеного пакета, г; в – маса пакета з наважкою після сушки, г [70].

Контроль зовнішнього вигляду і кольору

Зовнішній вигляд і колір препарату визначають візуально по кожній одиниці упаковки вибірки при відборі точкової проби.

Візуально: однорідний порошок від світло-бежевого до світло-коричневого кольору.

Визначення кількості життєздатних клітин (метод Коха)

Метод широко застосовують для визначення чисельності життєздатних клітин у різних природних субстратах і в лабораторних культурах. У його

основі лежить принцип Коха, відповідно до якого кожна колонія є потомством однієї клітини. Це дозволяє, обрахувавши кількість колоній, що вирости після посіву на щільне поживне середовище певного об'єму досліджуваної суспензії, судити про вихідний вміст у ній клітин мікроорганізмів. Результати кількісного обліку мікроорганізмів, проведеного методом Коха, часто виражають не в числі клітин, а в умовних одиницях – так званих колонієутворювальних одиницях (КУО). Визначення проводиться у три етапи: приготування розведень, посів на щільне середовище в чашки Петрі й підрахунок виростлих колоній.

Приготування розведень. Для одержання ізольованих колоній необхідно приготувати ряд послідовних розведень. Розведення готують у стерильній водопровідній воді або 0,9%-вому розчині NaCl (фізрозчині). У ході досліду доцільно використати однаковий коефіцієнт розведення, наприклад 10, що зменшує ймовірність помилки. Для приготування розведень стерильну водопровідну воду розливають по 9 мл у стерильні сухі пробірки. Потім 1 мл досліджуваної суспензії стерильною піпеткою переносять у пробірку з 9 мл стерильної води - це 1-ше розведення. Отримане розведення ретельно перемішують новою стерильною піпеткою, вбираючи в піпетку й випускаючи з неї отриману суспензію. Цю процедуру виконують 3...5 разів, потім тією же піпеткою відбирають 1 мл отриманої суспензії й переносять в 2-гу пробірку – одержують 2-е розведення. У такий же спосіб готують і наступні розведення. Ступінь розведення залежить від щільності досліджуваної популяції мікроорганізмів; відповідно він тим більше, чим більше щільність популяції.

Посів. Висівати суспензію можна поверхневим або глибинним способом. Поверхню агаризованих середовищ перед посівом рекомендується підсушувати для видалення конденсаційної води. Після того як середовище готове, на його поверхню стерильною піпеткою наносять точно відміряний об'єм (0,05 або 0,1 мл) відповідного розведення й розподіляють його стерильним шпателем по поверхні середовища. Висіви на

щільне середовище проводять, як правило, із трьох останніх розведень, причому з кожного роблять 2...4 паралельних висіви. Посіви можна робити однією піпеткою, але при цьому починати треба обов'язково з більшого розведення. Для кожного розведення використовують новий стерильний шпатель. Після посіву чашки Петрі поміщають у термостат кришками вниз. При глибинному посіві точно відміряний об'єм (як правило 0,1, 0,5 або 1,0 мл) вихідної суспензії або розведення вносять у розплавлене й охолоджене до 48...50°C агаризоване середовище, ретельно перемішують і потім негайно виливають у чашку Петрі. Коли середовище застигне, чашки Петрі перевертають догори дном і поміщають у термостат.

Підрахунок колоній. Колонії мікроорганізмів залежно від швидкості росту підраховують через 2...15 доби інкубації. Кращим розведенням варто вважати те, при висіві з якого в чашці Петрі виростає від 30...50 до 100...150 колоній. Якщо кількість вирослих колоній виявилось менше 10, то ці результати для розрахунку кількості клітин у вихідному матеріалі не використовують. Результати паралельних висівів з того самого розведення підсумують і визначають середню кількість колоній. Кількість клітин в 1 мл досліджуваного субстрату обчислюють за формулою:

$$M = a \times 10^n / V,$$

де M – кількість клітин в 1 мл суспензії; a – середня кількість колоній при висіві розведення, з якого зроблений висів; V – об'єм суспензії, узятий для посіву, мл; 10^n – коефіцієнт розведень.

Карта постадійного контролю виробництва

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
1	2	3	4	5
ДР 1. Приготування захисного середовища				
Кт, Км 1.1. Приготування та стерилізація захисного середовища	Захисне середовище, температура, час, стерильність	Манометр, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t=112-115\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 20-30\text{ хв}$, відсутність мікробіоти
ТП 2. Відділення біомаси				
Кт 2.1 Центрифугування культуральної рідини	Частота обертів, тривалість процесу	Тахометр, годинник	Частота обертів перевіряється безпосередньо під час центрифугування	$\tau = 30-40\text{ хв}$, $n = 4000\text{ об/хв}$
ТП 3. Одержання напівфабрикату				
Кт 3.1 Змішування біомаси із захисним середовищем	Частота обертів, тривалість процесу	Тахометр, годинник	Частота обертів перевіряється безпосередньо під час процесу	$\tau = 20\text{ хв}$, $n = 200\text{ об/хв}$
ТП 4. Сушіння препарату				
Кт 4.1 Заморожування препарату	Температура заморожування, час	Термометр технічний, годинник	Під час заморожування	$t=-50\pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 10-12\text{ год}$
Кт 4.2 Сублімаційне сушіння	Температура, тривалість, тиск	Технічний термометр, годинник, манометр	Під час висушування	$P=9\text{ Па}$, $t=42\pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 10-10\text{ год}$
ТП 5. Просіювання препарату				
Кт 5.1 Подібнення та просіювання ліофільно висушеної біомаси	Діаметр часточок продукту	Ситовий аналіз	Після подрібнення	$d=0,3\text{ мм}$
ПМВ 6. Пакування та маркування готового продукту				
Кт 6.1 Фасування в капсули та пакування продукту	Кількість препарату	Ваги	Під час пакування	$m=50\text{ г/пакет}$

Висновки

1. Аналіз літературних джерел дозволяє зробити висновок, що пробіотики є сучасним і перспективним лікарським засобом при лікуванні інфекцій сечовивідних шляхів.
2. Доведено, що найбільш економічно доцільним є використання у якості пробіотичного препарату біомаси *Lactobacillus rhamnosus* E / H.
3. Оптимізовано технологію біосинтезу, виділення та концентрування *Lactobacillus rhamnosus* E / H.
4. Описано технологічну схему виробничого біосинтезу та ділянки виробництва лікарського засобу.
5. Запропоновано та експериментально перевірено ефективне захисне середовище наступного складу, г/л, сахароза – 100; желатоза – 10; аеросил –30.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Pace F, Pace M, Quartarone G. Probiotics in Digestive Diseases: Focus on *Lactobacillus GG*. *Minerva Gastroenterol Dietol*. 2015, 61(4):273-92.
2. Doron S, Snyderman DR. Risk and Safety of Probiotics. *Clin Infect Dis*. 2015, 60:129-34. doi: 10.1093/cid/civ085.
3. Matsubara, V. H., Bandara, H. M. H. N., Ishikawa, K. H., Mayer, M. P. A., Samaranayake, L. P. The role of probiotic bacteria in managing periodontal disease: a systematic review. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. 2016, 14(7): 643–655. doi:10.1080/14787210.2016.1194198.
4. Zawistowska-Rojek A., Tyski S. Are Probiotic Really Safe for Humans? *Pol J Microbiol* 2018;67(3):251-258. doi: 10.21307/pjm-2018-044.¹
5. Rossoni, R. D., Velloso, M. dos S., de Barros, P. P., de Alvarenga, J. A., Santos, J. D. dos, Santos Prado, A. C. C. dos, Junqueira, J. C. Inhibitory effect of probiotic *Lactobacillus* supernatants from the oral cavity on *Streptococcus mutans* biofilms. *Microbial Pathogenesis*. 2018, 123: 361–367. doi:10.1016/j.micpath.2018.07.032 .
6. Watson D., O'Connell Motherway M., Schoterman M.H.C., Joost van Neerven R.J., Nauta A. van Sinderen D. Selective carbohydrate utilization by lactobacilli and bifidobacteria. *J Appl Microbiol*. 2012, 114, 1132—1146
7. Georgieva R., Koleva P., Nikolova D., Yankov D., Danova S. Growth Parameters of Probiotic Strain *Lactobacillus Plantarum*, Isolated from Traditional White Cheese Equipmen. *Biotech & Biotechnol*. 2009. <https://doi.org/10.1080/13102818.2009.10818558>.
8. Menon R., Shields M., Duong T., Sturino J.M. Development of a Carbohydrate-Supplemented Semidefined Medium for the Semiselective Cultivation of *Lactobacillus* Spp. *Lett Appl Microbiol*. 2013, 57(3):249-57. doi: 10.1111/lam.12106.
9. Elsayed A. Othman N.Z., Malek R., Tang T., El Enshas H. A. Improvement of cell mass production of *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus* WICC-B-02: A

newly isolated probiotic strain from mother's milk. *JABS*. 2014, 4(11). DOI: 10.7324/JAPS.2014.4112.

10. Polak-Berecka M., Waśko A., Kordowska-Wiater M., Podleśny M., Targoński Z., Kubik-Komar A. Optimization of Medium Composition for Enhancing Growth of *Lactobacillus Rhamnosus* PEN Using Response Surface Methodology *Pol J Microbiol*. 2015;59(2):113-8.

11. Brinques, G. B., do Carmo Peralba, M., & Ayub, M. A. Z.. Optimization of probiotic and lactic acid production by *Lactobacillus plantarum* in submerged bioreactor systems. *J Ind Microbiol & Biotechnol*, 2015, 37(2), 205–212. doi:10.1007/s10295-009-0665-1.

12. Polak-Berecka M., Waśko A., Kordowska-Wiater M., Targoński Z., Kubik-Komar A. Application of Response Surface Methodology to Enhancement of Biomass Production by *Lactobacillus Rhamnosus* E/N. *Braz J Microbiol*. 2018, 42(4):1485-94.

13. Avonts L., Van Uytven E., De Vuyst L. Cell growth and bacteriocin production of probiotic *Lactobacillus* strains in different media. *Int. Dairy J*. 2014, 14, 947–955.

14. Todorov S.D., van Reenan C.A., Dicks, L.M.T. Optimization of bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* ST13BR, a strain isolated from barley beer. *J. Gen. Appl. Microbiol*. 2014, 50, 149–157.

15. Todorov S.D., Dicks L.M.T. Effect of medium components on bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* ST151BR, a strain isolated from beer produced by the fermentation of maize, barley and soy flour. *World J. Microbiol. Biotechnol*. 2017, 20, 643–650.

16. Fahim Hazem A., Waleed M. A., Rouby El, Ahmed O. El-Gendy et al. Enhancement of the productivity of the potent bacteriocin avicin A and improvement of its stability using nanotechnology approaches *Nature*. 2017 DOI:10.1038/s41598-017-10157-9.

17. Li C., Bai J., Cai Z., Ouyang, F. Optimization of a cultural medium for bacteriocin production by *Lactococcus lactis* using response surface methodology. *J. of Biotechnol.* 2012. 93(1), 27–34. doi:10.1016/s0168-1656(01)00377-7 .
18. Chramostová J., Mošnová R., Lisová I., Pešek E., Drbohlav J., Němečková I. Influence of Cultivation Conditions on the Growth of *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* sp., and *Streptococcus thermophilus*, and on the Production of Organic Acids in Fermented Milks. *Czech J. Food Sci.* 2014, 32(5): 422–429.
19. Ricciardi A., Zotta T., Gerardo Ianniello R. Boscaino F., Matera A., Parente E. Effect of Respiratory Growth on the Metabolite Production and Stress Robustness of *Lactobacillus casei* N87 Cultivated in Cheese Whey Permeate Medium. *Front Microbiol.* 2019;10:851. doi: 10.3389/fmicb.2019.00851.
20. Rezvani F., Ardestani F., Najafpour G. Growth kinetic models of five species of *Lactobacilli* and lactose consumption in batch submerged culture. *J. Brazil. Microbiol.* 2017. doi: 10.1016/j.bjm.2016.12.007.
21. Rezvani F., Ardestani F., Najafpour G. Growth kinetic models of five species of *Lactobacilli* and lactose consumption in batch submerged culture. *J. Brazil. Microbiol.* 2017. doi: 10.1016/j.bjm.2016.12.007.
22. Sánchez Ó.J., Barragán J. P., Serna L. Review of *Lactobacillus* in the food industry and their culture media. *Rev. colomb. Biotecnol.* 2019, 21(2). <http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v21n2.81576> .
23. Ricciardi A., Zotta T., Gerardo Ianniello R., Boscaino F., Matera A., Parente E. Effect of Respiratory Growth on the Metabolite Production and Stress Robustness of *Lactobacillus casei* N87 Cultivated in Cheese Whey Permeate Medium. *Front Microbiol.* 2019. doi: 10.3389/fmicb.2019.00851.
24. Coghetto, C. C., Vasconcelos, C. B., Brinques, G. B., & Ayub, M. A. Z *Lactobacillus plantarum* BL011 cultivation in industrial isolated soybean protein acid residue. *Brazil. J. Microbiol.* 2016, 47(4), 941–948. doi:10.1016/j.bjm.2016.06.003

25. Hsieh, S.-C., Liu, J.-M., Pua, X.-H., Ting, Y., Hsu, R.-J., & Cheng, K.-C.. Optimization of *Lactobacillus acidophilus* cultivation using taro waste and evaluation of its biological activity. *App Microbiol Biotechno.* 2015, 100(6), 2629–2639. doi:10.1007/s00253-015-7149-1
26. Pyar H. , Liong Min-Tze, Peh K.K. Potentials of pineapple waste as growth medium for *Lactobacillus* species. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2014, 6(1): 142-145
27. Anukam K.C., Osazuwa E.O., Ahonkhai I., Reid G. 16S rRNA gene sequence and phylogenetic tree of *Lactobacillus species* from the healthy Nigerian women. *Afr J Biotechnol.* 2005;4:1222–27.
28. Bevillard E., Burton J.P., Hammond J.A., Lam D., Reid G. Novel insight into the urogenital microflora in postmenopausal women under hormone replacement therapy as analyzed by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Eur J Obstet Gynecol Reproductive Biol.* 2014;117:76–81
29. Vurton J.P., Cadieux P., Reid G. Improved understanding of the bacterial vaginal microbiota of women before and after probiotic instillation. *Appl Environ Microbiol.* 2018;69:97–101.
30. Naber K.G., Bergman B., Bishop M.C.,Bjerklund-Johansen T.E., Botto H., Lobel B.,Jinenez Cruz F., Selvaggi F.P. Urinary Tract Infection (UTI) Working Group of the Health Care Office (HCO) of the European Association of Urology (EAU). AU guidelines for the management of urinary and male genital tract infections. Urinary Tract Infection (UTI) Working Group of the Health Care Office (HCO) of the European Association of Urology (EAU). *Eur Urol.* 2001;40(5): 576–88
31. Zaitsev A.V., Kasyan G.R., Spivak L.G. Cystitis. *Urologiia.* 2016;(3):18–27.
32. Grabe M., Bartoletti R., Bjerklund Johansen T.E.,Cai T., Cek M., Koves B., Naber K.G., Pickard R.S., Tenke P., Wagenlehner F., Wullt B. Guidelines on rological infections. European Association of Urology; 2015 https://uroweb.org/wp-content/uploads/19-Urological-infections_LR2.
33. Terlizzi M.E., Gribaudo G., Maffei M.E. UroPathogenic *Escherichia coli* (UPEC) Infections: Virulence Factors, Bladder Responses, Antibiotic, and Non-

- antibiotic Antimicrobial Strategies. *Front Microbiol.* 2017;8:1566. doi: 10.3389/fmicb.2017.01566.
34. Bartoletti R., Cai T., Wagenlehner F.M., Naber K., Bjerklund Johansen T.E. Treatment of urinary tract infections and antibiotic stewardship. *European Urology Supplements.* 2016;15(4): 81–7. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.>
35. İdil N., Candan E.D., Yousefi Rad A., Aksoz N. High trimethoprim-sulfamethoxazole resistance in ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infection. *Minerva Biotec.* 2016;28(3): 159–63.
36. Habibi A., Khameneie M.K. Antibiotic resistance properties of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from pregnant women with history of recurrent urinary tract infections. *Trop J Pharm Res.* 2016;15(8): 1745–50. doi: 10.4314/tjpr.
37. Hanson L., VandeVusse L, Jerm'e M., Abad C. L., Safdar N. Probiotics for Treatment and Prevention of Urogenital Infections in Women: A Systematic Review. *J. Midwifery & Women's Health.* 2016, 61(3): 339-355. doi:10.1111/jmwh.12472
38. Parish A., Holliday K. Long-term care acquired urinary tract infections' antibiotic resistance patterns and empiric therapy: a pilot study. *Geriatr Nurs.* 2012;33(6): 473–8. doi: 10.1016/j. gerinurse.2012.05.003.
39. Matulay J.T., Mlynarczyk C.M., Cooper K.L. Curr Bladder Dysfunct Rep. 2016;11(1): 53–60. doi: 10.1007/s11884-016-0351-x.
40. Singh I., Gautam L.K., Kaur I.R. Effect of oral cranberry extract (standardized proanthocyanidin-A) in patients with recurrent UTI by pathogenic *E. coli*: a randomized placebo-controlled clinical research study. *Int Urol Nephrol.* 2016;48(9): 1379–86. doi: 10.1007/s11255-016-1342-8
41. Abad C.L., Safdar N. The role of *Lactobacillus* probiotics in the treatment or prevention of Urogenital infections –A Systematic Review. *J. Chemotherapy.* 2009, 21(3): 243-252. doi: 10.1179/joc.2009.21.3.243.

42. Beerepoot M. A., ter Riet G., Nys S. et al. Lactobacilli vs antibiotics to prevent urinary tract infections: a randomized, double-blind, noninferiority trial in postmenopausal women. *Arch Intern Med.* 2012;172 (9):704-712
43. Aragon I. M., Herrera-Imbroda B., Queipo-Ortuno M.I. et al. The Urinary Tract Microbiome in Health and Disease. *European Urology Focus.* 2018; 4: 128-138
44. Hilt E. E., McKinley K., Pearce M. M. et. al. Urine Is Not Sterile: Use of Enhanced Urine Culture Techniques To Detect Resident Bacterial Flora in the Adult Female Bladder. *J Clin Microbiol.* 2014; 52 (3): 871-876.
45. Пасечніков С.П. Цистит: етіопатогенез, класифікація, клінічна картина, діагностика, лікування. Український медичний часопис. 2016;(4): 34–6.
46. Бекетова Г.В. , Вдовиченко Ю.П. , Харпер Е., Няньковська О.С. , Аряєв М.Л. , Кривуша О.Л., Стенкова Н.Ф. Роль пробіотиків у збереженні здоров'я та профілактиці найпоширеніших захворювань людини. *Міждисциплінарні проблеми.* 2019. <https://health-ua.com/article/45860-rol-probotikv-uzberezhen-zdorovya-taproflaktitc-najposhirenshih-zahvoryuva>
47. Parish A., Holliday K. Long-term care acquired urinary tract infections' antibiotic resistance patterns and empiric therapy: a pilot study. *Geriatr Nurs.* 2012;33(6): 473–8. doi: 10.1016/j. gerinurse.2012.05.003.
48. Ребров Б.А. Инфекции мочевой системы. В: Ребров БА, ред. Патология внутренних органов и беременность: учебное пособие. Донецьк: Видавник Заславський А.Ю.; 2010. с. 264–95.
49. Гаджиева З.К., Казиллов Ю.Б. Особенности подхода к профилактике рецидивирующей инфекции нижних мочевыводящих путей. *Урология.* 2016; 3:65–75.
50. Jepson R.G., Williams G., Craig J.C. Cranberries for preventing urinary tract infections. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012. doi: 10.1002/14651858.CD001321.pub5.
51. Григоренко В.М., Ромащенко О.В., Білоголовська В.В., Волков С.С. Стратегія лікування неускладнених інфекцій стратегія лікування

- неускладнених інфекцій нижніх сечовивідних шляхів. *Новини фармацевтичної України*. 2016, 1(11): 40-43
52. Grabe M. Perioperative antibiotic prophylaxis in urology. *Curr Opin Urol* 2001;11(1):81-5.<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11148751>
53. Cek M, Tandogdu Z, Tenke P, Wagenlehner F et al. Antibiotic Prophylaxis in Urology Departments, 2005-2010. *Eur Urol* 2013;63:386-94. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23031676>
54. Вагісан®/Vagisan®. Електронний ресурс. Режим доступу: [http://likicontrol.com.ua/%D1%96%D0%BD%D1%81%D1%82%D1%80%D1%83%D0%BA%D1%86%D1%96%D1%8F/\[6814\]](http://likicontrol.com.ua/%D1%96%D0%BD%D1%81%D1%82%D1%80%D1%83%D0%BA%D1%86%D1%96%D1%8F/[6814])
55. Лактіале® Уро. Електронний ресурс. Режим доступу: https://laktiale.ua/ua/laktiale/laktiale_uro/
56. Перелік лікарських засобів. Електронний ресурс. Режим доступу: https://moz.gov.ua/uploads/1/5052-dn_20180510_868_dod_2.pdf
57. Polak-Berecka M., Waśko A., Kordowska-Wiater M., Targoński Z. Application of response surface methodology to enhancement of biomass production by *Lactobacillus rhamnosus* E/N.J. *Brazil. Microbiol* .2011,42(4): 1485–1494. doi: 10.1590/S1517-838220110004000035
58. Brinques, G. B., do Carmo Peralba, M., & Ayub, M. A. Z.. Optimization of probiotic and lactic acid production by *Lactobacillus plantarum* in submerged bioreactor systems. *J Ind Microbiol & Biotechnol*, 2015, 37(2), 205–212. doi:10.1007/s10295-009-0665-.
59. Polak-Berecka M., Waśko A., Kordowska-Wiater M., Podleśny M., Targoński Z., Kubik-Komar A. Optimization of Medium Composition for Enhancing Growth of *Lactobacillus Rhamnosus* PEN Using Response Surface Methodology *Pol J Microbiol*. 2015;59(2):113-8.
60. Сидоров Ю.І., Влязло Р.Й., Новіков В.П. Процеси і апарати мікробіологічної та фармацевтичної промисловості. - Львів: Інтелект-Захід, 2008.- с. 736.

61. Polak-Berecka M., Waśko A., Kordowska-Wiater M., Targoński Z. Application of response surface methodology to enhancement of biomass production by *Lactobacillus rhamnosus* E/N. J. Brazil. Microbiol. – 2011. Vol. 42, N 4. – P. 1485–1494. doi: 10.1590/S1517-838220110004000035.
62. Сидоров Ю.И., Влязло Р.Й., Новіков В.П. Процеси і апарати мікробіологічної та фармацевтичної промисловості. - Львів: Інтеллект-Захід, 2008.- с. 736.
63. Schneebeil R., Egli T. A. Defined, Glucose-Limited Mineral Medium for the Cultivation of *Listeria* spp. *Appl. Environ Microbiol.* 2013; 79(8): 2503-11. doi: 10.1128/AEM.03538-12
64. Кробиология и биотехнология / А.А. Цуцаева, В.Г. Попов, К.М. Сытник; Ин-т проблем кробиологии и кримицины АН УССР. – К.: Наукова думка, 1987. - 216 с.
65. Pheighambardoust S.H. Application of spray drying for preservation of lactic acid starter cultures: a review / S.H. Pheighambardoust, A.Golshan Tafti, J.Hesari // Trends in Food Science & Technology. – 2011. – Vol. 22, №5. – P. 215-224.
66. Патент RU 2187943 C2 МПК A23L1/03, A23C9/123, C12N1/04 Способ распылительной сушки композиции, содержащей микроорганизмы / Н. Майстер (СН), Ю. Эбишер (СН), М. Викас (АТ), К.Эйер(СН),Д.Де Паскуале (US). - заявл. 08.07.1997. - опубл. 27.08.2002.
67. Pehkonen K.S. State transitions and physicochemical aspects of cryoprotection and stabilization in freeze-drying of *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) / K.S. Pehkonen, Y.H. Roos, S. Miao, R.P. Ross, C. Stanton // Journal of Applied Microbiology. – 2008. – Vol. 104, № 6. – P. 1732-1743. 7.
68. Похиленко В.Д. Методы длительного хранения коллекционных культур микроорганизмов и тенденции развития / В.Д. Похиленко, А.М. Баранов, К.В. Детушев // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. – 2009. – № 4 (12). – С. 99–121

69. Пат. RU № 02427624 C1, МПК C12N1/04, C12N1/20. Способ замораживания молочно-кислых бактерий / О.М. Кузьмина (RU), В.Д. Харитонов (RU). - № 2010120515/10; заявл. 24.05.2010, - опубл. 27.06.2011.
70. Даниленко С.Г. Зберігання культур молочнокислих мікроорганізмів // Наукові праці НУХТ 2015.– Том 21, № 1 – С. 28-32.
71. Патент № 2302747 RU. Продукт питания из злаков, содержащий пробиотический микроорганизм, продукт питания из злаков, содержащий метаболиты, продуцированные пробиотическими микроорганизмами, и способы их получения / Де Ре Йохансен, Джон Дарбишир. – Оpubл. 20.07.2007.
72. *Загальна мікробіологія і вірусологія: Лабораторний практикум / Уклад. Т.П. Пирог, М.М. Антонюк, С.В. Ігнатенко. – К.: НУХТ, 2010. – 127 с.*
73. *Загальна мікробіологія і вірусологія: Лабораторний практикум для студентів напрямку 6.051401 «Біотехнологія» денної форми навчання / Уклад. Т.П. Пирог, М.М. Антонюк, С.В. Ігнатенко. – К.: НУХТ, 2010. – 129 с.*
74. Schneebeli R., Egli T. A. Defined, Glucose-Limited Mineral Medium for the Cultivation of *Listeria* spp . *Appl. Environ Microbiol.* 2013; 79(8): 2503-11. doi: 10.1128/AEM.03538-12.